



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

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

(11)



1-0024687

(51)⁷ A01N 31/04; A01N 63/02; A23K 1/00; (13) B
A23K 1/18; A23K 10/18; A23K 50/80;
A23L 1/30; A23L 18/29; A23L 2/52;
A23L 33/00; A23L 33/135; A61K 31/07;
A61K 35/74; A61K 35/742; A61K
38/48; A61K 47/36; A61K 47/38; A61K
9/16; A61K 9/19; A01N 63/00

(21) 1-2012-01991

(22) 28/01/2011

(86) PCT/US2011/022821 28/01/2011

(87) WO2011/094469 04/08/2011

(30) 61/299,315 28/01/2010 US

(45) 27/07/2020 388

(43) 27/05/2013 302A

(73) ADVANCED BIONUTRITION CORPORATION (US)

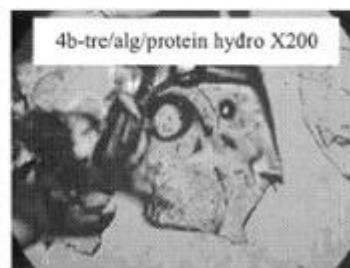
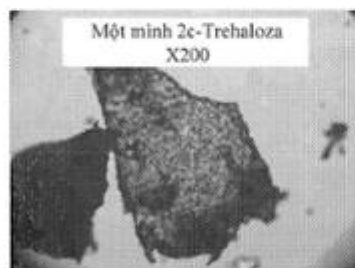
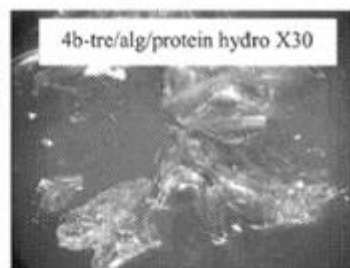
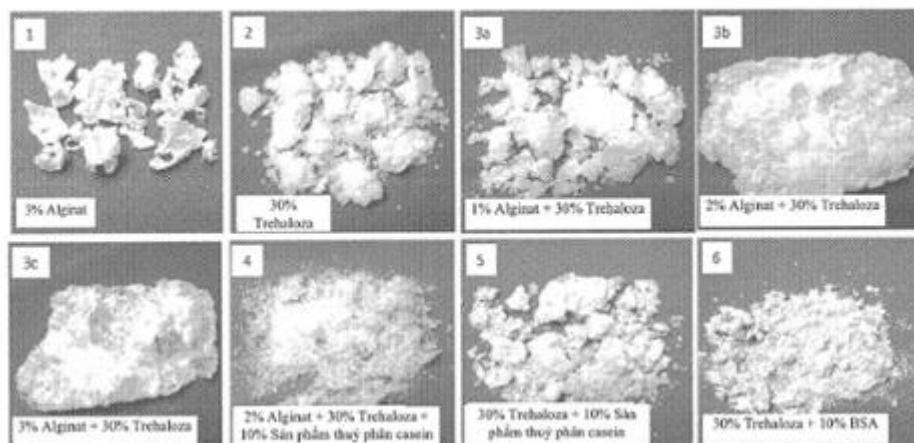
7155 Columbia Gateway Drive, Columbia, MD 21046-2545, United States of America

(72) HAREL, Moti (US); SCARBROUGH, January (US); DREWS, Roger (US).

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

(54) CHẾ PHẨM THỦY TINH KHÔ CHỨA VẬT LIỆU CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm khô dạng thủy tinh và phương pháp tạo ra chế phẩm này, với mục đích làm ổn định và bảo vệ vật liệu sinh học trong quá trình bảo quản thô và các điều kiện sử dụng, trong đó chế phẩm này bao gồm vật liệu có hoạt tính sinh học và vật liệu sinh học kết hợp, bao gồm vi khuẩn sống, trong chất tạo nền bảo vệ dạng tinh thể.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc làm ổn định và bảo vệ vật liệu sinh học trong điều kiện bảo quản thô và các điều kiện sử dụng, và cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến việc kết hợp vật liệu có hoạt tính sinh học và sinh vật bao gồm vi khuẩn sống vào trong chế phẩm bảo vệ chứa chất tạo nền thủy tinh vô định hình.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đông khô là phương pháp truyền thống phổ biến nhất dùng để bảo quản vật liệu sinh học để bị hỏng như vi khuẩn sống hoặc chết và virus và protein trong khi các phương pháp khác như sấy phun, sấy phun tầng sôi và làm mất nước thường không thích hợp. Nhiệt độ sấy khô cao được sử dụng trong các phương pháp này thường gây hư hỏng đáng kể cho chính vật liệu có hoạt tính sinh học này. Ngoài ra, các phương pháp này có thể không làm khô vật liệu ở mức đáp ứng tiêu chuẩn về độ ẩm còn lại hoặc các tiêu chuẩn về hoạt độ của nước dư để đảm bảo cho sản phẩm ổn định, và do đó, có thể cần thêm bước làm khô bằng các phương thức khác. Quy trình làm khô lạnh thông thường thường bao gồm bước làm đông lạnh dung dịch chứa vật liệu có hoạt tính sinh học, và bước làm đông khô vật liệu sinh học đã đông lạnh trong môi trường chân không hoàn toàn trong khi vẫn giữ nó ở trạng thái đông lạnh. Nhiệt độ thấp của quy trình đông khô làm giảm phản ứng phân hủy của vật liệu có hoạt tính sinh học và giảm thiểu việc mất hoạt tính ở dạng khô cuối cùng. Thông thường, quy trình đông khô làm mất hoạt tính và gây hư hỏng đáng kể cho vật liệu có hoạt tính sinh học do việc tạo ra các tinh thể đá trong quá trình làm khô chậm. Ngoài ra, bản thân bước đông lạnh, nếu không được thực hiện đúng, có thể gây biến tính hoặc làm cho vật liệu có hoạt tính sinh học bị mất hoạt tính. Tình trạng hư hỏng do việc tạo ra cấu trúc tinh thể đá có thể tránh được, ở mức độ nào đó, bằng cách bổ sung chất bảo quản lạnh (hay còn gọi là chất chống đông) vào dung dịch có hoạt tính sinh học (Morgan et al., 2006). Chất bảo quản lạnh này là chất hoá học có khả năng hoà tan cao, chúng được bổ sung vào chế phẩm để bảo vệ màng tế bào và protein khi làm đông lạnh và để tăng cường độ ổn định trong quá trình bảo quản. Chất làm ổn định thường dùng cho vi khuẩn sống

và virus bao gồm đường cao (đường mạch dài) như sucroza, glyxerol, hoặc sorbitol, có mặt ở nồng độ cao đối với vật liệu tế bào hoặc chất có hoạt tính sinh học (Morgan et al., 2006; Capela et al., 2006). Tuy nhiên, chất bảo quản lạnh này có thể không thâm nhập tốt vào trong tế bào để bảo vệ các thành phần có hoạt tính trong không gian nội bào, và có thể gây mất ổn định khi bảo quản các chất đã đông khô. Vì lý do này, các vật liệu sinh học chứa màng như virus, vi khuẩn, và tế bào không thể sống tốt trong quá trình làm đông khô. Do đó, cần phát triển quy trình làm khô tối ưu và công thức phối trộn tối ưu để giảm thiểu sự hao hụt khi làm khô đồng thời vẫn giữ được độ ổn định thích hợp của vật liệu khô trong bảo quản.

Một số vấn đề liên quan đến việc làm khô lạnh đã được giải quyết bằng cách sử dụng kết hợp theo một số công thức nhất định và làm khô trong chân không ở trạng thái thủy tinh (hay còn gọi là trạng thái thủy tinh), cụ thể là thủy tinh đường (patent Mỹ số 6,190,701). Các vật liệu có hoạt tính sinh học khô đã làm ổn định được bảo vệ trong chất tạo nền thủy tinh khỏi các tác động bất lợi của môi trường như nhiệt độ và độ ẩm cao. Nhìn chung, việc làm ổn định bằng cách tạo thành thủy tinh được bắt đầu bằng cách cô dung dịch đường chứa phân tử có hoạt tính sinh học thành sirô quá bão hòa. Việc tiếp tục loại bỏ nước sẽ làm cho sirô dần dần hóa rắn, mà cuối cùng chuyển thành thủy tinh đường rắn với hàm lượng nước còn lại thấp. Trong thủy tinh, quá trình khuếch tán hóa học không diễn ra và do đó, các phản ứng hóa học gần như bị ngừng lại. Do quá trình biến tính hoặc hư hỏng của màng là các thay đổi hóa học nên chúng không thể xảy ra ở trạng thái thủy tinh và theo đó, vật liệu có hoạt tính sinh học sẽ được làm ổn định và được bảo vệ. Nhiều thủy tinh không ổn định vì chúng phản ứng với vật liệu có hoạt tính sinh học trong quá trình bảo quản. Các vấn đề liên quan đến đường khử, có thể tạo thành thủy tinh có tính chất vật lý tốt nhưng sau đó các nhóm aldehyt của chúng sẽ tấn công nhóm amino trên chất có hoạt tính sinh học theo phản ứng Maillard thông thường, trong khi đó đường không phản ứng sẽ tạo ra sản phẩm ổn định, mà không cần bảo quản lạnh.

Vì đường vốn hút ẩm nên việc loại bỏ nước và làm khô cuối cùng đối với sirô quá bão hòa trở nên quá khó. Trở ngại này đã được Annear (1962) nêu lần đầu tiên, ông đã phát triển chế phẩm chứa vi khuẩn trong dung dịch của đường và axit amin và quy trình làm khô trong chân không bao gồm bước đun sôi siro đặc và để sirô đặc này

tạo bọt. Roser và các đồng tác giả trong patent Mỹ số 6,964,771 cũng đã đưa ra các khái niệm tương tự về việc làm khô bằng cách tạo bọt mà bao gồm bước cô bằng cách làm bay hơi khối dung môi, tiếp theo là bước đun sôi và tạo bọt cho sirô đặc trong chân không. Để làm giảm sự hư hỏng do quá trình oxy hoá và biến tính có thể xảy ra khi đun sôi, Bronshtein (các patent Mỹ số 5,766,520, 7,153,472) đã đưa vào chế phẩm bảo vệ cải tiến chứa hydrat cacbon và chất có hoạt tính bề mặt. Việc làm khô chế phẩm bảo vệ dạng dung dịch này cũng bao gồm quy trình cô từng bước trong môi trường có độ chân không vừa phải trước khi áp dụng môi trường chân không cao để đun sôi bọt phần nước còn lại để tạo thành bọt ổn định khô. Để loại bỏ bước đun sôi, Busson và Schroeder (patent Mỹ số 6,534,087) đã đưa vào quy trình làm khô chế phẩm ở trạng thái lỏng, thích hợp cho vật liệu có hoạt tính sinh học dễ bị hỏng và sử dụng lò chân không ở áp suất chân không rất thấp trên 30 Torr. Sau khi đạt được độ khô nhất định mà không phải đun sôi vật liệu, nhiệt độ được đưa lên trên 20°C và vật liệu khô được thu lấy chỉ sau vài giờ.

Kiểu quy trình làm khô trong đó dung dịch có hoạt tính sinh học được duy trì ở trạng thái lỏng trong toàn bộ quy trình làm khô, có ưu điểm là làm khô nhanh hơn nhờ quá trình bay hơi của chất lỏng khi đun sôi và diện tích bề mặt tăng lên nhờ diện tích tạo bọt. Tuy nhiên, bước đun sôi và tạo bọt đòi hỏi phải nạp thêm lượng đáng kể nhiệt cần để làm phun trào dung dịch. Quy trình làm khô này không thích hợp để làm khô vật liệu sinh học dễ bị hỏng, như virus sống, tế bào hoặc vi khuẩn bởi vì, nhiệt thêm vào sẽ làm tăng quá trình phân hủy bằng enzym (ví dụ, phân giải protein), và các phản ứng oxy hoá hoá học (ví dụ, quá trình oxy hoá và tấn công của gốc tự do), mà có thể làm mất hoạt tính hoặc khả năng sống của vật liệu sinh học.

Quy trình làm khô được mô tả ở trên cũng bị hạn chế ở khả năng tăng quy mô để áp dụng trên quy mô lớn trong công nghiệp. Để loại bỏ bước làm đông lạnh cần phải thực hiện quy trình này ở độ chân không thấp hơn (>7 TORR) so với quy trình đông khô hoặc sấy phun lạnh thông thường. Nhược điểm lớn nhất của các quy trình trên là không có khả năng kiểm soát và hạn chế việc trào bọt trong bình, khay hoặc lọ nhỏ. Việc bọt bị trào và tạo ra quá mức làm cho khả năng áp dụng quy trình này trên quy mô công nghiệp trở nên không khả thi. Bản chất trào và tạo bọt của bước đun sôi làm cho một phần vật liệu bị bắn tung toé lên thành bình và vào buồng làm khô. Để làm giảm việc trào bọt trong bước đun sôi, Bronshtein (Patent Mỹ số 6,884,866,

6,306,345) đã đề xuất các buồng đặc biệt và quy trình có nhiệt độ/áp suất được kiểm soát để làm giảm sự quá nhiệt xuống mức chấp nhận được. Một nghiên cứu khác về việc trào bọt và tạo bọt quá mức được mô tả trong công bố yêu cầu cấp patent Mỹ số 2008/0229609, trong đó dung dịch có hoạt tính sinh học được đựng trong vật chứa hoặc túi phủ màng thấm khí. Tương tự, các quy trình này khó áp dụng trên quy mô công nghiệp, chúng cần các thiết bị chuyên dụng và khó tạo ra các chế phẩm khác nhau với độ ổn định tin cậy.

