



(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)



1-0029951

(51)⁷ A23K 1/18; A23K 1/14; A23K 1/16

(13) B

(21) 1-2015-04242

(22) 22/04/2014

(86) PCT/EP2014/058057 22/04/2014

(87) WO2014/173862 30/10/2014

(30) 13165016.0 23/04/2013 EP

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/03/2016 336A

(73) HERBONIS AG (CH)

Rheinstrasse 30, 4302 Augst BL, Switzerland

(72) AEBI, Robert (CH); BACHMANN, Heinrich (CH).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN TỶ LỆ TĂNG TRƯỞNG CỦA CÁ VÀ LOÀI GIÁP XÁC ĐƯỢC NUÔI

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp để cải thiện tỷ lệ tăng trưởng của cá và loài giáp xác được nuôi trong đó phần thịt cá và dầu cá được sử dụng để cho chúng ăn được thay thế bằng protein và dầu thực vật được bổ sung lượng có hiệu quả của 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit được cung cấp từ nguồn lá khô của *Solanum glaucophyllum* và còn được bổ sung thêm các enzym phytaza khi axit phytic phản dinh dưỡng có mặt trong dầu và protein thực vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến lĩnh vực nuôi cá và loài giáp xác, cụ thể là đề cập đến thành phần thức ăn cụ thể hoặc các chất phụ gia thích hợp cho cá hoặc loài giáp xác ăn. Cụ thể hơn nữa là sáng chế đề cập đến phương pháp hữu dụng để cải thiện tỷ lệ tăng trưởng và cải thiện sự tái hấp thu khoáng chất ở cá và loài giáp xác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc cung cấp thực phẩm cho dân số thế giới ngày càng tăng là một thách thức to lớn. Một trong các thành phần có giá trị dinh dưỡng cao nhất là protein thường lấy từ thịt của các loài động vật trên cạn nhưng cũng có thể là từ cá. Sự tiêu thụ cá và loài giáp xác là nguồn thịt từ thời tiền sử. Tuy nhiên, trong các thập kỷ gần đây, việc đánh bắt cá đại dương đã đạt đến điểm tới hạn trong đó việc khai thác quá mức làm giảm sự đánh bắt nhiều loài cá biển như cá mòi, cá ngừ và cá trích. Bên cạnh đó, hoạt động đánh bắt cá hiện đại phá hủy đáy đại dương và điều này làm suy giảm tầng đáy đối với nhiều động vật biển.

Do đó, nuôi cá là sự thay thế thích hợp cho việc đánh bắt cá biển. Vì vậy, ví dụ cá hồi có tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (feed conversion ratio: FCR) tốt nhất trong tất cả các loài động vật được nuôi.

Tuy nhiên, việc nuôi trồng cá và loài giáp xác cũng có các nhược điểm, cần phải được khắc phục để làm cho việc nuôi trồng thủy sản bền vững:

1. Mật độ thả cá là nguyên nhân của sự căng thẳng và sinh trưởng bất thường;
2. Việc bón phân quá mức ở các khu vực ven biển gây ra do chất thải và thức ăn bị lãng phí;
3. Việc sử dụng thịt cá và dầu cá làm thành phần thức ăn.

Các trở ngại này đã được thừa nhận bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và nghiên cứu chuyên sâu đang được thực hiện để cải thiện tình hình và làm cho việc nuôi trồng thủy sản trở nên bền vững. Một trong các chiến lược

được đề xuất là thay thế việc sử dụng thịt cá và dầu cá bằng các nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật và hiệu chỉnh sự mất cân bằng có thể xảy ra. Chiến lược khác là tìm ra các chất phụ gia có thể giúp việc sử dụng các chất dinh dưỡng khác được tốt hơn.

Ngoài ra, cá và loài giáp xác trong nuôi trồng thủy sản không tiếp cận với các thành phần thức ăn tự nhiên trong môi trường đại dương hoặc nước ngọt như các chất dinh dưỡng thiết yếu ví dụ như các vitamin từ sinh vật phù du. Mặt khác, nước ngọt và nước biển chứa một số khoáng chất với lượng vừa đủ nhưng thiếu các khoáng chất khác, ví dụ như phospho.

Trái ngược với canxi, phospho là chất dinh dưỡng hạn chế tăng trưởng đối với động vật thủy sản và cần phải được bổ sung bởi thức ăn. Phospho cùng với canxi không những là thành phần chính của xương và vảy cá, mà còn là bộ xương ngoài của loài giáp xác. Ngoài ra, phospho là yếu tố chủ yếu trong chức năng cơ.

Do đó, có sự quan tâm cao đối với việc tìm ra các phương pháp giúp sử dụng có hiệu quả của các chất dinh dưỡng này và không lãng phí chúng trong môi trường.

Sáng chế ngăn ngừa một cách thỏa đáng tất cả các trở ngại vẫn còn gặp phải của việc nuôi cá và loài giáp xác và đáp ứng một cách thỏa đáng nhu cầu rõ ràng chưa được đáp ứng trong nuôi trồng thủy sản.

