



(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)



1-0035077

(51)⁷ A23K 10/18; A23K 50/10

(13) B

(21) 1-2018-00400

(22) 04/08/2017

(86) PCT/KR2017/008455 04/08/2017

(87) WO2019/027073 07/02/2019

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/07/2019 376A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

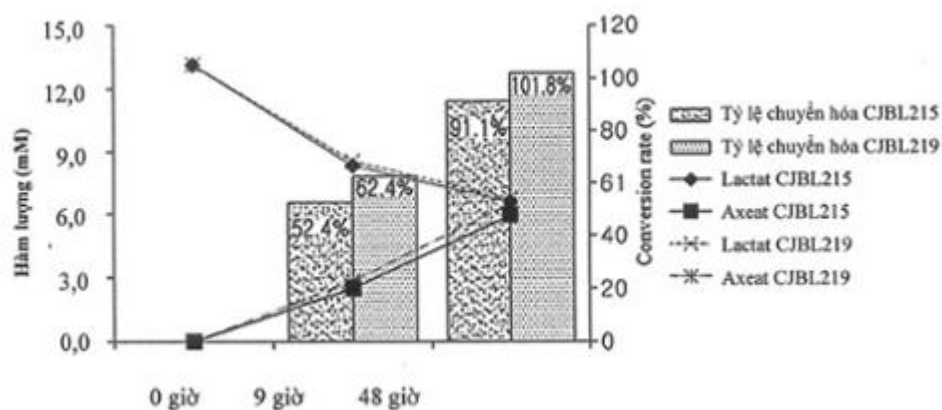
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Korea

(72) OH, Eun Seon (KR); KIM, Yu Jin (KR); PARK, Min Ah (KR); WOO, Seo Hyung (KR).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) CHẤT PHỤ GIA THỨC ĂN CHĂN NUÔI CHỨA BACILLUS SUBTILIS VÀ BACILLUS LICHENIFORMIS VÀ CHẾ PHẨM THỨC ĂN CHĂN NUÔI CHỨA CHẤT PHỤ GIA THỨC ĂN CHĂN NUÔI NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis*, chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chất phụ gia thức ăn chăn nuôi này, và phương pháp sản xuất chất phụ gia thức ăn chăn nuôi này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis*, chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, và phương pháp sản xuất chất phụ gia thức ăn chăn nuôi này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Do đó, có nhu cầu phát triển chất phụ gia thức ăn chăn nuôi có khả năng phân hủy xenluloza và lactat.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Bằng sáng chế Hàn quốc số 10-1721900

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Một mục đích của sáng chế là đề xuất chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis* có tác dụng cải thiện chất béo sữa và có thể được sử dụng để làm tăng sản lượng sữa.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hình ảnh hiển vi điện tử của *Bacillus subtilis* CJBS62 và *Bacillus licheniformis* CJBL215 và CJBL219 được phân lập trong một ví dụ theo

sáng chế.

Fig.2 thể hiện sự thay đổi màu sắc của môi trường được sử dụng để sàng lọc chủng tiêu thụ lactat trong một ví dụ theo sáng chế. Khi màu của môi trường chuyển từ màu vàng (trái) thành màu đỏ tía (phải), chủng trong môi trường được đánh giá là tiêu thụ lactat.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ biến đổi thành axetat bởi các chủng như được đo trong một ví dụ theo sáng chế.

Fig.4 thể hiện lượng lactat đã tiêu thụ và axetat được tạo ra bởi *Bacillus licheniformis* CJBL215 và CJBL219 (trái, trục y) và tỷ lệ biến đổi thành axetat (phải, trục x) sau 9h và 48 giờ nuôi cấy trong một ví dụ theo sáng chế.

Fig.5 là hình ảnh xác nhận liệu *Bacillus subtilis* CJBS62 và *Bacillus licheniformis* CJBL215 và CJBL219 có bị tan huyết hay không trong một ví dụ theo sáng chế.

Fig.6 thể hiện sự thay đổi nồng độ lactat phụ thuộc thời gian nuôi cấy nếu chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo một ví dụ của sáng chế được thêm vào thức ăn chăn nuôi đậm đặc.

Fig.7 thể hiện sự thay đổi nồng độ axetat phụ thuộc thời gian nuôi cấy nếu chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo một ví dụ của sáng chế được thêm vào thức ăn chăn nuôi đậm đặc.

Fig.8 so sánh tác động của hỗn hợp bao gồm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo một ví dụ của sáng chế và thức ăn chăn nuôi đậm đặc lên việc làm ổn định độ pH, so sánh với tác động này của nhóm đối chứng.