Quy trình làm khô ở dạng bọt, như đã biết trong lĩnh vực, thực sự không thích hợp để bảo quản các vật liệu sinh học dạng màng, như liposom, virus hoặc tế bào sống và vi khuẩn. Màng lipid thường ngăn cản sự thâm nhập của các chất bảo vệ vào trong thể tích được bao bọc hoặc ngăn chặn sự đi ra tương ứng của nước ra khỏi khu vực được bao bọc. Khi chất bảo vệ thâm nhập ở mức không thích hợp, các quy trình có sự tham gia của enzym, như quá trình phân giải protein, và các quy trình hoá học, như quá trình oxy hoá và tấn công của gốc tự do, có thể làm mất hoạt tính hoặc khả năng sống của vật liệu sinh học dạng màng. Các dịch giảm thẩm thấu còn trong thể tích được bao bọc bởi màng có thể làm tăng tính không ổn định của vật liệu sinh học. Truong-le, Vu (patent Mỹ số 7,381,425) mô tả quy trình làm khô lạnh thích hợp đối với vật liệu có hoạt tính sinh học dạng màng. Chế phẩm theo sáng chế bao gồm polyol và vật liệu có hoạt tính sinh học dạng màng. Quy trình làm khô bắt đầu bằng cách làm lạnh chế phẩm đến nhiệt độ bằng khoảng nhiệt độ chuyển pha của màng lipid, giảm áp suất trên chế phẩm để tạo thành bọt ổn định, làm đông lạnh bọt, và sau đó thăng hoa nước từ bọt đông lạnh để tạo ra chế phẩm bọt khô được đông khô. Điều kiện làm khô thứ cấp có thể được sử dụng để làm khô hơn nữa bọt.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu về chế phẩm bảo vệ thích hợp, có thể được làm khô ở trạng thái thủy tinh mà không cần đun sôi và tạo bọt quá mức. Cũng có nhu cầu đặc biệt về chế phẩm tiết kiệm chi phí và quy trình làm khô nhưng có thể nhân rộng, cũng thích hợp cho các ứng dụng bên ngoài ngành công nghiệp dược phẩm như công nghiệp thực phẩm và nông nghiệp. Các chế phẩm bảo vệ và quy trình làm khô sơ bộ là cần thiết để tạo ra độ khô thích hợp mà không cần tiếp xúc với nhiệt độ cao. Chế phẩm cần là chế phẩm có thể bảo vệ vật liệu sinh học khi bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm cao. Sáng chế đề xuất giải pháp vượt qua được các thách thức như nêu dưới đây. Quy trình loại nước theo sáng chế diễn ra ở trạng thái êm dịu và không phải đun sôi hoặc

tạo bột hoạt chất và do đó, nó có nhiều ưu điểm hơn so với kỹ thuật làm khô lạnh và làm khô bột thông thường mà thường cần phải đun sôi hoặc tạo bột, hoặc cần cả hai bước này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp làm khô để bảo quản vật liệu có hoạt tính sinh học dễ bị hỏng, như peptit, protein, enzym, hormon, vitamin, carotenoit, khoáng chất, thuốc, chất kháng sinh, chất diệt vi khuẩn, chất diệt nấm, chất diệt cỏ, chất diệt côn trùng gây hại, chất diệt tinh trùng, axit nucleic, kháng thể, vacxin, vi khuẩn (có lợi cho sức khỏe hoặc vi khuẩn khác), virus và/hoặc huyền phù chứa tế bào trong bảo quản. Phương pháp làm khô này đã cung cấp một quy trình làm khô chế phẩm chứa vật liệu có hoạt tính sinh học, chất tạo nền, và chất tạo thủy tinh. Chế phẩm được tạo ra bằng cách phân tán tất cả các thành phần rắn và vật liệu có hoạt tính sinh học trong dung dịch. Dung dịch này được làm đông lạnh nhanh bằng các phương thức đã biết trong lĩnh vực như nitơ lỏng hoặc đá khô để tạo thành chế phẩm vô định hình ở dạng hạt, sợi hoặc giọt nhỏ. Các phần tử đông lạnh này có thể được bảo quản trong tủ làm đông lạnh sâu (có nhiệt độ nằm trong khoảng từ -30°C đến -80°C) cho đến khô hoặc ngay sau đó được đặt lên các khay ở trạng thái vô định hình được làm đông lạnh để làm khô ở trạng thái lỏng trong thiết bị làm khô lạnh thông thường. Phương pháp làm khô này được bắt đầu bằng bước thổi sạch nhanh và làm ổn định cấu trúc của các phần tử đông lạnh dưới áp suất chân không nhỏ hơn <2000 mTORR (266,644 Pa), sau đó là bước làm khô sơ bộ dưới áp suất chân không lớn hơn >2000 mTORR (266,644 Pa) và ở nhiệt độ mong muốn. Trong bước làm khô thứ cấp và cuối cùng đối với vật liệu vô định hình dạng thủy tinh, việc sử dụng áp suất của môi trường chân không hoàn toàn và nhiệt độ tăng cao, sẽ thu được hoạt độ cuối cùng của nước trong vật liệu khô như mong muốn.

Theo một phương án, chế phẩm chứa lượng vừa đủ chất tạo nền, trong đó có kết hợp vật liệu có hoạt tính sinh học vào. Ví dụ về chất tạo nền thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, xenluloza axetat phthalat (CAP), carboxy-metyl-xenluloza, pectin, natri alginat, muối của axit alginic, hydroxyl propyl methyl xenluloza (HPMC), methyl xenluloza, caragenan, gôm guar, gôm acacia, gôm xantan, gôm đậu locust, chitosan và dẫn xuất chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột và tinh bột cải biến,

xyclodextrin và oligosacarit (inulin, maltodextrin, dextran, v.v.); và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, chất tạo nền được ưu tiên là natri alginat. Tốt hơn, nếu chế phẩm chứa, theo tỷ lệ phần trăm khối lượng tổng chất khô, 0,1-20% và tốt hơn nữa là 1-12%.

Theo một phương án khác, chất tạo nền chứa hỗn hợp của natri alginat và oligosacarit ở tỷ lệ khối lượng của natri alginat/oligosacarit là 1: 1-10, tốt hơn nữa là 1 : 1-5.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, chất tạo nền được liên kết ngang với ion kim loại hoá trị hai để tạo thành hydrogel đặc. Chế phẩm hydrogel liên kết ngang này được tạo thành bằng cách phun sương hoặc ép đùn huyền phù đặc này vào trong bể chứa dung dịch của ion kim loại hoá trị hai hoặc bằng cách bổ sung trực tiếp các ion kim loại hoá trị hai vào huyền phù đặc này và để chế phẩm này cứng lại và tạo thành hydrogel. Chế phẩm hydrogel này sau đó được làm đông lạnh nhanh và làm khô theo phương pháp làm khô theo sáng chế.

Theo một phương án khác nữa, chế phẩm chứa lượng đáng kể chất tạo thủy tinh, trong đó có vi sinh vật kết hợp vào. Ví dụ về chất thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein như albumen trứng, lòng trắng trứng, gelatin, globulin miễn dịch, protein đậu nành đã tách, protein lúa mì, protein đậu Hà Lan, protein hạt bông, bột sữa gầy, caseinat, protein nước sữa và protein đã thủy phân bất kỳ; hydrat cacbon bao gồm monosacarit (ví dụ, galactosa, D-mannosa, sorboza, v.v.), disacarit (ví dụ, lactosa, trehalosa, sucroza, v.v.), axit amin như lysin, glutamat, glyxin, alanin, arginin hoặc histidin, cũng như là axit amin kỵ nước (tryptophan, tyrosin, loxin, phenylalanin, v.v.); metylamin như betain; muối được dùng như magie sulfat; polyol như rượu trihydric hoặc rượu đường cao (mạch dài), (ví dụ, glyxerin, erythritol, glyxerol, arabitol, xylitol, sorbitol, và manitol); propylen glycol; polyetylen glycol; pluronic; chất có hoạt tính bề mặt; và dạng kết hợp của chúng.

Theo một phương án được ưu tiên, chất tạo thủy tinh chứa hỗn hợp của disacarit và protein đã thủy phân. Theo một phương án cụ thể, chất tạo thủy tinh tốt hơn là hỗn hợp của trehalosa và protein đã thủy phân. Tốt hơn, nếu chế phẩm chứa, theo tỷ lệ phần trăm theo khối lượng của tổng chất khô, 10-90%, trehalosa và 0,1-30%

protein đã thủy phân, tốt hơn nữa là 20-80% trehaloza và 0,1-20% protein đã thủy phân, và tốt nhất là 40-80% trehaloza và 0,1-20% protein đã thủy phân.

Phương pháp theo sáng chế thường bao gồm bước trộn trong dung dịch chứa vật liệu có hoạt tính sinh học (ví dụ, peptit, protein, enzym, hormon, vitamin, carotenoid, khoáng chất, thuốc, chất kháng sinh, chất diệt vi khuẩn, chất diệt nấm, chất diệt cỏ, chất diệt côn trùng, chất diệt tinh trùng, axit nucleic, kháng thể, vacxin, vi khuẩn, virus và/hoặc huyền phù chứa tế bào), ít nhất một chất tạo nền, và ít nhất hai chất tạo thủy tinh vào huyền phù đặc đồng nhất, làm đông lạnh nhanh huyền phù đặc này bằng cách phun sương, tạo giọt hoặc ép đùn vào bể nitơ lỏng. Thu lấy hạt, vi hạt, sợi hoặc giọt từ bể nitơ lỏng và làm khô ở trạng thái lỏng trong máy sấy đông lạnh, hoặc theo cách khác, bảo quản chúng trong thiết bị làm đông lạnh sâu (có nhiệt độ nằm trong khoảng từ -30°C đến -80°C) cho đến khi khô.

Theo một dạng biến thể của sáng chế, lượng chất tạo nền trong chế phẩm được điều chỉnh để thu được chế phẩm có độ nhớt và tỷ trọng mong muốn, việc này cho phép làm khô sơ bộ một cách hiệu quả trong khi vẫn loại bỏ được bước đun sôi và tạo bọt quá mức mà thường xuất hiện trong quá trình làm khô sơ bộ ở dạng lỏng. Tỷ trọng mong muốn của chế phẩm lỏng có thể đạt được bằng phương thức bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, đảo hoặc phun khí như không khí, nitơ, cacbon đioxit, argon v.v... Tốt hơn, nếu nitơ được phun vào chế phẩm huyền phù đặc nhớt trong khi trộn để tạo thành huyền phù đặc dạng kem hoặc xốp ổn định trước bước làm đông lạnh nhanh.

Theo sáng chế, quy trình làm khô bao gồm ba bước chính: 1) bước thổi sạch nhanh và làm ổn định cấu trúc của các phần tử đã đông lạnh dưới áp suất chân không nhỏ hơn <2000 mTORR (266,644 Pa), 2) bước làm khô lỏng sơ bộ trong áp suất chân không lớn hơn >2000 mTORR (266,644 Pa) và ở nhiệt độ mong muốn, 3) bước làm khô thứ cấp và cuối cùng của vật liệu dạng thủy tinh trong áp suất chân không hoàn toàn và nhiệt độ tăng cao trong thời gian đủ để làm giảm hoạt độ nước A_w của chế phẩm được làm khô xuống bằng 0,3 hoặc nhỏ hơn.

Theo phương án được ưu tiên của phương pháp làm khô, vật liệu có hoạt tính sinh học được trộn trong dung dịch chứa chất tạo nền và chất tạo thủy tinh. Theo một phương án cụ thể, vật liệu có hoạt tính sinh học bao gồm vi khuẩn sống (ví dụ, lợi khuẩn). Ví dụ về vi sinh vật thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nấm men

như *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* và *Torulopsis*, các loại nấm mốc như *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* và *Torulopsis* và vi khuẩn như các giống *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 vi sinh vật có lợi thích hợp được lấy đại diện là các loài sau đây và bao gồm tất cả các chủng sinh vật có cùng cấu tạo di truyền thuộc 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. gasserii*, *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*, *Propionibacteria freudenreichii*, *Prop. shermanii*, *Saccharomyces cereviseae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staph. xylosus*, *Streptococcus infantarius*, *Strep. salivarius ss. thermophilus*, *Strep. thermophilus* và *Strep. lactis*.

Theo phương pháp được ưu tiên, chế phẩm được trộn ở nhiệt độ trong phòng hoặc được làm ấm sơ bộ để hỗ trợ việc làm tan các vật liệu trong dung dịch nhót (ví dụ, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C). Sau khi trộn đến khi đồng nhất, huyền phù đặc nhót sau đó được làm đông lạnh nhanh bằng cách phun sương, tạo giọt, hoặc ép đùn vào nitơ lỏng. Các phần tử đã được làm đông lạnh được thu lấy từ bể nitơ lỏng và làm khô ngay sau đó hoặc theo cách khác được bảo quản trong thiết bị đông lạnh sâu để làm khô sau đó. Thông thường, huyền phù đặc chứa vật liệu có hoạt tính sinh học được làm đông lạnh nhanh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -30°C đến -180°C, tốt hơn nữa là chế phẩm được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng.

Theo phương án được ưu tiên, các phần tử đã được làm đông lạnh nhanh được làm khô ngay sau đó hoặc theo cách khác, được bảo quản trong thiết bị làm đông lạnh

sâu, tốt hơn là ở nhiệt độ -80°C , cho đến khi khô. Các phần tử đã đông lạnh sau đó được đưa lên khay và chuyển ngay sang buồng làm khô chân không, tại đây chúng được làm khô theo sáng chế. Tốt hơn, nếu việc làm khô được bắt đầu bằng cách đưa các phần tử đã đông lạnh vào trong môi trường áp suất chân không nằm trong khoảng từ 0 đến 2000 mTORR (266,644 Pa). Các phần tử đã đông lạnh này được loại khí và để cho cấu trúc và thể tích của chúng phát triển và ổn định trong khoảng thời gian ngắn. Thông thường, khoảng thời gian mong muốn để các phần tử đã đông lạnh trong áp suất chân không cao sẽ không lâu hơn 30 phút, tốt hơn nữa nếu khoảng thời gian này nằm trong khoảng từ 1 đến 20 phút. Sau thời gian ngắn ban đầu để loại khí và ổn định cấu trúc cho các phần tử đã đông lạnh, độ chân không được điều chỉnh đến khoảng từ 2000 (266,644 Pa) đến 10000 mTORR (1333,220 Pa) và sử dụng nhiệt để rã đông các phần tử ở nhiệt độ trên nhiệt độ đông lạnh của chúng. Thông thường, độ chân không được điều chỉnh để nằm trong khoảng từ 2000 mTORR (266,644 Pa) đến 4000 mTORR (533,288 Pa) và nhiệt độ của các phần tử được tăng lên đến khoảng từ -5°C đến $+5^{\circ}\text{C}$. Trong các điều kiện làm khô sơ bộ được ưu tiên này, các phần tử đã đông lạnh bị rã đông nhanh chóng và khả năng giữ lại hình dạng ban đầu của chúng rất kém, trong khi đó quá trình loại nước bắt đầu tăng tốc. Việc làm khô thứ cấp sau đó được thực hiện sau khi loại bỏ khoảng 60-90% lượng nước tự do, điều chỉnh áp suất chân không tới mức lớn nhất và cung cấp nhiệt cho chế phẩm để tăng nhiệt độ lên đến khoảng từ 30°C đến 60°C . Để sản phẩm đạt độ ổn định tối ưu, tốt hơn nếu chế phẩm được làm khô trong thời gian đủ để làm giảm hoạt độ nước của chế phẩm đến giá trị $A_w=0,3$ hoặc nhỏ hơn. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, bước làm khô thứ cấp bao gồm công đoạn loại bỏ nước liên kết ở áp suất nhỏ hơn 1000 mTORR (133,322 Pa).

Chế phẩm được làm khô có thể được sử dụng trực tiếp dưới dạng vảy, hoặc được nghiền thành bột và sàng đến cỡ hạt trung bình nằm trong khoảng từ khoảng 10 μm đến khoảng 1000 μm . Chế phẩm này có thể được dùng trực tiếp cho động vật, bao gồm con người, dưới dạng bột cô đặc, dưới dạng chất lỏng tái hoàn nguyên, (ví dụ, đồ uống), hoặc nó có thể được kết hợp ở dạng vảy hoặc bột vào thực phẩm hoặc thức ăn gia súc đã có.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả quan sát các chế phẩm đã làm khô khác nhau, chứa các chất tạo nền và chất tạo thủy tinh khác nhau dưới dạng các hạt rắn đã đông lạnh theo phương pháp của sáng chế bằng mắt thường và bằng kính hiển vi.

Fig.2 thể hiện tác động của dạng môi trường nuôi cấy *L. rhamnosus* như môi trường nuôi cấy tươi, các hạt đã đông lạnh hoặc bột khô đến số CFU ban đầu của nó trong chế phẩm khô.

Fig.3 thể hiện tác động của nhiệt độ làm đông lạnh chế phẩm chứa *L. rhamnosus* dưới dạng các hạt rắn đã đông lạnh trong nitơ lỏng hoặc trong thiết bị làm đông lạnh sâu có nhiệt độ -80°C và dưới dạng huyền phù đặc nhớt không đông lạnh ở nhiệt độ $+4^{\circ}\text{C}$ đến số CFU ban đầu của vi khuẩn này trong chế phẩm khô. Các kết quả chỉ thể hiện tác động của nhiệt độ đông lạnh huyền phù đặc khi không có bước thổi sạch bổ sung trước khi làm khô.