Sáng chế đề cập đến, cụ thể là, phương pháp cải thiện sự hấp thu canxi và phospho ở cá nhiều xương và loài giáp xác và chế phẩm cải thiện sự sinh trưởng và cơ thể động vật và thu được chất lượng thịt tốt hơn. Điều này cho phép giảm dễ dàng và có lợi các thành phần này trong thức ăn trong khi đó vẫn cho phép đạt được các năng suất mong muốn.

Sáng chế được xác định trong yêu cầu bảo hộ được đính kèm dưới đây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là để khắc phục các nhược điểm nêu trên.

Để đạt được mục đích trên đây, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để cải thiện tỷ lệ tăng trưởng của cá và các loài giáp xác được nuôi bao gồm bước cho cá và loài giáp xác này ăn thức ăn, thành phần thức ăn hoặc chất phụ gia thức ăn trong đó phần thịt cá và dầu cá được thay thế bằng protein thực vật và dầu

thực vật và được bổ sung 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit được cung cấp từ nguồn lá khô của *Solanum glaucophyllum*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, thuật ngữ “các chất chuyển hóa vitamin D” nghĩa là 25-hydroxyvitamin D3 (Canxidiol, số CAS: 19356-17-3), 25-hydroxyvitamin D2; 1,25-dihydroxyvitamin D3 (Canxitriol, CAS 32222-06-3), 1,25-dihydroxyvitamin D2; 1- α -hydroxy-cholecanxiferol, 1- α -hydroxyergosterol hoặc 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit trong đó thuật ngữ “glycosit” xác định các đơn vị glucoza, fructoza, galactoza hoặc đơn vị hexoza và pentoza bất kỳ liên kết với aglycon. 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit thể hiện một trong số các chất chuyển hóa vitamin D được ưu tiên được sử dụng trong phạm vi của sáng chế.

Theo sáng chế, thuật ngữ “nguồn của các chất chuyển hóa vitamin D” bao gồm các chế phẩm hoặc một phần của cây, và cụ thể là lá, thu được từ cây như *Solanum glaucophyllum*, *Cestrum diurnum*, *Trisetum flavescens* và *Nierembergia veitchii*. Tuy nhiên, danh sách này là không giới hạn.

Theo sáng chế, các chất chuyển hóa vitamin D này có thể được áp dụng một mình, nghĩa là ở dạng toàn bộ vitamin duy nhất hoặc thêm vào vitamin D thông thường nhờ đó việc thêm vitamin D3 thông thường thể hiện sáng chế được ưu tiên.

Theo sáng chế, thuật ngữ “cá” bao gồm các loài bất kỳ thích hợp để nuôi hoặc nuôi trồng và cụ thể là cá biển như cá hồi Đại Tây Dương, cá măng, cá chim lớn, cá tuyết Đại Tây Dương, cá hồi Thái Bình Dương, cá bơn, cá lưỡi trâu, cá chẽm, các loài cá có vây và cá chình cũng như cá nước ngọt như cá hồi ví dụ như cá hồi cầu vồng, cá chép, cá rô phi, cá da trơn, cá tra và cá mè.

Theo sáng chế, thuật ngữ “loài giáp xác” bao gồm các loài bất kỳ thích hợp để nuôi hoặc nuôi trồng, và cụ thể là tôm biển và tôm pandan như ví dụ như tôm sú và tôm pandan nước ngọt, cua và tôm đồng.

Theo sáng chế, thuật ngữ “khoáng chất” bao gồm phospho, canxi và magie; phospho là môi quan tâm đầu tiên trong phạm vi của sáng chế là nguồn chính gây ô nhiễm trong việc nuôi cá.

Theo sáng chế, thuật ngữ “sự tái hấp thụ khoáng chất” nghĩa là sự tái hấp thụ trong ruột hoặc sự tái hấp thụ qua vảy (cá) hoặc qua vỏ (loài giáp xác).

Theo sáng chế, nguyên liệu cây *Solanum glaucophyllum* thể hiện nguồn của các chất chuyển hóa vitamin D3 được ưu tiên, đặc biệt là nguồn 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit. Nguyên liệu cây này được cung cấp hoặc là từ cây đại hoặc từ cây trồng hoặc giống lai của cây trồng này ví dụ như “HERVIT®” theo Giấy chứng nhận giống cây trồng EU số 25473.

Đối với nguyên liệu cây, có thể sử dụng lá khô của cây này hoặc chiết xuất nước bất kỳ của chúng, chiết xuất nước/rượu bất kỳ của chúng hoặc chiết xuất nước/rượu bất kỳ của chúng được làm giàu hoặc được tinh chế (xem các ví dụ dưới đây).

Theo sáng chế, 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit được cung cấp cho cá và loài giáp xác trong thức ăn của chúng với liều hàng ngày nằm trong khoảng từ 0,1µg đến khoảng 100µg 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit tính cho một kg thức ăn cho cá hoặc thức ăn cho loài giáp xác, liều mà thường được thể hiện ở dạng µg 1,25-dihydroxyvitamin D3 để phân tích.