Fig.9 là biểu đồ thể hiện tác động của hỗn hợp bao gồm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo một ví dụ của sáng chế và thức ăn chăn nuôi đậm đặc lên sự cải thiện khả năng tiêu hóa.

Fig.10 là biểu đồ thể hiện tác động của hỗn hợp bao gồm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo một ví dụ của sáng chế và thức ăn chăn nuôi TMR lên sự cải thiện

khả năng tiêu hóa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Giải pháp kỹ thuật

Sau đây, các phương án của sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết. Cần lưu ý rằng các mô tả chi tiết hiện là nhiên đôi với người có trình độ trong lĩnh vực này sẽ được bỏ qua để rõ ràng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chất phụ gia thức ăn chăn nuôi để gia tăng chất béo sữa và sản lượng sữa, trong đó chất phụ gia thức ăn chăn nuôi này chứa chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis*.

Chủng bất kỳ thuộc về *Bacillus licheniformis* có khả năng phân hủy lactat thành axetat có thể được sử dụng. Khi được nuôi cấy trong môi trường chứa lactat trong khoảng thời gian từ 9 đến 48 giờ, chủng *Bacillus licheniformis* có thể chuyển hóa từ 30% đến 70%, cụ thể là từ 50% đến 65%, lượng lactat ban đầu thành axetat hoặc có thể chuyển hóa ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70% hoặc ít nhất 80% lượng lactat đã tiêu thụ thành axetat. Tỷ lệ biến đổi lượng lactat ban đầu thành axetat và tỷ lệ biến đổi lượng lactat đã tiêu thụ thành axetat có thể được tính tương ứng bằng các công thức 1 và 2:

Công thức 1:

Tỷ lệ biến đổi của lượng lactat ban đầu thành axetat (%) = (lượng axetat đã tạo ra/lượng lactat ban đầu)*100

Công thức 2:

Tỷ lệ biến đổi của lượng lactat đã tiêu thụ thành axetat (%) = (lượng axetat đã tạo ra/lượng lactat đã tiêu thụ)*100

Ngoài ra, chủng *Bacillus licheniformis* có thể tạo ra xenluloza và/hoặc mannaza.

Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* và chủng

Bacillus licheniformis có thể làm ổn định độ pH trong dạ cỏ của động vật nhai lại và có thể làm tăng khả năng tiêu hóa thức ăn của động vật nhai lại. Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi này có tác dụng cải thiện sự sản sinh chất béo sữa ở bò sữa và có thể làm tăng một cách hiệu quả lượng sữa được tạo ra.

Một cách độc lập, mỗi chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis* có thể có mặt ở nồng độ bằng ít nhất 1×10^7 cfu, cụ thể là ít nhất 1×10^8 cfu, cụ thể hơn là 1×10^9 cfu, trên mỗi gam chất phụ gia thức ăn chăn nuôi. Sự có mặt của các chủng này ở nồng độ xác định trên đây làm cho chất phụ gia thức ăn chăn nuôi có tác dụng phân hủy xenluloza và gia tăng chất béo sữa.

Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,1g đến 1kg, cụ thể là từ 5g đến 900g, cụ thể hơn là từ 10g đến 800g mỗi đầu động vật mỗi ngày.

Tỷ lệ trọng lượng của chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis* có thể nằm trong khoảng từ 1:9 đến 9:1, cụ thể là từ 2:8 đến 8:2, cụ thể hơn là từ 3:7 đến 7:3, cụ thể nhất là từ 1:2 đến 2:1.

Một phương án khác của sáng chế là chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chất phụ gia thức ăn chăn nuôi. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi này có thể chứa chất phụ gia thức ăn chăn nuôi với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 50% trọng lượng, cụ thể là từ 0,1% đến 40% trọng lượng, cụ thể hơn là từ 1% đến 20% trọng lượng dựa trên trọng lượng của chế phẩm.