Fig.4 thể hiện tác động của nhiệt độ làm đông lạnh chế phẩm chứa *Bifidobacterium animalis* Bbl2 dưới dạng hạt rắn đã đông lạnh trong nitơ lỏng và dưới dạng huyền phù đặc nhớt không đông lạnh ở nhiệt độ $+4^{\circ}\text{C}$ đến số CFU ban đầu của vi khuẩn này trong chế phẩm khô. Các kết quả chỉ thể hiện tác động của nhiệt độ làm đông lạnh huyền phù đặc khi không có bước thổi sạch bổ sung trước khi làm khô.

Fig.5 thể hiện tác động của thời gian thổi sạch các hạt rắn đông lạnh trong chân không đến số CFU ban đầu của *L. rhamnosus* trong chế phẩm khô.

Fig.6 thể hiện profin làm khô của chế phẩm theo phương pháp theo sáng chế trong máy sấy đông lạnh.

Fig.7 thể hiện mức hao hụt khi xử lý và làm khô của *L. rhamnosus* trong chế phẩm và phương pháp làm khô theo sáng chế.

Fig.8 thể hiện xu hướng ổn định của chế phẩm khô chứa lợi khuẩn, *L. rhamnosus*, khi bảo quản ở nhiệt độ 40°C và độ ẩm tương đối 33%.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Cần hiểu rằng các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, danh từ số ít cũng sẽ bao gồm nghĩa số nhiều trừ khi nội dung nêu rõ nghĩa khác. Do đó, ví dụ, khi đề cập đến "protein" cũng có nghĩa là đề cập đến một protein hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều protein; khi đề cập đến "enzym", "vitamin", "vi khuẩn", v.v., cũng có nghĩa là đề cập đến một hoặc hỗn hợp của một vài thành phần trong số chúng, và dạng tương tự.

"Vật liệu có hoạt tính sinh học", "thành phần có hoạt tính sinh học" hoặc "chế phẩm có hoạt tính sinh học" dùng để chỉ chế phẩm, ở dạng sao cho hoạt tính sinh học của các thành phần có hoạt tính sinh học được thể hiện rõ ràng.

"Chất tạo nền" chỉ hợp chất hoặc nguyên liệu được bổ sung vào chế phẩm để làm tăng độ nhớt và/hoặc tỷ trọng của chế phẩm ướt hoặc để tạo thành hydrogel. Ví dụ về chất tạo nền thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dẫn xuất xenluloza tan trong nước như metylxenluloza, hydroxypropylxenluloza, hydroxyetylxenluloza, và hypromeloza; alginat, galactomanan, gôm gelatin, nhựa tragacan, kể cả các dẫn xuất bất kỳ của chúng, xenluloza axetat phtalat (CAP), carboxy-metyl-xenluloza, pectin, natri alginat, muối của axit alginic, hydroxyl propyl methyl xenluloza (HPMC), metyl xenluloza, carrageenan, gôm guar, gôm acacia, gôm xantan, gôm đậu locust, chitosan và dẫn xuất chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột và tinh bột cải biến, cyclodextrin và oligosacarit (inulin, maltodextrin, dextran, v.v.) và hỗn hợp của chúng.

"Chất tạo thủy tinh" hoặc "chất tạo thủy tinh đường" thường chỉ hợp chất hoặc nguyên liệu dễ tan trong dung dịch và không làm đặc hoặc polyme hóa khi tiếp xúc với nước. Các chất này được bổ sung vào để đảm bảo hoặc làm tăng độ ổn định cho vật liệu có hoạt tính sinh học trong quá trình làm khô và sau đó, hoặc để làm ổn định sản phẩm bột khô trong thời gian dài bảo quản. Chất tạo thủy tinh hữu dụng có thể là monome, oligome hoặc polyme.

Theo một phương án được ưu tiên, chất tạo thủy tinh là sacarit. Sacarit, hoặc hydrat cacbon, được định nghĩa là hợp chất được tạo thành chủ yếu từ cacbon, hydro, và oxy. Sacarit hữu dụng bao gồm các đường khử và các đường không khử và các rượu đường, oligosacarit, polysacarit tan trong nước và các dẫn xuất của chúng. Sacarit được ưu tiên theo sáng chế bao gồm glucoza, fructoza, lactoza, sucroza,

trehaloza, maltoza, xenlobioza, galactoza, maltotrioza, rafinoza, dextrin, dextran, inulin, manitol, sorbitol, xylitol. Sacarit được đặc biệt ưu tiên là glucoza và trehaloza.

Chất tạo thủy tinh hữu dụng khác có thể được chọn từ các nhóm chất hoá học khác, như axit amin tan trong nước, peptit hoặc protein và protein đã thủy phân. Ví dụ, lysin, glyxin, alanin, arginin hoặc histidin, và các axit amin kỵ nước (tryptophan, tyrosin, loxin, phenylalanin, v.v.); metylamin như betain. Protein hữu dụng bao gồm gelatin, albumin trứng, lòng trắng trứng, protein sữa, caseinat, globulin miễn dịch, protein đậu nành, protein đậu Hà Lan, protein hạt bông hoặc các protein có trong thực phẩm khác, sữa hoặc rau.

"Protein đã thủy phân" thường chỉ protein từ nguồn động vật, sữa hoặc thực vật được phân cắt bằng cách thủy phân hoặc tiêu hóa bằng enzym thành các mảnh peptit ngắn hơn và/hoặc các axit amin. Protein đã thủy phân hữu dụng là các protein được xử lý thủy phân triệt để, để làm giảm 99% phân tử lượng so với protein tự nhiên, xuống dưới 50000 Dalton, tốt hơn là xuống dưới 10000 Dalton.

Nhiệt độ hoặc điều kiện "trong phòng" là nhiệt độ ở một thời điểm nhất định tại một môi trường nhất định. Thông thường, nhiệt độ trong phòng là 22-25°C, áp suất khí quyển môi trường, và độ ẩm môi trường đều dễ dàng xác định được và sẽ thay đổi tùy thuộc vào thời điểm trong năm, điều kiện thời tiết và khí hậu, độ cao so với mực nước biển, v.v..

"Thổi sạch" hoặc "loại khí" trong nội dung của sáng chế chỉ việc giải phóng khí khỏi từ chế phẩm rắn hoặc lỏng, trong đó áp suất từng phần của khí lớn hơn áp suất được áp dụng. Đây không phải là việc đun sôi dung dịch ở dạng lỏng, và có thể thường xảy ra ở áp suất trên áp suất làm sôi dung dịch.

"Sôi" chỉ hiện tượng chuyển pha nhanh chóng từ lỏng thành khí diễn ra khi nhiệt độ của chất lỏng cao hơn nhiệt độ sôi của nó. Nhiệt độ sôi là nhiệt độ tại đó áp suất hơi của chất lỏng bằng với áp suất được áp dụng. Sôi có thể rất mạnh khi nhiệt được bổ sung vào chất lỏng đã ở nhiệt độ sôi.

"Hoạt độ nước" hay "Aw" khi đề cập đến các chế phẩm công thức đã làm khô, dùng để chỉ độ khả dụng của nước và thể hiện trạng thái năng lượng của nước trong một hệ thống. Nó được định nghĩa là áp suất hơi của nước nằm trên mẫu chia cho áp

suất của nước tinh khiết ở cùng nhiệt độ. Nước chung cất tinh khiết có hoạt độ nước chính xác bằng một hoặc $A_w=1,0$.

"Độ ẩm tương đối" hoặc "RH" khi đề cập đến độ ổn định trong bảo quản để chỉ lượng hơi nước trong không khí ở một nhiệt độ nhất định. Độ ẩm tương đối thường nhỏ hơn độ ẩm tương đối cần để làm bão hoà không khí và được thể hiện bằng phần trăm của độ ẩm bão hoà.

"Khô" và các biến thể của từ này chỉ trạng thái vật lý mà được đông khô, loại nước hoặc khan, nghĩa là, gần như thiếu chất lỏng. Việc làm khô bao gồm, ví dụ, sấy phun, sấy tầng sôi, đông khô, và làm khô trong chân không.

"Đông khô" hoặc "làm khô lạnh" khi đề cập đến việc tạo ra chế phẩm ở dạng khô bằng cách đông lạnh nhanh và loại nước ở trạng thái đã đông lạnh (đôi khi gọi thăng hoa). Quy trình này có thể diễn ra trong chân không ở áp suất đủ để giữ sản phẩm đông lạnh, tốt hơn là thấp hơn khoảng <2000 mTORR (266,644 Pa).

"Làm khô sơ bộ" hoặc "làm khô lỏng", khi đề cập đến các quy trình được mô tả trong bản mô tả này, chỉ việc làm khô bằng cách loại nước diễn ra từ thời điểm đã đông các phần tử đã đông lạnh đến thời điểm tại đó bắt đầu làm khô thứ cấp. Thông thường, phần lớn việc làm khô sơ bộ diễn ra bằng cách làm bay hơi triệt để, 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 đã đông, tốt hơn là lớn hơn khoảng >2000 mTORR (266,644 Pa).

"Làm khô thứ cấp", khi đề cập đến quy trình được mô tả trong bản mô tả này, dùng để chỉ bước làm khô diễn ra ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ làm đông lạnh chế phẩm và gần nhiệt độ của nguồn nhiệt. Quy trình này có thể diễn ra trong chân không ở áp suất đủ để làm giảm hoạt độ nước của chế phẩm, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng <1000 mTORR (133,322 Pa). Trong quy trình làm chế phẩm khô thông thường, bước làm khô thứ cấp làm giảm hoạt độ nước của chế phẩm đến A_w bằng 0,3 hoặc nhỏ hơn.

"Tạo bột" dùng để chỉ quy trình làm khô vật liệu sinh vật dễ bị hỏng bằng cách đun sôi trong chân không trong các điều kiện trong đó vật liệu sinh vật này giữ lại được hoạt tính hoặc khả năng sống trong khoảng thời gian dài ở nhiệt độ môi trường và nhiệt độ cao hơn. Quy trình cụ thể để tạo thành cấu trúc xốp ổn định cơ học diễn ra theo hai bước; (1) làm khô bột sơ bộ và bằng cách đun sôi trong chân không (2) làm

khô ổn định/thủy tinh hoá, và được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,766,520 cấp cho Bronshtein.

Chế phẩm công thức hoặc chế phẩm "ổn định" là chế phẩm công thức hoặc chế phẩm trong đó vật liệu có hoạt tính sinh học ở trong đó hầu như giữ lại được độ ổn định vật lý, độ ổn định hoá học, và/hoặc hoạt tính sinh học của nó khi bảo quản. Độ ổn định có thể đo được ở các điều kiện nhiệt độ và độ ẩm đã chọn trong khoảng thời gian đã chọn. Phép phân tích xu hướng có thể được sử dụng để đánh giá thời gian bảo quản mong đợi trước khi vật liệu thực sự được bảo quản trong khoảng thời gian đó. Đối với vi khuẩn sống, ví dụ, độ ổn định được xác định dưới dạng thời gian cần để mất 1 log CFU/g chế phẩm khô trong các điều kiện nhiệt độ, độ ẩm và khoảng thời gian đã xác định.

"Khả năng sống" khi đề cập đến vi khuẩn, chỉ khả năng để tạo ra khuẩn lạc (CFU hay đơn vị tạo thành khuẩn lạc) trên môi trường dinh dưỡng thích hợp cho sự sinh trưởng của vi khuẩn. Khả năng sống, khi đề cập đến virus, chỉ khả năng gây nhiễm và sinh sản trong tế bào chủ thích hợp, dẫn đến sự tạo thành vết tan trên lớp phủ tế bào chủ.

Các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế đáp ứng được nhu cầu cung cấp quy trình làm khô hiệu quả về mặt chi phí và có thể mở rộng trên quy mô công nghiệp cho chế phẩm chứa vật liệu có hoạt tính sinh học dễ bị hỏng, như peptit, protein, enzym, hormon, vitamin, carotenoid, khoáng chất, thuốc, chất kháng sinh, chất diệt vi khuẩn, chất diệt nấm, chất diệt cỏ, chất diệt côn trùng, chất diệt tinh trùng, axit nucleic, kháng thể, vaccin, vi khuẩn, virus và/hoặc huyền phù chứa tế bào, có thời gian tồn tại được kéo dài đáng kể ở trạng thái khô.

Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa vật liệu có hoạt tính sinh học và chất tạo nền và chất tạo thủy tinh trong hỗn hợp dung dịch và phương pháp làm khô bao gồm bước làm đông lạnh nhanh chế phẩm này trong nitơ lỏng để tạo thành cấu trúc rắn vô định hình ở dạng giọt nhỏ, sợi, hạt hoặc vi hạt và bước thổi sạch các phần tử đã đông lạnh ở độ chân không cao, sau đó làm ổn định vật liệu có hoạt tính sinh học khi tạo ra thủy tinh đường bằng cách đông khô hoặc làm bay hơi ẩm ở điều kiện áp suất giảm đồng thời cung cấp nhiệt cho chế phẩm.

Phần lớn các trường hợp vi sinh vật bị mất khả năng sống trong quy trình làm khô có thể do sự kết hợp các yếu tố: tạo thành tinh thể đá, áp suất thẩm thấu cao và oxy hoá, lực cắt và việc giải phóng năng lượng trong các bong bóng sủi liên quan đến hiện tượng "sôi" và việc tạo bọt của dung dịch dưới áp suất làm khô thấp và nhiệt độ cao. Sáng chế tránh được ảnh hưởng tiêu cực này và cung cấp chế phẩm và phương pháp làm khô với mức hao hụt nhỏ nhất và bảo vệ được vật liệu có hoạt tính sinh học trong chất tạo nền thuỷ tinh đường trong điều kiện bảo quản thô và các điều kiện sử dụng sau đó.

Chế phẩm theo sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa vật liệu có hoạt tính sinh học, chất tạo nền và chất tạo thuỷ tinh trong dung dịch nhớt. Chế phẩm theo sáng chế được phát hiện thấy có cấu trúc vật lý và chức năng vốn có khác với chế phẩm không nhớt hoặc chế phẩm cô đặc mà được làm khô bằng cách hoặc không bằng cách làm đông lạnh nhanh và thổi sạch. Ví dụ, các chế phẩm trong tình trạng kỹ thuật trước đầu tiên "được tạo bọt" bằng cách đun sôi để hỗ trợ cho việc làm khô một cách hiệu quả. Bước tạo bọt thường làm dung dịch sôi mạnh và trào, điều này là hậu quả không tránh khỏi của việc làm khô ở trạng thái lỏng và kết quả là, chỉ có thể đạt được sức chứa vật liệu của lọ hoặc bình rất thấp (ví dụ xem patent Mỹ số 6,534,087, trong đó độ dày của thành phẩm được tạo bọt nhỏ hơn 2 mm).

Chế phẩm và phương pháp làm khô theo sáng chế loại bỏ việc đun sôi và tạo bọt mạnh của chế phẩm, nhờ đó cho phép nạp nhiều vật liệu hơn trên mỗi diện tích làm khô và, kết quả là, có thể dễ dàng tăng quy mô sản xuất với số lượng lớn vật liệu mà không phải sử dụng bình, khay hoặc thiết bị được thiết kế đặc biệt.