Ưu tiên là sử dụng trong khoảng từ 0,2 đến khoảng 20µg 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit tính cho một kg nguyên liệu thức ăn và còn ưu tiên hơn nữa là từ khoảng 0,5 đến khoảng 10µg 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit tính cho một kg nguyên liệu thức ăn. Các chất chuyển hóa vitamin D có thể được kết hợp vào nguyên liệu thức ăn hoặc thành phần bất kỳ chuyên dụng cho tình trạng phát triển bất kỳ của cá và loài giáp xác.

Thức ăn hoặc nguyên liệu thức ăn này còn có thể bao gồm khoảng từ 25µg đến khoảng 75µg vitamin D (tổng hợp) thông thường, ví dụ như vitamin D3 (tổng hợp) tính cho một kg thức ăn hoặc nguyên liệu thức ăn.

Khi áp dụng 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit theo quy định trên đây, và cụ thể là khi tiến hành áp dụng liều đơn của 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit - ví dụ như được đề xuất là chiết xuất tan trong nước của *Solanum glaucophyllum* theo WO2009/129818 - hoặc của 1,25-dihydroxyvitamin D3, 25-hydroxyvitamin D3 hoặc của 1-α-hydroxyvitamin D3 tổng hợp cho cá hồi Đại Tây Dương trưởng thành

thì thấy tăng mức 1,25-dihydroxyvitamin D3 trong máu. Khi so sánh cá được đề cập ở trên với các đối tượng đối chứng không được xử lý còn thấy có tăng đáng kể sự hấp thụ canxi và phospho từ thức ăn tiêu chuẩn được cung cấp cho cá này.

Theo một loạt các thí nghiệm khác được thực hiện với cá hồi Đại Tây Dương thiếu niên và thực hiện sử dụng 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit dưới dạng chiết xuất tan trong nước của *Solanum glaucophyllum* (xem ở trên) thấy rằng, sau 30 ngày cho ăn, tỷ lệ tăng trưởng tốt hơn rõ ràng, sự chuyển hóa thức ăn tốt hơn và xương ít hơn và sự méo mó hoặc biến dạng vảy ít hơn. Kết quả tương tự thu được khi sử dụng Panbonis® 10 làm nguồn thay thế của 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit.

Theo mục đích khác, sáng chế có thể làm giảm hiệu quả hàm lượng phospho trong thức ăn hoặc thành phần của thức ăn sử dụng trong nuôi trồng thủy sản khi tỷ trọng tiêu chuẩn ban đầu và thường được đề xuất cho các loài và giai đoạn phát triển đã cho giảm từ 10 đến 50% tỷ lệ ban đầu trong khi thêm vào đó lượng có hiệu quả các chất chuyển hóa vitamin D3 được đề cập trên đây và trong khi vẫn đạt được năng suất cuối cùng giống nhau, tức là tỷ lệ tăng trưởng, chất lượng thịt và xương.

Ví dụ, cá hồi Đại Tây Dương trưởng thành ăn với các liều khác nhau của 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit – ở dạng chiết xuất của *Solanum glaucophyllum* (xem ở trên) – vào khẩu phần với việc giảm dần phospho trong thức ăn bổ sung trong 60 ngày thu được tỷ lệ tăng trưởng tốt hơn, sự chuyển hóa thức ăn tốt hơn và ít phospho trong chất thải khi so với nhóm đối chứng không giảm phospho. Các kết quả tương tự thu được bằng cách sử dụng tổ hợp Panbonis® 10 cùng với thức ăn có hàm lượng phospho giảm so với nhóm đối chứng mà hàm lượng phospho trong khẩu phần của chúng không giảm.

Do đó, theo phương án của sáng chế, có thể giảm một cách có lợi sự ô nhiễm phospho trong nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là trong nuôi cá và loài giáp xác khi cho cá và loài giáp xác này ăn bằng thức ăn hoặc phụ gia thức ăn được đề cập trên đây.

Khi cho cá hồi Đại Tây Dương trưởng thành ăn với các liều khác nhau của 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit – ở dạng chiết xuất của *Solanum glaucophyllum* (xem ở trên) - vào khẩu phần với sự giảm dần thịt cá và dầu cá bổ sung và bằng cách thay thế chúng bằng các protein thực vật và dầu thực vật, tuy nhiên vẫn thấy

rằng, hiệu suất tăng trưởng giống như hiệu suất tăng trưởng của nhóm đối chứng không giảm.

Kết quả tương tự thu được khi sử dụng Panbonis® 10 làm nguồn thay thế của 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit vào nguyên liệu thức ăn trong đó phần thịt cá và dầu cá được thay bằng protein thực vật và dầu thực vật, khi so với nguyên liệu thức ăn đối chứng không được thay thế.

Khi cá hoặc loài giáp xác được cho ăn theo sáng chế thì thấy cải thiện rõ ràng của khỏe mạnh của chúng mà được phản ánh, cụ thể là, ở chất lượng thịt của chúng và sức khỏe vây và xương của chúng, tương tự, ở tỷ lệ tăng trưởng và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn của chúng.