Thức ăn chăn nuôi có thể là thức ăn chăn nuôi dành cho động vật, có thể là thức ăn chăn nuôi dành cho động vật nhai lại. Ví dụ về động vật nhai lại như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bò, trâu nước, dê núi, cừu, dê và nai. Lượng thức ăn có thể được xác định một cách phù hợp tùy thuộc vào loại, cân nặng, tuổi tác, giới tính và sức khỏe chung của động vật, thành phần thức ăn và các yếu tố khác.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp để gia tăng chất béo sữa và sản lượng sữa của động vật, bao gồm bước cho động vật sử dụng

chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis*. Mô tả chi tiết của phương án này giống như mô tả chi tiết của phương án khác được mô tả ở đây.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp để làm ổn định độ pH trong dạ cỏ của động vật, cụ thể là động vật nhai lại, bao gồm bước cho động vật sử dụng chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis*. Mô tả chi tiết của phương án này giống như mô tả chi tiết của phương án khác được mô tả ở đây

Tác dụng có lợi

Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có ích trong việc cải thiện chất béo sữa của động vật nhai lại và có thể giữ lượng chất béo sữa không bị giảm khi tiếp xúc với nhiệt độ cao vào mùa hè. Ngoài ra, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có tác dụng phân hủy lactat trong dạ cỏ. Do đó, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể ngăn độ pH trong dạ cỏ giảm bởi lactat và do đó có thể được sử dụng để ngăn ngừa tình trạng nhiễm axit trong dạ cỏ.

Phương thức thực hiện sáng chế

Tiếp theo, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa trên các ví dụ. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng các ví dụ này được cung cấp chỉ để minh họa và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi bảo hộ sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phân lập và sàng học chủng vi khuẩn

(1) Tạo mẫu và phân lập chủng

(2) Nghiên cứu các đặc tính hình thái và sinh hóa

Đầu tiên, các đặc tính hình thái và sinh hóa của chủng đã phân lập được nghiên cứu để xác định các chủng này. Bằng bước nhuộm gram để nghiên cứu hình

thái học, phát hiện thấy rằng tất cả các chủng đã phân lập đều là chủng gram dương. Phương pháp hiển vi điện tử cho thấy rằng các chủng đều là bacillus sp. (Fig.1).

Các đặc tính sinh hóa của chủng đã phân lập được phân tích. Các mẫu lên men đường của các chủng này được phân tích bằng cách sử dụng hệ API 50 CHB (biomerieux Vitek, Inc., France). Kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Đường	Kết quả			Đường	Kết quả		
	CJBL215	CJBL219	CJBS62		CJBL215	CJBL219	CJBS62
Đôi chứng	-	-	-	Esculin	+	+	+
Glyxerol	+	+	+	Salixin	+	+	-
Erythritol	-	-	-	Xenlobioza	+	+	-
D-Arabinoza	-	-	-	Maltoza	+	+	+
L-Arabinoza	+	+	+	Lactoza	-	+	-
Riboza	+	+	+	Melibioza	-	-	-
D-Xyloza	+	-	-	Sacaroza	+	+	+
L-Xyloza	-	-	-	Trehaloza	+	+	+
Adonitol	-	-	-	Inulin	-	-	+
β Metyl-xylosit	-	-	-	Melezitoza	-	-	-
Galactoza	-	+	-	D-Raffinoza	+	-	+
D-Glucoza	+	+	+	Amidon	+	+	+
D-Fructoza	+	+	+	Glycogen	+	+	-
D-Mannoza	+	+	-	Xylitol	-	-	-
L-sorboza	-	-	-	β Gentiobioza	-	-	-
Rhamnoza	-	+	-	D-Turanoza	+	+	-
Dulxitol	-	-	-	D-Lyxzoza	-	-	-
Inositol	+	-	+	D-Tagatoza	+	+	-
Mannitol	+	+	+	D-Fucoza	-	-	-
Sorbitol	-	+	+	L-Fucoza	-	-	-
α Metyl-D-mannosit	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-
α Metyl-D-glucosit	+	+	-	L-Arabitol	-	-	-
N Acetyl glucosamin	-	-	-	Gluconat	-	-	-
Amygdalin	+	+	-	2-keto-gluconat	-	-	-
Arbutin	+	+	-	5-keto-gluconat	-	-	-

+: Dương, -: âm

Nhờ việc phân tích các mẫu lên men đường của các chủng này, phát hiện thấy rằng CJBL215 thuộc về *Bacillus licheniformis* (độ tin cậy 99,7%) và phát hiện thấy

rằng CJBL219 thuộc về *Bacillus licheniformis* (độ tin cậy 99,9%). Phát hiện thấy rằng CJBS62 thuộc về *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* (độ tin cậy 99,6%).