Lợi khuẩn được chỉ ra là đối tượng đặc biệt có lợi nhờ sử dụng chế phẩm và phương pháp làm khô theo sáng chế. Chế phẩm được chuẩn bị theo công thức và phương pháp theo sáng chế bao gồm bước trộn môi trường nuôi cấy lợi khuẩn mới, đông lạnh hoặc khô với ít nhất một chất tạo nền và ít nhất hai chất tạo thuỷ tinh, làm đông lạnh nhanh chế phẩm nhớt trong nitơ lỏng để tạo thành cấu trúc giọt nhỏ, sợi hoặc hạt rắn đông lạnh ở dạng vô định hình. Đối với việc làm khô sơ bộ, áp suất chân không vừa đủ được sử dụng để thổi sạch và làm ổn định cấu trúc cho các phần tử đã đông lạnh và sau đó, đông khô hoặc làm bay hơi các phần tử đã đông lạnh dưới áp suất

chân không giảm và nhiệt độ tăng lên trên nhiệt độ làm đông lạnh chế phẩm. Việc duy trì nhiệt độ của chế phẩm trên nhiệt độ đông lạnh có thể được thực hiện bằng cách dẫn nhiệt ra khỏi chế phẩm, và/hoặc bằng cách làm mất ẩn nhiệt nhờ bay hơi nước. Để hoàn thành quy trình làm khô và làm giảm thêm hoạt độ nước trong chế phẩm, bước làm khô thứ cấp có thể được sử dụng, ở áp suất chân không cao hơn bằng 1000 mTORR (133,322 Pa) và thấp hơn và ở nhiệt độ tăng cao lên đến 70°C, để tạo ra chế phẩm cuối cùng có hoạt độ nước A_w bằng 0,3 hoặc thấp hơn. Chế phẩm này có thể vẫn ổn định ở điều kiện bảo quản ở 40°C và RH=33% trong 30 ngày hoặc lâu hơn, như thể hiện trên Fig.8.

Tạo ra chế phẩm

Các vật liệu, được trộn trong dung dịch với vật liệu có hoạt tính sinh học được ưu tiên để tạo ra chế phẩm bột khô theo sáng chế, chứa ít nhất một chất tạo nền và ít nhất hai chất tạo thủy tinh. Nguyên liệu này, khi được trộn với vật liệu có hoạt tính sinh học được ưu tiên tạo thành hạt, vi hạt, sợi hoặc giọt trong nitơ lỏng và có thể được đông khô một cách hiệu quả hoặc được loại nước ở trạng thái thủy tinh vô định hình theo phương pháp theo sáng chế và để tạo ra số lượng lớn chế phẩm khô ổn định để bảo quản và sử dụng vật liệu có hoạt tính sinh học nêu trên (xem Fig.1A & B về kết quả quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi và hoạt độ nước (A_w) của các chế phẩm khác nhau sau khi làm khô). Chất tạo nền tạo ra độ ổn định cấu trúc cho chế phẩm, tăng cường profin làm khô và/hoặc tạo ra các tác dụng bảo vệ về mặt vật lý và hoá học cho vật liệu có hoạt tính sinh học. Chất tạo nền cũng cung cấp tính nhớt làm đặc cho chế phẩm và kiểm soát các tính chất của chế phẩm trong áp suất chân không và tăng độ bền cấu trúc cho các chế phẩm chế phẩm được làm khô theo sáng chế (xem Fig.1B – các ảnh 4, 4b, 4c về cấu trúc thủy tinh và độ khô của chế phẩm cụ thể này). Chất tạo nền bao gồm hỗn hợp của polysacarit và oligosacarit. Polysacarit được ưu tiên, đặc biệt là đối với sinh vật sống, là các loại gồm tan trong nước, nhờ tính chất đặc trưng của chúng để tạo thành gel nhớt ở nhiệt độ vừa phải. Gôm ở nồng độ nhất định cũng được phát hiện thấy là có tác dụng làm ổn định một cách hiệu quả chế phẩm và hỗ trợ việc hình thành cấu trúc dạng thủy tinh vô định hình và tăng cường profin làm khô trong chân không (xem Fig.1A, các ảnh 3a, 3b, 3c, 4, và Fig.1B - 4c và Fig.6).

Đáng chú ý là khi xem các ảnh trên Fig.1A kết hợp với kết quả nêu trong Bảng 1 dưới đây, đều thấy rằng các mẫu 3b, 3c, 4, 5, và 6 đều được làm khô một cách hiệu quả để tạo ra mức độ xốp nhất định trong cấu trúc thủy tinh vô định hình.

Bảng 1:

Kết quả quan sát bằng mắt thường các chế phẩm khô khác nhau

	1	2	3a	3b	3c	4	5	6
Độ khô	Không khô	Không khô	Không khô	Khô	Khô	Khô	Khô	Khô
Độ xốp	Không	Không	Không	Có	Có	Có	Không	Một phần
Aw	0,847	0,923	0,916	0,216	0,183	0,376	0,171	0,112
Cấu trúc thủy tinh	Không	Không	Không	Một phần	Một phần	Có	Một phần	Một phần

Chất tạo thủy tinh theo sáng chế có thể bao gồm các đường khác nhau, đường không khử, rượu đường, axit amin, protein, protein đã thủy phân và peptit. Tốt hơn, nếu hợp chất tạo thủy tinh là hợp chất không kết tinh và/hoặc làm mất tính ổn định của vật liệu có hoạt tính sinh học trong chế phẩm ở nhiệt độ đông lạnh (ví dụ, thấp hơn -20°C). Ví dụ, vật liệu có hoạt tính sinh học có thể được kết hợp vật lý trong cấu trúc thủy tinh đường vô định hình như sucroza hoặc trehaloza để tăng khả năng giữ lại cấu trúc phân tử trong suốt quy trình làm khô và chuyển độ cứng cấu trúc sang cho chất tạo nền vô định hình ở trạng thái khô. Chất tạo thủy tinh sẽ thay thế nước hydrat bị mất trong quá trình làm khô, tránh gây hư hỏng cho màng tế bào và làm biến tính enzym (xem tài liệu Crowe et al, 1998). Các chức năng khác của chất tạo thủy tinh có thể bao gồm chức năng bảo vệ vật liệu có hoạt tính sinh học khỏi tránh tiếp xúc với ánh sáng, oxy, chất oxy hoá và hơi ẩm gây hư hỏng. Hầu hết chất tạo thủy tinh phải hoà tan dễ dàng trong dung dịch ở lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 phần trăm theo khối lượng đến khoảng 80 phần trăm theo khối lượng. Cũng có lợi khi sử dụng hai hoặc nhiều chất tạo thủy tinh khác nhau để ức chế sự tạo thành tinh thể và tăng cường độ ổn định cho chế phẩm chứa vật liệu có hoạt tính sinh học được làm khô trong điều kiện bảo quản trong khoảng thời gian dài (xem hiệu quả của hỗn hợp đường và protein trên Fig.1A - các ảnh 4, 5 và 6).

Chế phẩm được làm khô sơ bộ bao gồm lượng đáng kể chất rắn tổng số (các thành phần trừ đi dung môi, như nước). Phần chính của chất rắn tổng số bao gồm vật liệu có hoạt tính sinh học, chất tạo nền và chất tạo thủy tinh. Ví dụ, vật liệu có hoạt

tính sinh học có mặt trong chế phẩm với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến 60 phần trăm theo khối lượng, chất tạo nền từ khoảng 1 đến 20 phần trăm theo khối lượng, và chất tạo thuỷ tinh từ khoảng 5 đến 80 phần trăm theo khối lượng. Trong một ví dụ khác, chất tạo nền có thể có mặt trong chế phẩm ở lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 đến 10 phần trăm theo khối lượng, và chất tạo thuỷ tinh từ khoảng 10 đến 50 phần trăm theo khối lượng. Tốt hơn, nếu chế phẩm ươm cần có hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ khoảng 5% đến 80%; tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30% và 60%. Độ nhớt của chế phẩm theo sáng chế thường lớn hơn 1000 centipoase (cP) (1 Pa.giây); tốt hơn là lớn hơn 5000 cP (5 Pa.giây); và tốt nhất là lớn hơn 10000 cP (10 Pa.giây). Tốt hơn, nếu tỷ trọng của chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,2 g/ml.

Phương pháp tạo ra chế phẩm khô ổn định

Phương pháp tạo ra chế phẩm khô ổn định chứa vật liệu có hoạt tính sinh học bao gồm: (1) tạo ra chế phẩm bằng cách trộn vật liệu có hoạt tính sinh học với chất tạo nền và chất tạo thuỷ tinh trong dung dịch, (2) làm đông lạnh nhanh chế phẩm để tạo thành các phần tử rắn đông lạnh, (3) đưa các phần tử đã đông lạnh vào môi trường có áp suất chân không cao trong thời gian ngắn để thổi sạch các hạt và làm ổn định cấu trúc của chúng, (4) loại bỏ nước bằng cách đông khô và/hoặc làm bay hơi hơi ẩm trong điều kiện áp suất giảm đồng thời cung cấp nhiệt cho chế phẩm ở nhiệt độ trên nhiệt độ chế phẩm đông lạnh, tốt hơn là cao hơn -10°C , (5) làm giảm thêm hoạt độ nước của chế phẩm đến A_w thấp hơn 0,3 trong môi trường chân không hoàn toàn và nhiệt độ tăng cao.

Theo một phương án, ví dụ, chế phẩm theo sáng chế chứa vật liệu có hoạt tính sinh học được tạo chế phẩm theo công thức trong dung dịch hoặc huyền phù chứa chất tạo nền và chất tạo thuỷ tinh. Chất tạo nền và/hoặc chất tạo thuỷ tinh với nồng độ cao được hoà tan và sát trùng trong dung dịch trong nước nóng kèm theo khuấy trước khi làm nguội và trộn với vật liệu có hoạt tính sinh học. Vật liệu có hoạt tính sinh học, như virus hoặc vi khuẩn đã nuôi cấy, được cô đặc và phân lập ra khỏi môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm hoặc lọc trước khi tái tạo huyền phù trong chế phẩm.

Theo một phương án theo sáng chế, tổng lượng nước trong chế phẩm được cung cấp trong chất lỏng chứa sinh vật sống cô đặc và trong huyền phù chứa sinh vật

sống được duy trì ở nhiệt độ cao hơn một chút so với nhiệt độ trong phòng. Các thành phần khô được trộn với nhau và sau đó, bổ sung từ từ vào huyền phù ấm (từ 25°C đến 40°C) chứa sinh vật sống. Chế phẩm huyền phù được khuấy nhẹ trong máy trộn không liên tục cho đến khi tất cả các thành phần được phân tán hoàn toàn và thu được huyền phù đặc đồng nhất.

Sau đó, dung dịch nhớt được làm đông lạnh nhanh bằng cách phun sương, chảy nhỏ giọt hoặc ép đùn trong bể nitơ lỏng để tạo thành giọt, sợi hoặc hạt rắn nhỏ. Các phần tử rắn đông lạnh có thể được bảo quản trong thiết bị làm đông lạnh sâu có nhiệt độ nằm trong khoảng từ -30°C đến -80°C cho đến khi khô hoặc ngay sau đó được đặt lên khay và đông khô hoặc làm khô theo phương pháp theo sáng chế. Các phần tử rắn đông lạnh được thổi sạch trong thời gian ngắn, thường từ 1 đến 20 phút, ở độ chân không vừa đủ (ví dụ, dưới <2000 mTORR (266,644 Pa). Nhìn chung, các hạt rắn vẫn ở dạng đông lạnh ở nhiệt độ thấp hơn -20°C trong bước thổi sạch. Sau bước thổi sạch ban đầu, áp suất chân không được tăng lên nằm trong khoảng từ 2000 mTORR (266,644 Pa) đến 10.000 mTORR (1333,220 Pa) và nhiệt có thể được cung cấp để tăng nhanh nhiệt độ của chế phẩm đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5°C và +5°C và các hạt bắt đầu rã đông. Ngay khi nhiệt độ của chế phẩm đạt đến nhiệt độ mong muốn, lượng nhiệt được điều chỉnh để duy trì nhiệt độ đó và tiến hành bước làm khô sơ bộ. Ở bước này, chế phẩm được rã đông và quá trình bay hơi tăng tốc xảy ra mà không cần đun sôi hoặc tạo bọt.

Phương pháp thông thường trong tình trạng kỹ thuật này bao gồm việc tạo bọt mạnh và/hoặc làm bắn tóe và sôi mạnh mà có thể gây hư hỏng cho các vật liệu sinh học nhạy cảm và khó tăng quy mô để áp dụng trong công nghiệp với sức chứa cao (ví dụ xem patent Mỹ số 6,534,087, ở đây sử dụng áp suất chân không để làm sôi và tạo bọt mạnh), trong khi đó các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế loại bỏ được bước đun sôi hoặc tạo bọt quá mức đối với chế phẩm trong khi vẫn đạt được tốc độ làm khô nhanh hơn đáng kể và cho phép chế phẩm có sức chứa cao. Ngoài ra, việc loại bỏ hoàn toàn khí và có hiệu quả đối với huyền phù đặc lỏng nhớt rất là khó và có thể cần một khoảng thời gian dài. Các nhược điểm này đều được giải quyết trong sáng chế bằng cách sử dụng chế phẩm thích hợp cho phép làm khô sơ bộ một cách hiệu quả chế phẩm dạng lỏng để tạo thành chế phẩm dạng thủy tinh vô định hình mà không cần đun sôi và tạo bọt quá mức. Đáng ngạc nhiên và quan trọng là điều này chủ yếu đạt được

bằng cách làm đông lạnh nhanh chế phẩm thích hợp và thông qua việc đưa vào bước thối sa trong thời gian ngắn trước khi bắt đầu bước làm khô sơ bộ ở dạng lỏng. Việc đưa các phần tử rắn đã đông lạnh lên khay, trái ngược với huyền phù đặc hoặc sirô nhớt, cho phép sức chứa trên mỗi diện tích làm khô trên khay cao hơn nhiều so với kết quả đạt được bằng các giải pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Sau khi kết thúc giai đoạn làm khô sơ bộ ở dạng lỏng, chế phẩm dạng thủy tinh vô định hình đã làm ổn định được giữ ở nhiệt độ làm khô thứ cấp cao (nằm trong khoảng từ 20°C đến 70°C) và áp suất chân không nhỏ hơn 1000 mTORR (133,322 Pa) để tiếp tục làm giảm thêm hoạt độ nước của chế phẩm trong thời gian rất ngắn.

Một phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra chế phẩm hydrogel dùng để bảo quản vật liệu có hoạt tính sinh học. Ví dụ, chế phẩm chứa vật liệu có hoạt tính sinh học và chất tạo nền và chất tạo thủy tinh được trộn trong dung dịch và liên kết ngang để tạo thành các phần tử hydrogel đặc bằng cách phun sương hoặc ép đùn trong bể chứa ion kim loại hóa trị hai hoặc bằng cách bổ sung ion kim loại hóa trị hai trực tiếp vào huyền phù đặc và cắt tấm hydrogel đã làm cứng thành sợi hoặc miếng nhỏ. Các phần tử đã hydrogel hoá sau đó được làm khô theo phương pháp làm khô theo sáng chế như được mô tả ở trên.