Còn có thể cải thiện đáng kể tỷ lệ tăng trưởng và đồng thời giảm sự biến dạng xương ở cá và loài giáp xác được nuôi nhờ thức ăn hoặc nguyên liệu thức ăn hoặc phụ gia thức ăn như được đề cập trên đây.

Kết quả là sáng chế còn đề xuất phương pháp để cải thiện tỷ lệ tăng trưởng và sự khỏe mạnh của cá và các loài giáp xác được nuôi khi phần thịt cá và dầu cá được thay thế bằng protein và dầu thực vật nhờ thức ăn hoặc phụ gia thức ăn được đề cập trên đây. Theo cách này ngày nay có thể hiệu chỉnh có hiệu quả sự mất cân đối tiềm tàng có thể xảy ra do sự thay thế thức ăn này.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để nâng cao tỷ lệ tăng trưởng và sự khỏe mạnh của cá và các loài giáp xác được nuôi khi phần thịt cá và dầu cá được thay thế bằng protein thực vật và dầu thực vật và được bổ sung đồng thời với thức ăn hoặc phụ gia thức ăn được đề cập trên đây và kết hợp với việc sử dụng phytaza enzym khi axit phytic phi dinh dưỡng có mặt trong protein và dầu thực vật này.

Việc đưa vào các chất chuyển hóa vitamin D3 được chọn, đặc biệt là 1,25-dihydroxyvitamin D3 glycosit, được thực hiện theo kỹ thuật thường được áp dụng trong lĩnh vực này để sản xuất viên nhỏ hoặc mảnh vụn hoặc nguyên liệu thức ăn tương tự, cụ thể là đùn, bao, phun, v.v. Các chất chuyển hóa được chọn chủ yếu được trộn với carbohydrat, phần thứ nhất của lipit và protein và sau đó được đùn để tạo hạt hoặc lõi viên của nó. Lớp phủ bảo vệ làm từ phần thứ hai của lipit được chọn sau đó được phun lên lõi để tạo ra viên dùng ngay.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Chế phẩm chứa chiết xuất từ cây *Solanum glaucophyllum*

Mẻ lá khô được chọn của *Solanum glaucophyllum* được thấm ướt dưới điều kiện rung ở nhiệt độ 40 - 60°C trong khoảng 24 giờ với 5 đến 12 lít tính cho một kg hỗn hợp nước/etanol.

Đánh giá phân tích trước đó về hàm lượng trong 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycosit của các mẻ nguyên liệu lá khô khác nhau có trong nhà kho để điều chế 85/15 thể tích hỗn hợp nước/etanol. Sử dụng hỗn hợp riêng cho phép thu được hàm lượng dẫn xuất vitamin D₃ mong muốn – xấp xỉ 100 phần triệu (ppm) trong ví dụ này. Phần lỏng được tách và để riêng ra trong khi việc thấm ướt được lặp lại cho lượt thứ hai trong 24 giờ.

Sau đó, chiết xuất nước/etanol thu được được kết hợp và thêm axit ascorbic với tỷ lệ bằng 0,25% theo trọng lượng và độ pH của nó được điều chỉnh đến 5 – 6,5 bằng axit thích hợp cho thức ăn, trong trường hợp cụ thể này là axit xitric.

Sau đó chiết xuất đã ổn định được lọc và cô đến xấp xỉ 30 đến 50% hàm lượng chất khô bằng kỹ thuật làm khô chân không và chất thu được đậm đặc được rót lên nền chất trao đổi cation được cân bằng ở dạng H⁺ của nó.

Phần thu được lọc và sau đó đưa vào khử trùng UHT (125°C trong 1 phút). Sau khi đánh giá phân tích hàm lượng 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycosit, lượng cụ thể của tá dược, tốt hơn là maltodextrin, lactoza hoặc tinh bột ngô, được thêm vào nguyên liệu đã khử trùng để chuẩn hóa hàm lượng cuối cùng của thành phần hoạt tính trong chiết xuất từ cây – 100 ppm của 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycosit.

Cuối cùng, hỗn hợp đã chuẩn hóa được sấy phun hoặc làm khô trong chân không trong thiết bị sấy phun thông thường để thu được chiết xuất từ cây *Solanum glaucophyllum* mong muốn ở dạng bột.

Tùy ý nguyên liệu từ cây *Solanum glaucophyllum* có thể được chiết xuất bởi quá trình chiết ngâm với hỗn hợp dung môi nước/etanol được đề cập trên đây sau đó thêm các chất phụ gia làm ổn định ví dụ như axit ascorbic và điều chỉnh độ pH, trước khi xử lý UHT sau đó và làm khô (làm khô trong chân không hoặc sấy phun).

Chế phẩm chứa thành phần thức ăn (hoặc phụ gia thức ăn): Panbonis® 10

Hạt tấm của lúa mỳ (tá được) được nghiền kỹ với lá *Solanum glaucophyllum* khô và sau đó được xử lý đến khi thu được nguyên liệu bột đồng nhất. Tá được bắt hoạt được thêm vào lá khô để thu được sản phẩm chuẩn hóa bao gồm 0,001% (trọng lượng) 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit (được đo ở dạng “vitamin D3 hoạt tính” để phân tích, nghĩa là 1,25-dihydroxyvitamin D3 hoặc, được thể hiện theo cách khác, là 1,25(OH)₂D₃); Panbonis® 10 được mô tả thuận lợi hơn dưới đây khi chứa 10 µg 1,25-dihydroxyvitamin D3/kg.

Hàm lượng phân tích của tá được có thể thay đổi trong khoảng sau: 8 – 12% (trọng lượng) sợi thô, 14-25% (trọng lượng) tinh bột. Quá trình xử lý nghiền được thực hiện để tạo ra sự phân bố kích thước hạt nằm trong khoảng 50 đến 1000 µm.

Thử nghiệm cho cá ăn

Thử nghiệm số 1

Tổng 116 con cá hồi nâu (*Salmo Salar*) mỗi con có trọng lượng cơ thể nằm trong khoảng từ 250g đến 500g được cung cấp thức ăn tăng trưởng thương mại theo giai đoạn (protein thô: 46%; chất béo thô 12%; carbohydrat 20%; sợi thô 3%; tro 9%; canxi “,0%; P 1,5%; vitamin A 5000IU/kg; vitamin D3 2500 IU/kg) và chuyển vào các bể riêng, tạo cho mỗi bể cùng một bao nang chứa 1,75µg/kg trọng lượng cơ thể 1,25-dihydroxyvitamin D3. Cá được gây tê và máu được rút khỏi cá ở các thời điểm khác nhau, mẫu huyết thanh được chuẩn bị và đưa vào phân tích định lượng 1,25-dihydroxyvitamin D3, canxi và phospho.

Bảng 1: Các giá trị huyết thanh 1,25(OH)₂D₃, canxi và phospho

Thông số máu	Thời gian 0 giờ	Thời gian 12 giờ	Thời gian 24 giờ	Thời gian 48 giờ	Thời gian 72 giờ
1,25(OH) ₂ D ₃ [pg/ml]	51	246	1254	391	72
Ca [mmol/L]	3,06	2,53	2,41	2,38	2,59
P [mmol/L]	3,18	3,18	3,70	4,24	4,48

Thấy rằng huyết thanh trong máu tăng $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ với nồng độ đỉnh ở 24 giờ sau đó giảm dần xuống mức trước xử lý. Sự giảm nhẹ mức canxi và phospho chỉ có thể nhìn thấy 48 giờ sau khi cho dùng.

Thử nghiệm số 2

Ba mươi lăm con cá hồi cầu vồng (*Oncorhynchus mykiss*) thiếu niên có trọng lượng cơ thể trung bình bằng 19 gam được nuôi từng bể trong 4 mẫu lập mỗi thử nghiệm. Thời gian thử nghiệm cho ăn kéo dài trong 73 ngày ở nhiệt độ nước bằng 14°C . Cá được cho ăn một lần mỗi ngày đến khi xuất hiện bão hòa với khẩu phần theo Bảng 2. Panbonis® 10 được sử dụng làm nguồn $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, với tỷ lệ bằng 200 mg/kg khẩu phần, tương ứng với 1000 mg/kg khẩu phần.

Bảng 2: Thành phần của khẩu phần theo thử nghiệm 2

Nguyên liệu thô (%)	Đối chứng	Panbonis-1	Panbonis-2
Thịt cá	10,0	10,0	10,0
Bột mỳ	12,0	12,0	12,0
Protein thực vật	67,8	67,8	67,8
Thịt cá	10,0	10,0	10,0
Hỗn hợp trộn trước chứa vitamin	0,4	0,4	0,4
Hỗn hợp trộn trước chứa khoáng chất	6,0	6,0	6,0
Bột xenluloza	1,0	1,0	0,9
Panbonis® 10	----	0,020	0,100
Dầu cá	3,0	3,0	3,0
Tổng	100	100	100

Bảng 3: Các kết quả cung cấp bởi thông số được áp dụng trong thử nghiệm 2

Các chỉ số	Đối chứng	Panbonis-1	Panbonis-2
Thịt cá (%)	10	10	10
Số lượng cá ban đầu	35	35	35
Sinh khối khởi đầu (g)	674	668	666
Trọng lượng cơ thể trung bình (g)	19,2 ± 1,5	19,1 ± 1,4	19,0 ± 1,3
Sinh khối cuối (g)	2,036	2,134	2,179
Trọng lượng cơ thể trung bình (g)	58,2±12,9	61,0±13,5	62,2±15,6
Tỷ lệ sống (%)	100	100	100
Tăng trọng lượng (g)	1,362	1,466	1,512
Tăng trọng lượng trung bình (%)	302	319	327
Phân tích huyết thanh	Đối chứng	Panbonis-1	Panbonis-2
Panbonis® 10 (%)	----	0,020	0,100
1,25(OH) ₂ D ₃ (µg/ml)*	89,2±15,0	102,3±2,8	133,1±31,2
* Mẫu huyết thanh được thu từ 3 cá được trộn vào một mẫu để tìm 1,25(OH) ₂ D ₃ .			