Theo một phương án cụ thể theo sáng chế, ví dụ, chế phẩm chứa lợi khuẩn sống trong dung dịch của 1-4% natri alginat và 10-40% trehaloza. Protein và cụ thể là protein đã thủy phân, như casein, nước sữa, đậu Hà Lan, nước tương hoặc hạt bông được bổ sung vào chế phẩm ở nồng độ 5-10% để tăng cường quá trình làm khô và việc tạo ra cấu trúc ổn định dạng thủy tinh vô định hình cho chế phẩm (xem Fig.1A, các ảnh 4, 5 và 6). Môi trường nuôi cấy lợi khuẩn có thể là môi trường tươi, được đông lạnh hoặc được làm khô ở dạng bột khô (xem Fig.2 về số đếm CFU của lợi khuẩn trong chế phẩm khô trên các dạng môi trường nuôi cấy khác nhau). Dung dịch được trộn ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ trong phòng một chút (thường nằm trong khoảng từ 25°C đến 37°C) đến khi tất cả các thành phần được hòa tan hoàn toàn. Chế phẩm huyền phù đặc được phun sương, ép đùn hoặc chảy nhỏ giọt trong nitor lỏng để tạo ra các giọt hoặc hạt nhỏ, mà sau khi lấy ra khỏi nitor lỏng, đóng vào túi và có thể được bảo quản trong thiết bị làm đông lạnh sâu ở -80°C cho đến khi khô.

Phương pháp làm khô lợi khuẩn sống thông thường bao gồm các bước; dàn các hạt rắn đông lạnh rắn trên khay thành lớp đồng nhất ở sức chứa nằm trong khoảng từ 100-1000 g/feet vuông ($0,3048 \text{ m}^2$) và ngay sau đó khay được đặt vào máy sấy đông lạnh. Áp suất chân không sau đó được áp dụng ở khoảng 1000 mTOR và tùy thuộc vào kích thước của thiết bị làm khô lạnh và loại nguồn nhiệt, nhiệt độ bảo quản được điều chỉnh đến $+20^\circ\text{C}$ hoặc đến nhiệt độ đủ để duy trì các phần tử ở khoảng -20°C . Các hạt rắn đông lạnh được thổi sạch trong khoảng 5-30 phút và độ chân không được điều chỉnh để nằm trong khoảng từ 2000 mTORR ($266,644 \text{ Pa}$) đến 10000 mTORR ($1333,220 \text{ Pa}$) và tăng mức truyền nhiệt để nâng nhiệt độ của chế phẩm đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5°C đến $+5^\circ\text{C}$. Các điều kiện nhiệt độ và áp suất chân không này được duy trì trong bước làm khô sơ bộ ở dạng lỏng mà có thể kéo dài từ vài giờ đến 24 giờ tùy thuộc vào sức chứa của khay, tốt hơn là từ khoảng 3 đến 10 giờ. Tại một số thời điểm trong quá trình làm khô sơ bộ, tốc độ bay hơi của dung môi thấp và nhiệt độ của chế phẩm bắt đầu tăng do buồng làm khô được cung cấp nhiệt quá mức. Thời điểm này là thời điểm kết thúc bước làm khô sơ bộ. Do dung môi thoát ra khỏi chế phẩm nên chất tạo thủy tinh trong dung dịch bị cô lại và đặc hơn đến khi nó ngừng chảy như chất lỏng và tạo thành cấu trúc dạng thủy tinh vô định hình và/hoặc ổn định.

Bước làm khô thứ cấp diễn ra sau đó ở môi trường chân không hoàn toàn và nhiệt độ của chế phẩm nằm trong khoảng từ 30°C đến 50°C . Mục đích của bước làm khô thứ cấp là để loại bỏ lượng ẩm ở dạng liên kết hoặc bị kẹt còn lại và tạo ra chế phẩm ổn định khi bảo quản trong khoảng thời gian dài ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Bước làm khô thứ cấp có thể kéo dài vài giờ và thời điểm kết thúc nó là khi chế phẩm khô hoàn toàn và hoạt độ nước A_w của nó thấp hơn 0,3.

Phương pháp làm khô theo sáng chế tạo ra vật liệu có hoạt tính sinh học được bao trong chất tạo nên dạng thủy tinh vô định hình, theo đó tránh được hiện tượng mở nếp gấp của protein và làm chậm đáng kể quá trình tương tác phân tử hoặc tính phản ứng chéo, do khả năng di động của hợp chất và các phân tử khác trong chế phẩm dạng thủy tinh vô định hình bị giảm mạnh. Miễn là chất rắn vô định hình ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ chuyển pha thủy tinh của nó và lượng ẩm còn sót lại vẫn tương đối thấp (tức là, thấp hơn $A_w = 0,3$) thì vật liệu có hoạt tính sinh học vẫn tương đối ổn định (xem Fig.8). Cần lưu ý rằng việc đạt được trạng thái thủy tinh không phải là điều kiện

đảm bảo cho việc ổn định trong thời gian dài vì một số thành phần có hoạt tính sinh học có thể tồn tại tốt hơn ở trạng thái tinh thể.

Tạo ra bột khô

Chế phẩm đã làm khô có thể được sử dụng nguyên dạng, được cắt thành hình dạng và kích thước mong muốn, hoặc được nghiền nát và nghiền nhỏ thành bột chảy tự do, giúp cho các bước xử lý tiếp dễ dàng hơn như kết tụ khô hoặc ướt, tạo hạt, tạo viên nén, dập, tạo viên lạng hoặc được trộn trong thực phẩm hoặc thức ăn gia súc hoặc bước xử lý phân phối bất kỳ khác. Các quy trình nghiền nát, nghiền nhỏ, xay nhỏ hoặc tán nhỏ là đã được biết rõ trong lĩnh vực. Ví dụ, thiết bị nghiền búa, thiết bị nghiền không khí, thiết bị nghiền va đập, thiết bị nghiền thủy lực, thiết bị nghiền vít, thiết bị nghiền Wiley, hoặc thiết bị nghiền tương tự có thể được sử dụng. Cỡ hạt được ưu tiên đối với các phần tử được nghiền nhỏ hơn khoảng 1000 μm và tốt hơn là nhỏ hơn 500 μm .

Chế phẩm và phương pháp được mô tả trong sáng chế giữ lại được hoạt tính sinh học của vật liệu có hoạt tính sinh học được kết hợp vào. Ví dụ, chế phẩm được đánh giá độ ổn định bằng cách tăng nhiệt độ của chúng lên cao (ví dụ, 40°C) và ở độ ẩm cao (ví dụ, độ ẩm tương đối bằng 33%) và xác định hoạt tính sinh học của chế phẩm. Ví dụ như đối với lợi khuẩn sống, kết quả của các nghiên cứu này chứng tỏ rằng vi khuẩn được đưa vào các chế phẩm này ổn định trong ít nhất 20 ngày (xem Fig.8). Độ ổn định được định nghĩa là thời gian có thể mất đi một log CFU/g. Các chế phẩm này ổn định ngay cả khi vật liệu có hoạt tính sinh học được sử dụng với nồng độ cao. Do đó, các chế phẩm có ưu điểm ở chỗ chúng có thể được vận chuyển và bảo quản ở nhiệt độ trong phòng hoặc ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ trong phòng trong một khoảng thời gian dài.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây nhằm minh họa sáng chế chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1

Tạo ra chế phẩm khô ổn định chứa lợi khuẩn

Chế phẩm cơ sở

75 g trehaloza (Cargill Minneapolis, MN) và 22 g casein được thủy phân triệt để (Marcor, Carlstadt, NJ) được trộn đều với 3 g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) ở dạng khô. Dịch cô tươi của *Lactobacillus acidophilus* (100 ml chứa ít nhất 10% chất rắn, thu trực tiếp từ quá trình lên men) được đưa vào máy trộn và được giữ ở 35°C. Hỗn hợp khô của gôm, đường và protein đã thủy phân được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy lợi khuẩn và tiến hành trộn ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 10 phút. Huyền phù đặc nhớt sau đó được chuyển sang bình có đáy đục lỗ và được phép chảy nhỏ giọt vào bể chứa nitơ. Các hạt sau khi lấy ra khỏi nitơ lỏng được mang đi làm khô ngay.

Làm khô chế phẩm cơ sở ở dạng các hạt đã đông lạnh

Các hạt đã đông lạnh được dàn đều trên các khay có sức chứa 100 g/feet vuông (0,3048 m²) và ngay sau đó được đặt lên giá đỡ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Áp suất chân không sau đó được áp dụng ở 1000 mTORR (133,322 Pa) và các hạt rắn đông lạnh được thổi sạch trong thời gian 10 phút. Độ chân không sau đó được điều chỉnh đến 2700 mTORR (359,969 Pa) và nhiệt độ của giá đỡ tăng lên đến +30°C. Các điều kiện nhiệt độ và áp suất chân không này được duy trì trong thời gian 3 giờ. Bước làm khô thứ cấp sau đó được thực hiện ở môi trường chân không hoàn toàn (150-200 mTORR) (19,998 – 26,664 Pa) và nhiệt độ của giá đỡ tăng lên đến 30°C trong thời gian 2 giờ nữa. Chế phẩm được làm khô hoàn toàn và hoạt độ nước của nó được đo bằng thiết bị Hygropalm Awl (Rotonic Instrument Corp., Huntington, NY.) ở $A_w = 0,23$.

Ví dụ 2

Chế phẩm khô ổn định chứa lợi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* LGG.

Lactobacillus rhamnosus LGG (500 g dịch cô đông lạnh mua trên thị trường) được rã đông ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị khuấy hành tinh hai áo nhiệt (DPM, lqt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA.). Hai chất tạo thủy tinh; trehaloza (387 g, Cargill Minneapolis, MN) và casein đã thủy phân triệt để (83 g, Marcor, Carlstadt, NJ) được trộn đều ở dạng khô với hai chất tạo nền; natri alginat (15 g, ISP Corp., Wayne, NJ) và Inulin dùng ngay (25 g, Cargill Minneapolis, MN). Hỗn hợp khô này được bổ sung từ từ vào lợi khuẩn đã rã đông và thực hiện trộn ở tốc độ khuấy 40 vòng/phút và 37°C trong thời gian 10 phút. Độ nhớt của huyền phù đặc được điều chỉnh đến 12000

Cp bằng cách bổ sung 50-200 ml nước. Huyền phù đặc sau đó được chuyển sang bình có đáy đục lỗ và để chảy nhỏ giọt vào bình chứa nitơ lỏng. Sau đó, hạt được lấy ra khỏi nitơ lỏng, đặt trong túi nhôm kín và được bảo quản trong thiết bị làm đông lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C trong vài tuần.

Để làm khô, các hạt đã đông lạnh được dàn đều trên các khay có sức chứa nằm trong khoảng từ 100 lên đến 500 g/feet vuông ($0,3048\text{ m}^2$) và các khay này được đặt trên giá để trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Áp suất chân không được cung cấp ở 1000 mTorr (133,322 Pa) và nhiệt độ của giá để được điều chỉnh đến $+20^{\circ}\text{C}$. Các hạt rắn đông lạnh được thổi sạch trong khoảng thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 30 phút. Sau bước thổi sạch là bước làm khô sơ bộ sau khi điều chỉnh áp suất chân không về 2700 mTORR (359,969 Pa) và nhiệt độ của giá được tăng lên đến $+30^{\circ}\text{C}$. Các điều kiện nhiệt độ và áp suất chân không nêu trên được duy trì trong 12 giờ. Bước làm khô thứ cấp sau đó được thực hiện ở môi trường chân không hoàn toàn (150-200 mTORR) (19,998 – 26,664 Pa) và nhiệt độ của giá để được giữ ở 30°C trong 4 giờ nữa.

Chế phẩm được làm khô hoàn toàn và hoạt độ nước A_w của nó đo được bằng 0,23. Fig.6 thể hiện profin làm khô của chế phẩm chứa lợi khuẩn.

Việc mất khả năng sống sau khi đông lạnh huyền phù đặc ở các nhiệt độ khác nhau ($+4^{\circ}\text{C}$, -80°C và -180°C) và sau khi quy trình làm khô bao gồm bước chuẩn bị các các phần tử đông lạnh, và làm khô trong thiết bị đông khô được thể hiện trên Fig.3, 4 và 7. Tỷ lệ mất khả năng sống sót của vi khuẩn trong toàn bộ quy trình nhìn chung thấp hơn $<1\text{ log}$, tùy thuộc vào loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn (môi trường nuôi cấy đông lạnh hoặc khô) và nhiệt độ đông lạnh của huyền phù đặc nhất. Các kết quả cho thấy việc làm đông lạnh nhanh lợi khuẩn trong nitơ lỏng (-180°C) là quy trình ít gây hư hỏng hơn so với việc đông lạnh ở -80°C .

Fig.5 & 8 thể hiện tác động của các khoảng thời gian thổi sạch khác nhau từ 0 phút (không thổi sạch) đến 30 phút đến số đếm lợi khuẩn ban đầu trong chế phẩm khô và đến độ ổn định trong bảo quản trong điều kiện bảo quản tăng cường với nhiệt độ là 40°C và độ ẩm tương đối là 33%. Các kết quả cho thấy rằng thời gian thổi sạch lâu hơn thường cải thiện số lượng lợi khuẩn đếm được trong chế phẩm khô nhưng không ảnh hưởng đến độ ổn định bảo quản của chế phẩm chứa lợi khuẩn.

Ví dụ 3

Trehaloza (752 g, Cargill Minneapolis, MN), protein đậu Hà Lan đã thủy phân triệt để (167g, Marcor, Carlstadt, NJ), natri alginat (30 g, ISP Corp., Wayne, NJ) và Inulin dùng ngay (50 g, Cargill Minneapolis, MN) được trộn đều ở dạng khô. Hỗn hợp khô này được bổ sung từ từ vào 1000 ml nước nóng đã khử ion ở 80°C trong thiết bị khuấy hành tinh hai áo nhiệt (DPM, lqt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA,) và tiến hành trộn ở tốc độ 40 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Nhiệt độ của hỗn hợp được giảm xuống 37°C và 100 g bột khô *Lactobacillus rhamnosus* LGG mua được trên thị trường được bổ sung từ từ vào và tiếp tục trộn trong 20 phút. Huyền phù đặc sau đó được ép đùn qua vòi kim 2mm vào bể chứa nitơ lỏng. Các sợi/hạt sau khi lấy ra khỏi nitơ lỏng được đưa vào túi nhôm kín và được bảo quản trong thiết bị làm đông lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C trong vài tuần. Để làm khô, các sợi/các phần tử đông lạnh được dàn đều trên các khay có sức chứa nằm trong khoảng từ 100 đến 500 g/feet vuông (0,3048 m²) và các khay này được đặt trên các giá đỡ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) và làm khô như được mô tả trong Ví dụ 2. Tất cả các chế phẩm đều được giữ nguyên trong khay và không quan sát thấy có hiện tượng bắn toé hoặc tạo bọt ở tất cả các mức độ chứa. Chế phẩm được làm khô hoàn toàn ngay cả ở sức chứa cao hơn và hoạt độ nước Aw đo được ở 0,26 và thấp hơn ở tất cả các mẫu.

Ví dụ 4

Tạo ra chế phẩm hydrogel chứa lợi khuẩn *Bifidobacterium lactis* (Bbl2):

Huyền phù cô đặc chứa lợi khuẩn *Bifidobacterium lactis* (Bbl2) được tạo ra theo Ví dụ 1. Bổ sung 0,5 g canxi phosphat dibazơ vào chế phẩm cơ sở, sau đó là 0,5 g gluconolacton. Huyền phù đặc được để hoá rắn ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ nữa để tạo thành hydrogel rắn. Gel đặc được cắt thành sợi mỏng và dài, bằng cách sử dụng máy cắt/máy xé mua được thị trường. Các sợi hydrogel mỏng được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được đưa lên khay có sức chứa 700g/feet vuông (0,3048 m²) và được đặt vào trong máy sấy đông lạnh để làm khô như được mô tả trong Ví dụ 2. Hoạt độ nước (Aw) của chế phẩm là 0,05 (được đo bằng thiết bị HygroPalm Awl, R tonic Huntington, NY). Chế phẩm khô còn được nghiền thành bột mịn bằng cách sử dụng thiết bị nghiền búa tiêu chuẩn và sàng qua sàng cỡ 50-250 micron.