Quan sát thấy sự tăng phụ thuộc liều trong việc tăng trọng lượng trung bình do thêm 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycosit được cung cấp bởi các liều dùng khác nhau của Panbonis® 10. Sự tăng nồng độ huyết thanh trong 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycosit – được đo là 1,25(OH)₂ D₃ - cũng phụ thuộc liều. Tỷ lệ sống của cá là 100%.

Thử nghiệm số 3

Ba mươi lăm con cá hồi cầu vồng (*Oncorhynchus mykiss*) thiếu niên có trọng lượng cơ thể trung bình bằng 28 gam được trải ra 6 bể trong toàn bộ quy trình xử lý.

Thời gian của thử nghiệm cho ăn là 32 ngày ở nhiệt độ nước bằng 14°C. Cá được cho ăn một lần mỗi ngày đến khi xuất hiện bão hòa với khẩu phần như được thể hiện trong Bảng 4. Panbonis được sử dụng làm vật thử ở nồng độ bằng 0,1, 0,2, 1,0, 5,0 và 10 g/kg khẩu phần.

Bảng 4: Thành phần của khẩu phần theo Thử nghiệm 3

Nguyên liệu thô (%)	Đối chứng	Panbonis 0,1g/kg	Panbonis 0,2g/kg	Panbonis 1,0g/kg	Panbonis 5,0g/kg	Panbonis 10g/kg
Bột mỳ	16,64	16,64	16,64	16,64	16,64	16,64
Protein thực vật	44	44	44	44	44	44
Thịt cá	25	25	25	25	25	25
Hỗn hợp trộn trước chứa vitamin	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72
Hỗn hợp trộn trước chứa khoáng chất	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Chất khác	4,94	4,94	4,94	4,94	4,94	4,94
Cám gạo khử béo	1	0,99	0,98	0,9	0,5	0
Panbonis® 10	0	0,01	0,02	0,1	0,5	1
Dầu cá	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Tổng	100	100	100	100	100	100

Bảng 5: Kết quả của thử nghiệm 3

Các chỉ số	Đối chứng	Panbonis	Panbonis	Panbonis	Panbonis	Panbonis
		0,1g/kg	0,2g/kg	1,0g/kg	5,0g/kg	10g/kg
Thịt cá (%)	25	25	25	25	25	25
Sinh khối khởi đầu (g)	663	658	663	662	662	663
Trọng lượng cơ thể trung bình (g)	28,8 ± 2,6	28,6 ± 2,3	28,8 ± 2,8	28,8 ± 2,2	28,8 ± 2,6	28,8 ± 2,6
Sinh khối cuối (g)	1,260	1,248	1,304	1,494	1,410	1,301

Trọng lượng cơ thể trung bình 0 (g)	54,8 ± 6,8 ^a	54,3 ± 7,6 ^a	56,7 ± 5,6 ^a	65,0 ± 7,0 ^b	61,3 ± 5,5 ^b	56,6 ± 6,0 ^a
Tỷ lệ sống (%)	100	100	100	100	100	100
Tăng trọng lượng (g)	597	590	642	832	749	638
Tăng trọng lượng trung bình (%)	190	190	197	226	213	198
Hàm lượng Ca (g/cá)	0,42	0,39	0,43	0,54	0,46	0,44
Hàm lượng P (g/cá)	0,42	0,4	0,42	0,56	0,49	0,43

Sau thử nghiệm ngắn hạn quan sát thấy kết quả tương tự như kết quả của thử nghiệm 2 về năng suất tăng trưởng. Thử nghiệm thể hiện sự đáp ứng liều tăng đối với sự kết tủa canxi và phospho ở cá.

Liều tối ưu được thấy là ở 1 gam Panbonis® 10 tính cho một kg khẩu phần, tương ứng với 10µg 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit tính cho một kg khẩu phần của cá.

Thử nghiệm số 4 (thử nghiệm giảm thịt cá)

Bốn mươi con cá hồi cầu vồng (*Oncorhynchus mykiss*) thiếu niên có trọng lượng cơ thể trung bình bằng 26 gam trung bình được nuôi trong mỗi bể trong 6 mẫu lặp mỗi thử nghiệm. Thử nghiệm cho ăn được thực hiện trong 62 ngày ở nhiệt độ nước bằng 14°C. Cá được cho ăn một lần mỗi ngày đến khi xuất hiện bão hòa với khẩu phần như được thể hiện trong Bảng 6. Panbonis® 10 được sử dụng làm vật thử ở nồng độ bằng 1,0 g/kg khẩu phần.

Bảng 6: Thành phần khẩu phần theo thử nghiệm 4

Nguyên liệu thô (%)	Đối chứng	Đối chứng có ít thịt cá	Panbonis 1,0 g/kg
Thịt cá	40	25	25
Bột mỳ	18,99	14,64	14,64
Protein thực vật	35	44	44
Thịt cá	40	25	25

Hỗn hợp trộn trước chứa vitamin	0,35	0,72	0,72
Hỗn hợp trộn trước chứa khoáng chất	0,8	1,2	1,2
Dầu cá	6,5	8,5	8,5
Chất khác	0,36	4,8	3,3
Panbonis® 10	----	----	0,10
Cám gạo khử béo	----	1,14	2,54
Tổng	100	100	100

Bảng 7: Kết quả của thử nghiệm 4

Các chỉ số	Đối chứng thịt cá	Ít thịt cá	Panbonis 1,0 g/kg
Sinh khối ban đầu (g)	1,048	1,034	1,033
Trọng lượng cơ thể trung bình (g)	26,2±1,9	25,9±2,4	25,8±2,0
Sinh khối cuối (g)	3,247	3,058	3,444
Trọng lượng cơ thể trung bình (g)	81,2±17,0 ^a	76,4±19,5 ^b	86,1±17,1 ^a
Tỷ lệ sống (%)	100	100	100
Tăng trọng lượng (g)	2,199	2,023	2,411
Tăng trọng lượng trung bình (%)	310	296	333

Quan sát thấy sự giảm thịt cá ảnh hưởng đến năng suất trọng lượng ở cá hồi cầu vồng. Tuy nhiên, việc thêm 1g/kg Panbonis® 10 vào khẩu phần có hàm lượng thịt cá thấp cải thiện năng suất tăng trưởng đáng kể mặc dù thành phần thịt cá đã giảm trong thức ăn.

Kết luận từ các thử nghiệm 2, 3 và 4 thể hiện rằng:

- Việc sử dụng canxi và phospho có thể được cải thiện
- Việc thay thế thịt cá là có thể

- Năng suất tăng trưởng cải thiện là có thật
- Các mức huyết thanh của vitamin D3 hoạt tính được cải thiện là đạt được.

Sau đó các thử nghiệm khác được thực hiện trong đó tỷ lệ ban đầu của phospho bổ sung trong khẩu phần được giảm.

Thử nghiệm 5 (giảm phospho)

Ba mươi con cá hồi cầu vồng (*Oncorhynchus mykiss*) thiếu niên có trọng lượng trung bình 126 gam được nuôi mỗi bể trong 4, tương ứng 3 mẫu lặp mỗi thử nghiệm. Thời gian của thử nghiệm cho ăn là 63 ngày ở nhiệt độ nước bằng 15°C trong hệ tái tuần hoàn.

Thức ăn cho cá để cho ăn sao cho đảm bảo không lãng phí thức ăn và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) tối ưu và cá được cho ăn một lần mỗi ngày đến khi xuất hiện bão hòa với khẩu phần như được thể hiện trong Bảng 8. Chiều sáng theo chế độ sáng 24 giờ không đổi. Oxy hòa tan được duy trì khoảng 7mg/l.

Khẩu phần đối chứng dương đã dùng trên thị trường sử dụng mức P tiêu chuẩn bằng 0,90%, trong khi khẩu phần thí nghiệm sử dụng mức P bằng 0,70% thấp hơn đối chứng dương 26%. Phytaza được sử dụng ở 750FTU/g. Panbonis được chứa ở 0,15 và 0,3g/kg khẩu phần và kết hợp với Phytaza.

Bảng 8: Thành phần khẩu phần cơ bản (đối chứng âm - NC)

Thành phần	g/kg khẩu phần
Thịt cá	220
Dịch đặc protein đậu nành	210
Gluten lúa mì	86
Gluten ngô	60
Bột mì	170
Lysin	6
Hỗn hợp trộn trước chứa vitamin-khoáng chất	20

Phosphat (MCP)	-
Dầu hạt cải	160
Dầu cá	68

Bảng 9: Thành phần khẩu phần bổ sung (đối chứng âm – NC)

Mã xử lý	Panbonis mg/kg	Phytaza, U/kg	P vô cơ g/kg	Mẫu lặp
Đối chứng âm (NC)	-	-	-	4
NC + Phosphat	-	-	2	4
NC + Panbonis® 10	150	-	-	3
NC + Panbonis® 10	300	-	-	3
NC + Phytaza	-	750	-	3
NC + Phytaza + Panbonis®	150	750	-	3

Bảng 10: Trọng lượng cá ở cuối thử nghiệm, (FCR) và tro xương trong thử nghiệm

5

Thông số	Đối chứng dương	Đối chứng âm	NC + Phytaza	NC + Phytaza +Pan150	NC + Pan150	NC + Pan300
Trọng lượng cuối của cá [g]	454	448	446	448	440	450
FCR	0,87	0,88	0,89	0,88	0,90	0,87
Tổng trung bình tro xương	49,8	45,3	50,1	50,3	47,6	45,7

Kết quả là, việc bổ sung 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit chứa sản phẩm Panbonis vào khẩu phần giảm phospho (từ mức bình thường 0,9% xuống 0,7%) tạo ra sự cải thiện rõ ràng của tỷ lệ chuyển hóa thức ăn và tro xương khi khẩu phần giảm phospho được bổ sung Phytaza hoặc Panbonis® 10 hoặc hỗn hợp của chúng.