Ví dụ 5

Chế phẩm không chứa chất gây dị ứng và chứa lợi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*

Trehaloza (752 g, Cargill Minneapolis, MN), protein đậu Hà Lan đã thủy phân triệt để (167g, Marcor, Carlstadt, NJ), natri alginat (30 g, ISP Corp., Wayne, NJ) và Inulin dùng ngay (50 g, Cargill Minneapolis, MN) được trộn đều ở dạng khô. Hỗn hợp khô này được khử trùng bằng cách bổ sung từ từ vào 1000 ml nước nóng đã khử ion ở nhiệt độ 80°C trong thiết bị khuấy hành tinh hai áo nhiệt (DPM, Iqt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA,) và tiến hành trộn ở tốc độ 40 vòng/phút trong thời gian 10 phút cho đến khi tạo thành huyền phù đặc trơn và trong suốt. Nhiệt độ của hỗn hợp được giảm xuống 37°C và 1000 g các các phần tử đông lạnh chứa *Lactobacillus acidophilus* mua được trên thị trường được bổ sung từ từ vào và tiếp tục trộn trong thời gian 10 phút. Huyền phù đặc sau đó được ép đùn qua vòi kim 2 mm vào bể chứa nitơ lỏng. Các sợi/hạt sau khi lấy ra khỏi nitơ lỏng được đưa vào túi nhôm kín và được bảo quản trong thiết bị làm đông lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C trong vài tuần. Để làm khô, các sợi/các phần tử đông lạnh được dàn đều trên các khay có sức chứa 1000 g/feet vuông (0,3048 m²) và các khay này được đặt trên các giá đỡ trong máy sấy đông lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) và được làm khô như được mô tả trong Ví dụ 2. Số đếm CFU ban đầu đối với lợi khuẩn trong chế phẩm khô là 10,53 log/g, và tỷ lệ lợi khuẩn mất khả năng sống sau 42 ngày bảo quản trong điều kiện bảo quản được tăng ở nhiệt độ 40°C và độ ẩm tương đối 33% là 0,69 log CFU/g.

Ví dụ 6

Thực phẩm bổ sung dùng cho nhũ nhi chứa chế phẩm khô theo sáng chế:

Chế phẩm khô ổn định chứa *Lactobacillus GG* (Valio Corp, Finland) được tạo ra theo Ví dụ 2, sau đó chia theo kích thước hạt thành hai nhóm bằng cách sàng (trên 50 µm và thấp hơn 150 µm). Thực phẩm bổ sung dùng cho nhũ nhi được tạo ra bằng cách trộn 99,9 g Nutramigen (Mead Johnson; Evansville, IL) với 0,1 g các phần tử của chế phẩm khô có khoảng kích thước nằm trong khoảng từ 50 µm đến 150 µm). Thành phẩm chứa khoảng 10 cfu *Lactobacillus GG* đối với mỗi 100 g thực phẩm bổ sung dùng cho nhũ nhi.

Ví dụ 7

Thực phẩm bổ sung lợi khuẩn chứa chế phẩm khô ổn định theo sáng chế:

Chế phẩm khô ổn định chứa *Lactobacillus acidophilus* được tạo ra theo công thức ở dạng liều dùng qua đường miệng, như viên nén, viên nén bao, hoặc viên nang. Viên nén hương cam chứa 99,9 g chất nén (dextroza) và 0,1 g các phần tử của chế phẩm khô có khoảng kích thước nằm trong khoảng từ 50 µm đến 150 µm được tạo ra bằng cách dập trực tiếp trên máy dập viên quay tròn bằng cách sử dụng chày tạo ra hốc lõm tròn 1/2" theo tiêu chuẩn. Thành phẩm chứa khoảng 10 cfu/liều đơn vị. Độ cứng của viên nén nằm trong khoảng từ 8 đến 10 kp và thời gian phân rã xấp xỉ 20 giây. Viên nén đã dập được đóng gói trong các chai 180 cc HDPE với 100 viên nén trong mỗi chai và được cho tiếp xúc ở nhiệt độ/độ ẩm được kiểm soát ở 40°C/độ ẩm tương đối 33%. Sản phẩm được đánh giá độ ổn định vi sinh hằng tháng trong khoảng thời gian 12 tháng hoặc đến khi quan sát thấy mức giảm số đếm thử nghiệm là thấp hơn 1×10^6 /liều đơn vị.

Ví dụ 8

Đồ uống chức năng chứa chế phẩm khô ổn định theo sáng chế:

Hỗn hợp khô chứa (% theo khối lượng) 71% sucroza, 14% maltodextrin, 10% inulin, 2% dextroza, 1% axit xitric khan, 0,3% gôm acacia, 0,3% chất tạo hương vị, 0,3% tricanxi phosphat và 0,1% các phần tử của chế phẩm khô chứa lợi khuẩn (*L. acidophilus*) trong khoảng kích thước nằm trong khoảng từ 50 µm đến 250 µm được tạo ra. Thành phẩm chứa khoảng 10^9 cfu/liều đơn vị (30g hỗn hợp khô). Sản phẩm được đóng gói trong túi nhôm nhỏ (30g liều đơn vị/túi) để uống bằng cách khuấy trong 340 ml nước. Độ ổn định của lợi khuẩn trong hỗn hợp đồ uống khô được đánh giá bằng thử nghiệm độ ổn định vi sinh hằng tháng trong 12 tháng hoặc đến khi quan sát thấy mức giảm số đếm của lợi khuẩn trong thử nghiệm thấp hơn 1×10^7 /liều đơn vị.

Ví dụ 9

Sản xuất thực phẩm chứa lợi khuẩn dùng cho vật nuôi:

Thực phẩm dùng cho vật nuôi ở dạng viên lắmg mua được trên thị trường dùng cho chó được làm khô trong lò đối lưu đến khi có hoạt độ nước bằng 0,1, và sau đó được phủ bằng chế phẩm khô chứa lợi khuẩn được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 3. Các viên lắmg khô này được phun khoảng 5% lớp chắn ẩm dựa trên chất béo (hỗn hợp gồm 40% mỡ gà, 40% bơ cacao và 20% sáp ong), được trộn trong máy trộn trống với bột chế phẩm khô (thường chiếm 0,1-0,5% tổng thực phẩm dùng cho vật nuôi mà

cung cấp liều lượng là 10^8 CFU/g), và cuối cùng được phun thêm một lớp chắn ẩm bổ sung dựa trên chất béo. Tổng lượng lớp phủ vào khoảng 15% (của thực phẩm dùng cho vật nuôi). Thời gian phủ là khoảng 30 phút.

Ví dụ 10

Sản xuất thức ăn cho cá chứa một số vi sinh vật có lợi cho sức khỏe:

Thức ăn dạng viên lặn dùng cho cá theo sáng chế được sản xuất từ hỗn hợp của một vài lợi khuẩn. Chế phẩm khô chứa lợi khuẩn ổn định thường chứa hỗn hợp của *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* và *Bifidobacterium lactis* được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 1. Nguyên liệu ban đầu mua được trên thị trường dùng cho cá hồi (Zeigler Bros., Gardners, PA) trước hết được làm khô trong lò đối lưu đến khi có hoạt độ nước bằng 0,1, và sau đó được phủ chế phẩm chứa lợi khuẩn trong máy trộn trống. Các viên lặn này (1000 g) trước hết được phun lớp chắn ẩm dựa trên chất béo với lượng chiếm khoảng 5% khối lượng (hỗn hợp của 40% dầu cá, 40% bơ cacao và 20% sáp ong), sau đó được trộn với 1 g chế phẩm khô ổn định chứa lợi khuẩn ổn định (để thu được liều lượng là 10^7 cfu/g thức ăn), và cuối cùng được phun thêm một lớp chắn ẩm bổ sung dựa trên chất béo. Tổng lượng của lớp phủ vào khoảng 10% (của thức ăn cho cá).

Ví dụ 11

Bột khô ổn định chứa enzym:

Chế phẩm hydrogel chứa 40 phần trăm khối lượng của Savinase (Novozymes, Denmark) được tạo ra bằng cách trộn 600 g chế phẩm được mô tả trong Ví dụ 4 và 400 g savinaza trong 1000 g dung dịch trong nước. Chế phẩm hydrogel đã nghiền nhỏ được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và làm khô trong lò chân không ở nhiệt độ làm khô chế phẩm là 50°C . Để xác định sức chứa và độ ổn định trong bảo quản của chế phẩm đã làm khô: mẫu khô được cân chính xác (<100 mg) trong ống vi ly tâm. 200 μl dimethyl sulfoxide (DMSO) được bổ sung vào. Chế phẩm được hòa tan trong chất đậm DMSO bằng cách trộn xoáy. Bổ sung vào mẫu này 0,8 ml dung dịch chứa NaOH 0,05N, 0,5% SDS và axit citric 0,075M (muối trinitrat). Các ống được siêu âm trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 45°C , sau đó ly tâm nhanh ở tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Chuyển các phân ước của dung dịch DMSO/NaOH/SDS/xitrat trong suốt vào các lỗ của vi đĩa và phân tích hàm lượng protein bằng cách sử dụng phương

pháp thử nghiệm Bradford. Độ ổn định trong bảo quản của chế phẩm enzym cao hơn đáng kể so với độ ổn định của chế phẩm khô không chứa enzym theo sáng chế.

Ví dụ 12

Bột khô ổn định chứa vitamin A:

Chế phẩm chứa 30 phần trăm theo khối lượng của vitamin A được tạo ra bằng cách trộn 320 g Inulin dùng ngay, 320 g maltodextrin DE-1 (Tate&Lyle, London, UK), 50 g natri carboxymethylxeluloza (Ashland Aqualon Functional Ingredients, Wilmington, DE), 10 g natri ascorbat và 300 g tinh thể vitamin A (BASF Corp., Florham Park, N.J) trong 1000 g nước. Chế phẩm ướt này được sấy phun trong thiết bị sấy phun Mobile-Minor (GEA Process Engineering Inc., Columbia MD) ở nhiệt độ cửa vào và ra lần lượt là 180°C và 80°C hoặc đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng, sau đó dàn trên các khay có sức chứa 1000 g/feet vuông (0,3048 m²) và làm khô như được mô tả trong Ví dụ 2. Chế phẩm chứa vitamin A này ổn định (>80%) ở 40°C và độ ẩm tương đối 75% trong 3 tháng.

Ví dụ 13

Tạo ra caroten trong chế phẩm bảo vệ có độ sinh khả dụng được tăng cường:

Chế phẩm có tác dụng bảo vệ và tăng cường độ sinh khả dụng của caroten sẽ bị các thành phần khác có mặt trong thức ăn oxy hoá trong quá trình bảo quản hoặc sau khi cho sinh vật ăn được tạo ra theo công thức phối chế và phương pháp theo sáng chế. Công thức phối chế bao gồm 6 g chitosan tan trong nước (LSK BioPartners, Inc. Salt Lake City, Utah) được hoà tan trong 200 g nước. Bổ sung vào dung dịch này 90 g astaxanthin tự nhiên (Naturose™, Cyanotech Corp., Kailua-Kona, HI) và huyền phù đặc này được phun sương hoặc ép đùn vào bể chứa 5% natri tripoliphosphat. Các vi hạt hoặc sợi đã tạo hydrogel được để hóa rắn ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Các hạt này được lấy ra khỏi bể để liên kết ngang, rửa bằng nước và trộn với hỗn hợp khô gồm 90 g sucroza và 10 g casein đã thủy phân triệt để. Các phần tử mang đường/protein được làm đông lạnh nhanh và ngay sau đó đặt lên các khay ở 500 g/feet vuông (0,3048 m²) và đông khô trong thiết bị đông khô đến khi hoạt độ nước giảm xuống nhỏ hơn 0,3. Chế phẩm khô còn được nghiền để có sự phân bố kích thước như mong muốn và được đóng gói.

Ví dụ 14

Tạo môi cho các loài xâm lấn

Mỗi dạng viên lãg dùng cho các loài xâm lấn cụ thể được nhắh tới được tạo ra theo sáng chế. 200 g chế phẩm chứa chất diệt sinh vật gây hại như được mô tả trong Ví dụ 1 được tạo ra và bổ sung vào 200 g nước. Bổ sung vào dung dịch này 90 g Rotenone và 0,5 g canxi phosphat đibazơ, sau đó là 0,5 g gluconolacton. Huyền phù đặc được để hóa rắn ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Gel đặc được cắt thành sợi mỏng và dài bằng máy cắt /máy xé. Các sợi mỏng được đưa lên khay và đặt vào trong thiết bị đông khô. Nhiệt độ của giá để được đặt ở -30°C và chế phẩm được làm đông lạnh trước khi đưa môi trường về độ chân không hoàn toàn và tăng nhiệt độ của giá lên $+60^{\circ}\text{C}$ để làm khô qua đêm. Chế phẩm khô được nghiền để thu được sự phân bố theo kích thước thích hợp, cho các loài cụ thể được nhắm tới.

Ví dụ 15

Tạo ra chất diệt sinh vật gây hại có tác dụng bảo vệ trong chế phẩm tan trong nước:

Chế phẩm bảo vệ dạng hạt chứa chất diệt vật gây hại sẽ bị phân huỷ bởi các thành phần khác trong chế phẩm trong quá trình bảo quản hoặc sau khi sử dụng trong môi trường được tạo ra theo công thức và phương pháp theo sáng chế. Chế phẩm chứa 6 g pectin và 102 g sucroza được bổ sung vào 200 g nước. Bổ sung vào dung dịch này 90 g chế phẩm khô chứa chất diệt sinh vật gây hại dễ bị hỏng và hỗn hợp chứa 1,5 g canxi phosphat đibazơ và 0,5 g canxi clorua, sau đó là 0,85 g gluconolacton. Huyền phù đặc được để hóa rắn ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ, và sau đó cắt thành sợi mỏng, dài bằng máy cắt /máy xé. Các sợi mỏng này được đưa lên khay và làm khô trong thiết bị đông khô để đạt đến hoạt độ nước bằng 0,1. Chế phẩm khô còn được nghiền để thu được sự phân bố theo kích thước mong muốn và được đóng gói.

Ví dụ 16

Tạo ra chế phẩm chứa lợi khuẩn có tác dụng bảo vệ cây trồng:

Tác nhân kiểm soát sinh học như *Rhizobacteria* được tạo ra trong chế phẩm khô theo Ví dụ 4. Hiệu quả của chế phẩm khô chứa *Rhizobacteria* được ước giá theo sự sinh trưởng rau diếp trong điều kiện thí nghiệm. Liều lượng 100 mg chế phẩm khô chứa *Rhizobacteria* trên mỗi cây trồng được chủng vào lọ cùng với cát và sinh trưởng

cùng với cây rau diếp con thu được bằng phương pháp nảy mầm từ hạt trước đó (24 giờ). Lượng chất dinh dưỡng trong 5 ml dung dịch Hoagland đã vô trùng được dùng cho cây trồng trong lọ. Các lọ được sắp xếp ngẫu nhiên trong buồng sinh trưởng có nhiệt độ duy trì ở 28°C với 12 giờ chiếu sáng. Cứ 7 ngày sau khi ủ, cây trồng và cát dính vào được lấy cẩn thận ra khỏi lọ. Rễ được rửa trong chất đệm phosphat vô trùng (độ pH=7,0), và kết quả đo chiều dài của rễ được ghi lại.