Thử nghiệm số 6

15 con tôm pandan Nhật Bản (*Marsupenaeus japonica* – trọng lượng cơ thể trung bình khoảng 6,5 gam trong bể nhựa polycarbonat 200L với (4 bể?) – nhiệt độ nước 14°C – cho ăn một lần mỗi ngày vào buổi sáng đến khi xuất hiện bão hòa - lá *Solanum glaucophyllum* khô chứa nguồn 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycosit.

Bảng 11: Thành phần phối trộn thức ăn trong thử nghiệm 6

Bảng 11	Đối chứng-5	Thí nghiệm-9	Thí nghiệm-10	Thí nghiệm-11
Panbonis® 10 (%)	-	0,001	0,01	0,10
1,25(OH) ₂ Vit D ₃ (µg/kg)	-	0,1	1	10
Protein động vật	71,00			
Thịt cá	1,00			
Mono Canxi Phosphat	4,00			
Hỗn hợp trộn trước chứa vitamin	2,00			
Chất khác	22,00	22,00	21,00	21,90
Tổng	100,00	100,00	1100,00	100,00
Mức Vit D ₃ chiết xuất từ dầu cá và hỗn hợp trộn trước chứa vitamin (µg/kg)	188			

Các bảng 12, 13 và 14: Kết quả của thử nghiệm 6

Bảng 12	Đối chứng-5	Thí nghiệm-9	Thí nghiệm-10	Thí nghiệm-11
Panbonis® 10 (%)	----	0,001	0,01	0,10
1,25(OH) ₂ Vit D ₃ (µg/kg)	----	0,1	1	10
Số lượng ban đầu	45	45	45	45
Trọng lượng cơ thể trung bình (g)	6,4±0,9	6,5±0,9	6,4±0,8	6,5±0,8
Số lượng cuối	44	45	44	45

Trọng lượng cơ thể trung bình (g)	11,6±1,6	11,5±1,3	11,3±1,1	11,7±1,5
Tổng tăng trọng lượng (g)	222,0	222,5	210,1	233,2
Tăng trọng lượng trung bình (%)	181	177	177	180

Độ cứng của vỏ *

Bảng 13	Đối chứng-5	Thí nghiệm-9	Thí nghiệm-10	Thí nghiệm-11
Panbonis® 10 (%)	----	0,001	0,01	0,10
1,25(OH) ₂ Vit D ₃ (g)	----	0,1	1	10
Độ cứng của vỏ (g)	175±39,8 ^a	283±118 ^b	315±65,1 ^b	267±55,4 ^b
Phần bụng thứ nhất (g)	116,6±31,5 ^a	178,6±26,3 ^b	219,0±51,8 ^c	178,2±49,9 ^b

* Phát hiện bởi Rheometer CR300 (Sun Scientific Co. Ltd.).

Hàm lượng canxi *

Bảng 14	Đối chứng-5	Thí nghiệm-9	Thí nghiệm-10	Thí nghiệm-11
Panbonis® 10 (%)	----	0,001	0,01	0,10
1,25(OH) ₂ Vit D ₃ (g)	----	0,1	1	10
Hàm lượng Ca (% trong nguyên liệu khô)	4,42	5,13	5,68	5,19

* 6 con tôm được thu từ mỗi thử nghiệm và trộn lẫn để tạo ra một mẫu thử để đo hàm lượng Ca.

Quan sát thấy – xem Bảng 13 – sự cải thiện đáng kể của vỏ liên quan đến việc loài giáp xác được cho ăn thành phần theo sáng chế, độ cứng so với quần thể đối chứng. Bảng 14 còn thể hiện sự cải thiện của việc hấp thụ canxi song song đó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp để cải thiện tỷ lệ tăng trưởng của cá và các loài giáp xác được nuôi bao gồm bước cho cá và loài giáp xác này ăn thức ăn, thành phần thức ăn hoặc chất phụ gia thức ăn trong đó phần thịt cá và dầu cá được thay thế bằng protein thực vật và dầu thực vật và được bổ sung 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit được cung cấp từ nguồn lá khô của *Solanum glaucophyllum*.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thức ăn, thành phần thức ăn hoặc chất phụ gia thức ăn được bổ sung thêm các enzym phytaza khi axit phytic phản dinh dưỡng có mặt trong dầu và protein thực vật này.
3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cá được chọn từ cá biển như cá hồi Đại Tây Dương, cá măng, cá chim lớn, cá tuyết Đại Tây Dương, cá tuyết Thái Bình Dương, cá hồi Thái Bình Dương, cá bơn, cá lưỡi trâu, cá mú, các loài cá có vây và cá chình và/hoặc cá nước ngọt như cá hồi cầu vồng, cá chép, cá rô phi, cá da trơn, cá tra và cá mè.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó loài giáp xác được chọn từ tôm biển và tôm pandan (ví dụ, tôm sú và/hoặc tôm pandan nước ngọt), cua và tôm đồng.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit được cung cấp cho cá hoặc loài giáp xác trong thức ăn của chúng với liều hàng ngày nằm trong khoảng từ 0,1 μ g đến khoảng 100 μ g 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit tính cho một kg thức ăn cho cá hoặc loài giáp xác.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosit được cung cấp thêm vào vitamin D3 thông thường có nguồn gốc từ các nguồn khác.