Tài liệu tham khảo

Các tài liệu tham khảo sau đây và tất cả các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích tham khảo.

Tài liệu tham khảo patent Mỹ:

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

20080229609 Preservation by Vaporization, June 2005, Bronshtein

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

7381425 Preservation of bioactive materials by freeze dried foam, September 2006, Truong-le, Vu.

Các tài liệu tham khảo 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. and Crowe, L.M. 1998. THE ROLE OF VITRIFICATION IN ANHYDROBIOSIS. *Annu. Rev. Physiol*. 60:73-103.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra chế phẩm thủy tinh khô mà không cần đun sôi hoặc tạo bọt, phương pháp này bao gồm bước: (a) kết hợp nguyên liệu có hoạt tính sinh học, chất tạo nền và hai chất tạo thủy tinh trong dung môi nước để tạo thành huyền phù đặc nhớt; (b) làm đông lạnh nhanh huyền phù đặc này trong nitơ lỏng để tạo thành các phần tử rắn đông lạnh ở dạng hạt, giọt hoặc sợi; (c) làm khô sơ bộ các phần tử đông lạnh này bằng cách làm bay hơi, trong áp suất giảm và nhiệt đủ để giữ các phần tử này ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ làm đông các phần tử đông lạnh này, theo đó tạo ra chế phẩm được làm khô sơ bộ; và (d) làm khô thứ cấp chế phẩm đã làm khô sơ bộ trong môi trường chân không hoàn toàn và nhiệt độ 20°C hoặc cao hơn trong thời gian đủ để làm giảm hoạt độ của nước trong chế phẩm đã làm khô sơ bộ xuống A_w bằng - 0,3 hoặc thấp hơn, theo đó tạo ra chế phẩm thủy tinh khô.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc thổi sạch các phần tử đông lạnh trước khi làm khô sơ bộ các phần tử đông lạnh này.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tổng áp suất tác động đến các phần tử đông lạnh trong bước làm khô sơ bộ lớn hơn 2000 mTORR (266,644 Pa).
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tổng áp suất tác động đến các phần tử đông lạnh ở bước làm khô sơ bộ nằm trong khoảng từ 2000 mTORR (266,644 Pa) đến 4000 mTORR (533,288 Pa).
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tổng áp suất tác động đến các phần tử đông lạnh ở bước làm khô sơ bộ nằm trong khoảng từ 2000 mTORR (266,644 Pa) đến 10000 mTORR (1333,220 Pa).
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ ở bước làm khô sơ bộ lớn hơn -10°C.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ ở bước làm khô sơ bộ nằm trong khoảng từ -5°C đến +5°C.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ trong bước làm khô thứ cấp nằm trong khoảng từ 20°C đến 70°C.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ hoặc độ chân không tăng trong bước làm khô thứ cấp.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cắt, ép, xay hoặc nghiền chế phẩm thành bột chảy tự do.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó cỡ hạt của bột nhỏ hơn khoảng 1000 μm .
12. Chế phẩm thủy tinh khô, chứa nguyên liệu có hoạt tính sinh học, ít nhất một chất tạo nền và ít nhất hai chất tạo thủy tinh, trong đó chế phẩm này được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 1.
13. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chế phẩm này chứa tổng lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 30% trọng lượng đến 70% trọng lượng.
14. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó nguyên liệu có hoạt tính sinh học bao gồm tế bào, vi sinh vật, virus, chủng tế bào, vi khuẩn, lợi khuẩn, vi khuẩn có lợi cho thực vật và đất, nấm men, protein, protein tái tổ hợp, enzym, peptit, hormone, vaccine, dược chất, kháng sinh, vitamin, carotenoid, khoáng chất, chất diệt vi sinh vật, chất diệt nấm, chất diệt cỏ, chất diệt sinh vật có hai hoặc chất diệt tinh trùng.
15. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chất tạo nền được chọn từ nhóm gồm: xenluloza axetat phthalat (CAP), carboxy-metyl-xenluloza, pectin, natri alginat, các muối của axit alginic, hydroxyl propyl methyl xenluloza (HPMC), methyl xenluloza, caragenan, gôm guar, gôm keo, gôm xanthan, gôm đậu locust, chitosan và dẫn xuất của chitosan, tinh bột và tinh bột đã cải biến, cyclodextrin, inulin, maltodextrin, dextran và các hỗn hợp của chúng.
16. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chất tạo nền có mặt trong chế phẩm với lượng nằm trong khoảng từ 1% trọng lượng đến 20% trọng lượng.
17. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó mỗi chất tạo thủy tinh được chọn từ nhóm bao gồm protein, cacbohydrat, axit amin, metylamin, polyol, propylen glycol, polyetylen glycol, các chất hoạt động bề mặt, phospholipit và hỗn hợp của chúng.
18. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chất tạo thủy tinh có mặt trong chế phẩm với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 80% trọng lượng.

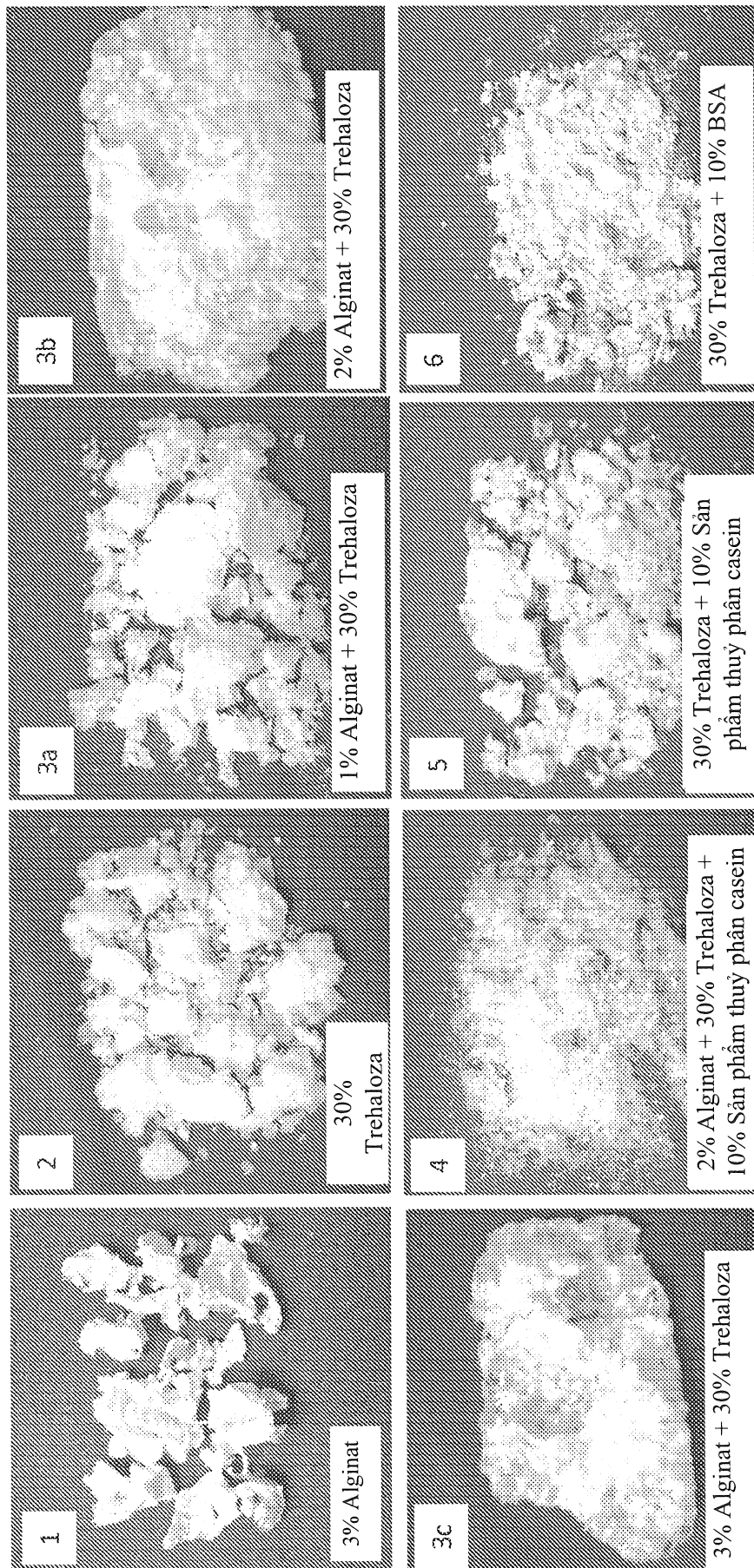
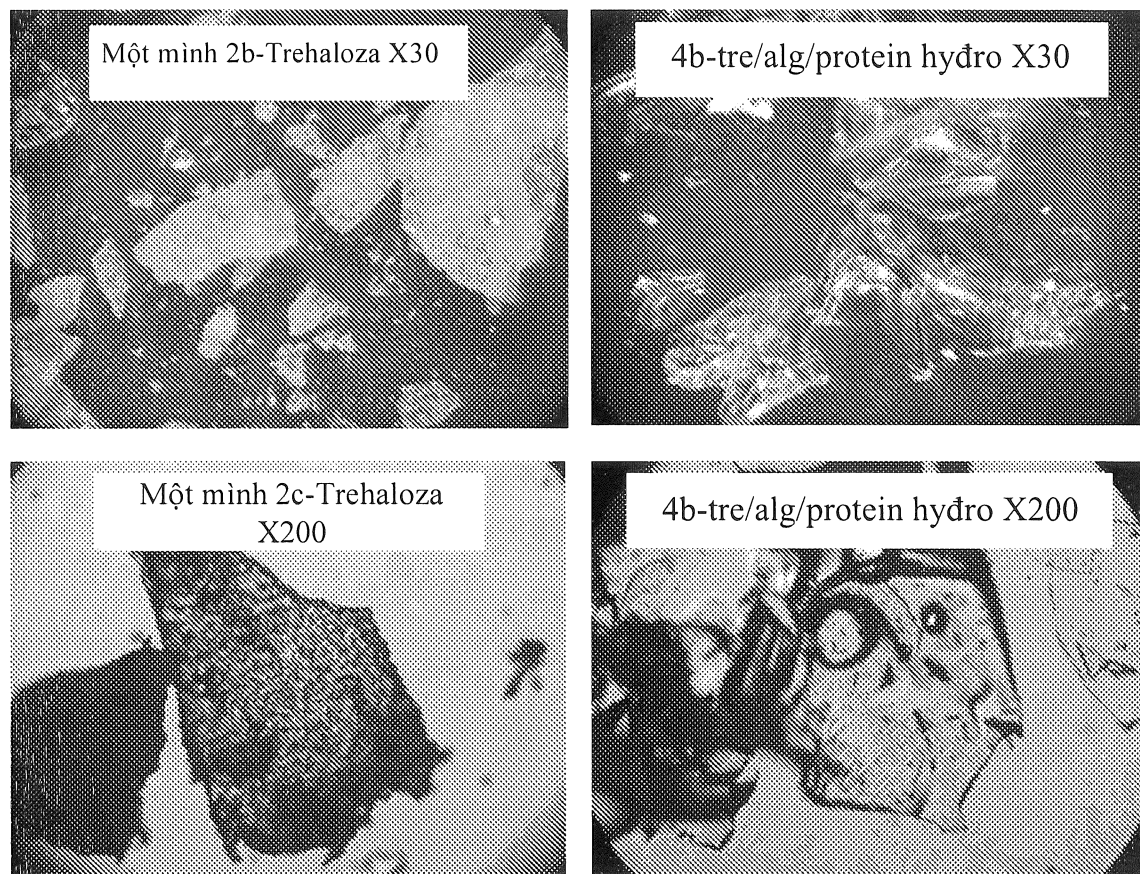
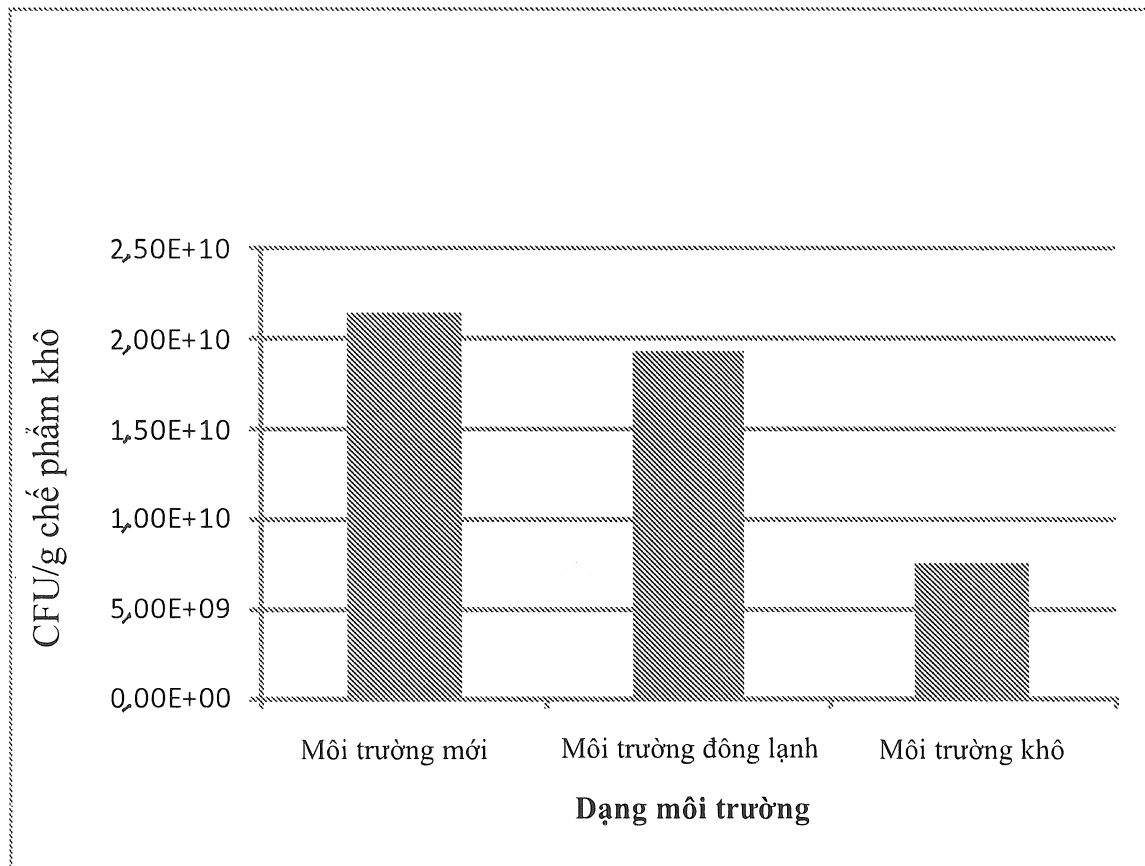
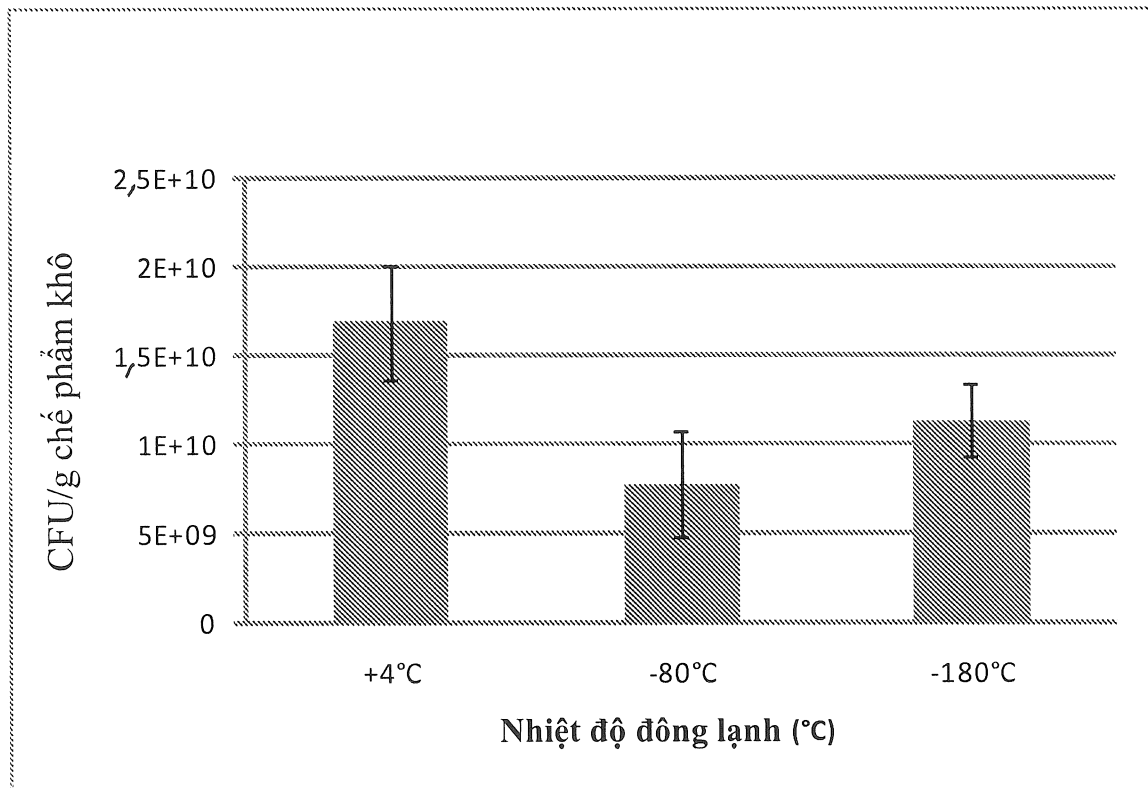
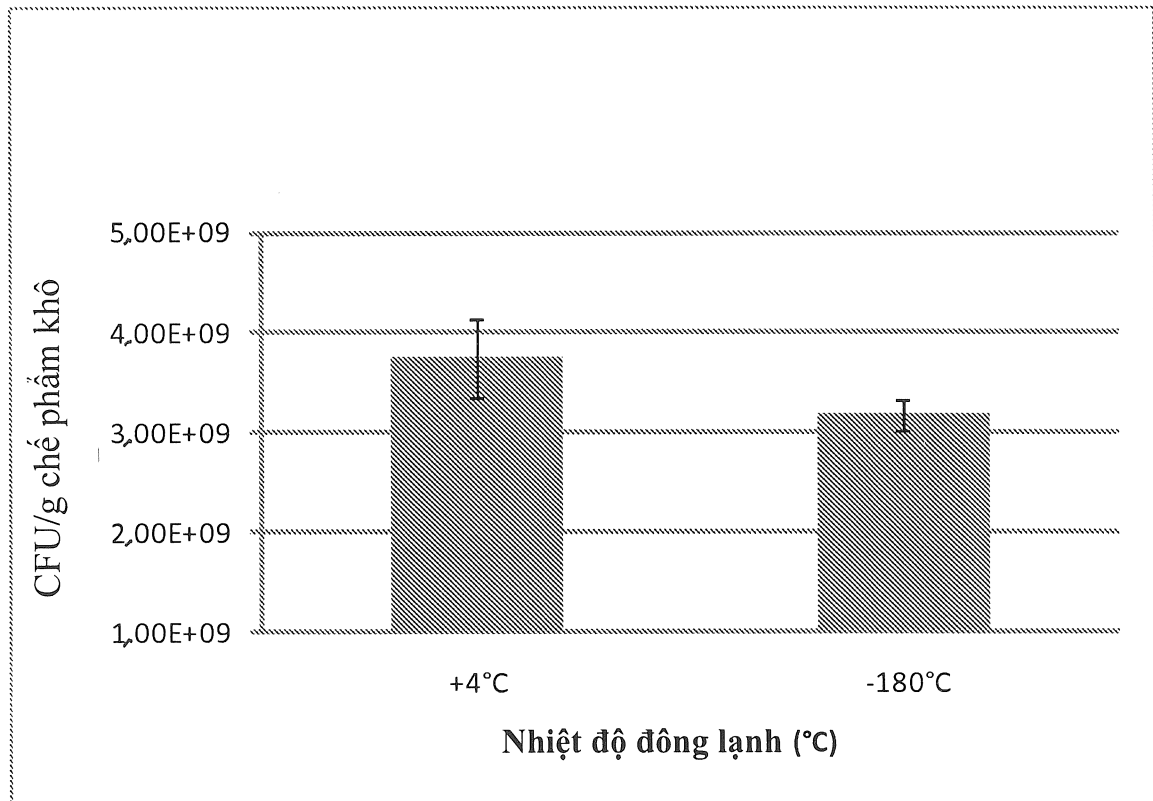


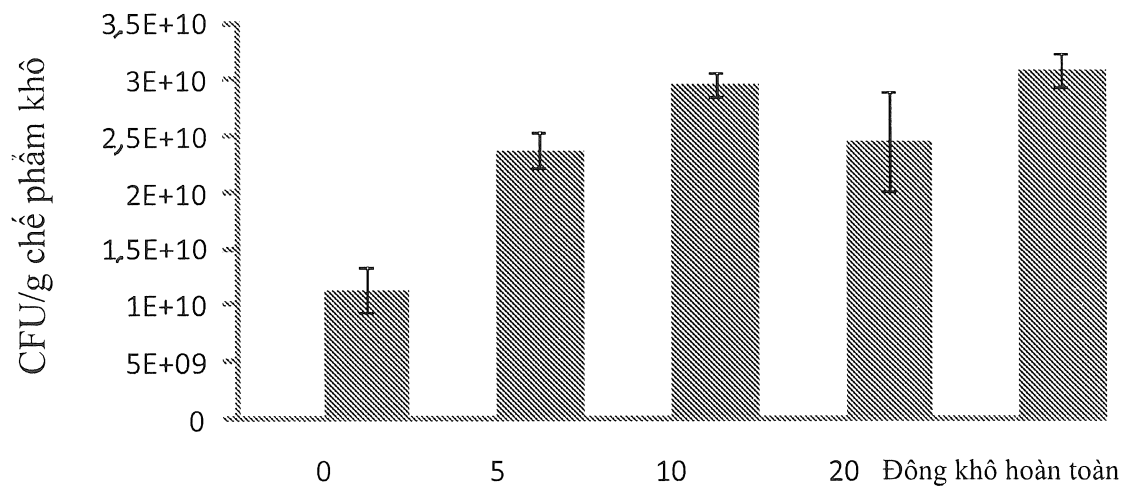
Fig. 1A

**Fig.1B**

**Fig.2**

**Fig.3**

**Fig.4**

**Fig.5**

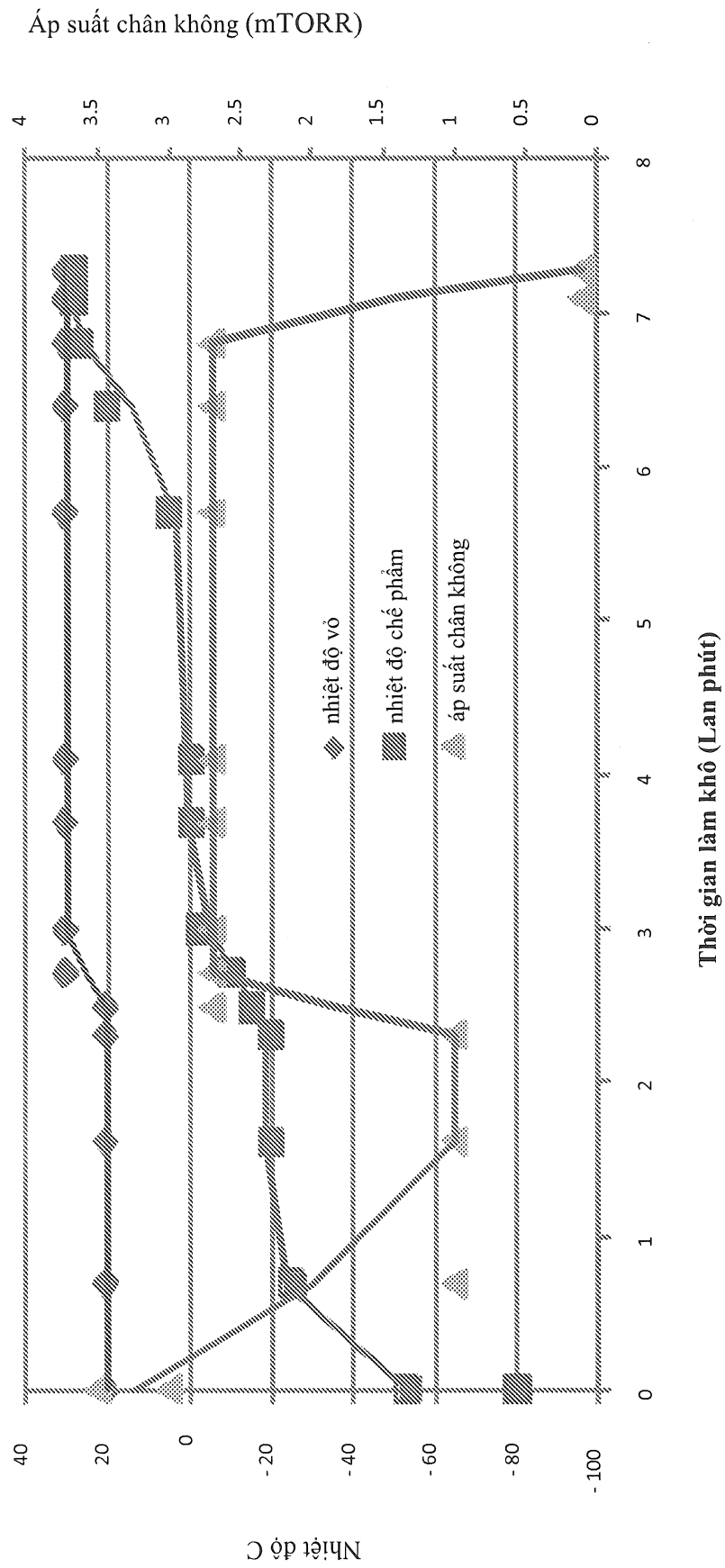
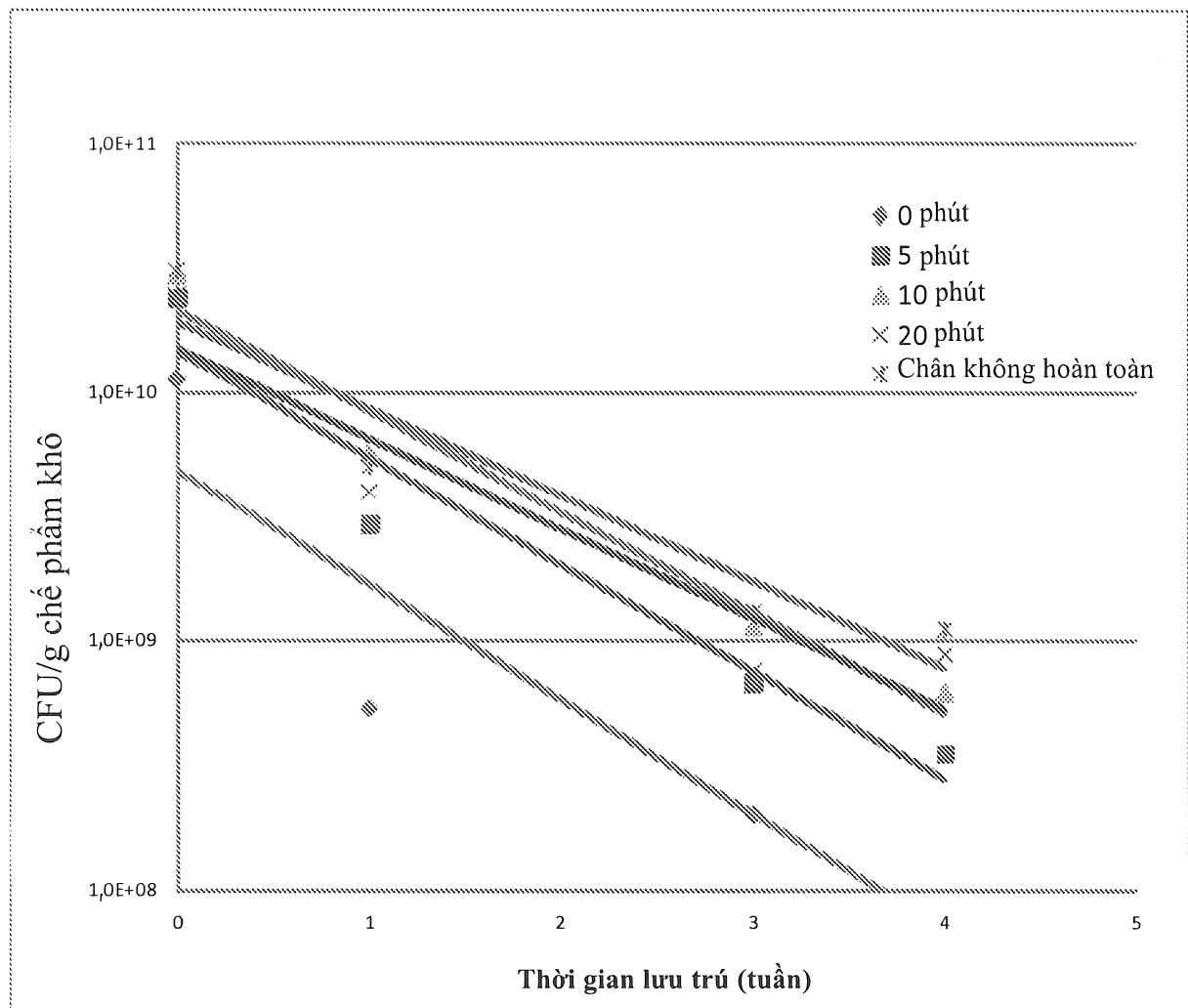


Fig.6

Sự hao hụt do quy trình của <i>L. rhamnosus</i>	
trong quá trình làm khô các dạng môi trường khác nhau	
và ở các nhiệt độ đông lạnh khác nhau	
Dạng môi trường	Log hao hụt
Môi trường đông lạnh	0,91
Môi trường khô	0,44
Nhiệt độ đông lạnh	
+4°C	0,73
-80°C	0,96
-180°C	0,90
* sự hao hụt đối với nhiệt độ đông lạnh được tính dựa trên môi trường nuôi cấy vi khuẩn đông lạnh	
** Sự hao hụt do quy trình đạt được sau khi làm khô không bao gồm bước thổi sạch bổ sung	

Fig.7

**Fig.8**