(3) Xác định chủng

Ví dụ 2

Hoạt tính enzym tiêu hóa của các chủng đã phân lập

(1) Hoạt tính enzym tiêu hóa của các chủng này

Hoạt tính enzym tiêu hóa phức hợp của vi khuẩn đã phân lập được tạo ra từ bột nhão được đánh giá đối với mannaza và xenluloza là enzym tiêu hóa. Hoạt tính enzym tiêu hóa của các chủng này được đo phụ thuộc vào việc liệu các vùng sạch đã được hình thành trong môi trường chứa cơ chất cho enzyme hay chưa.

Các chủng đã phân lập được nuôi cấy trong môi trường lòng BHI (Difco) trong 24 giờ. Canh thang nuôi cấy tạo ra được thu hồi và sử dụng làm dung dịch enzym thô để phân tích hoạt tính enzym. Mức độ phân hủy của cơ chất trong môi trường được xác định như sau.

1) Đo hoạt tính mannaza

Môi trường nền (Dịch chiết nấm men 3g/l, Pepton 5g/l, KH_2PO_4 1g/l, Agar 20g/l, độ pH=5) đã bổ sung 1% mannan (locust bean gum, sigma, USA) được điều chế. Dung dịch enzym thô (mỗi dung dịch 1,5 μ l) được nhỏ giọt vào môi trường nền. Sau khi phản ứng được để diễn ra ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian từ 15 đến 18 giờ, hoạt tính của enzym được đo phụ thuộc vào việc liệu các vùng sạch đã được tạo ra hay chưa. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

2) Đo hoạt tính xenluloza

Dựa trên kết quả đánh giá, *Bacillus subtilis* CJBS16 và CJBS62 được phát hiện là có hoạt tính mannaza tốt nhất và hoạt tính xenluloza tốt nhất.

Bảng 2: Hoạt tính enzym tiêu hóa của các chủng đã sàng lọc (mm)

	CJBS16	CJBL215	CJBL219	CJBS62
Mannaza	5	0	2,5	3,5

Xenluloza	2	3	2	3,5
-----------	---	---	---	-----

(2) Hoạt tính phân hủy xenluloza của dịch nổi nuôi cấy

Bảng 3: Hoạt tính phân hủy xenluloza của dịch nổi nuôi cấy của các chủng đã sàng lọc (mm)

	CJBS16	CJBL215	CJBL219	CJBS62
Hoạt tính phân hủy xenluloza	16,5	16,5	14	24

Ví dụ 3: Sàng lọc chủng tiêu thụ lactat và chủng sản sinh axetat

Chủng tiêu thụ lactat được sàng lọc định lượng bằng phương pháp sinh màu có sử dụng BCP sau khi nuôi cấy trong môi trường được bổ sung lactat. Đầu tiên, môi trường được bổ sung lactat 15mM, dịch chiết nấm men 10g/l, Pepton 20g/l, NaCl 10g/l, và xanh bromophenol (BCP) 0,0004g/l được điều chế. Môi trường (mỗi môi trường 1,5ml) được phủ lên ống vi ly tâm và các ống này được cấy nhiễm bằng các chủng (mỗi chủng 50 μ l) đã nuôi cấy sơ bộ trong môi trường BHI (Difco). Các chủng được nuôi cấy ổn định trong các ống này ở nhiệt độ 37°C trong 4-5 ngày. Khi màu của môi trường chuyển từ màu vàng thành màu đỏ tía, các chủng được đánh giá sơ bộ sự tiêu thụ lactat trong môi trường. 117 chủng đã phân lập từ các mẫu được nuôi cấy và toàn bộ 4 chủng CJBS16, CJBL215, CJBL219, và CJBS62 được sàng lọc (Fig.2).

Môi trường BHI (Difco) được cấy nhiễm bằng CJBS16, CJBL215, CJBL219, và CJBS62 đã sàng lọc và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và 200 vòng/phút trong 16 giờ để hoạt hóa chúng. Môi trường đã bổ sung lactat 15mM, dịch chiết nấm men 10g/l, Pepton 20g/l, và NaCl 10g/l được cấy nhiễm bằng mỗi chủng (5%) và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và 200 vòng/phút trong 48 giờ. Sau khi nuôi cấy xong, BCP 10% được thêm vào canh thang nuôi cấy để xác nhận lại liệu lactat đã được tiêu thụ hay chưa. Kết quả là, bốn chủng được xác nhận là tiêu thụ lactat (màu của canh thang nuôi cấy chuyển từ màu vàng thành màu đỏ tía).

Ví dụ 4: Đo lượng lactat đã tiêu thụ và lượng axetat được tạo ra

(1) Đo lượng axetat được tạo ra

Canh thang nuôi cấy được ly tâm, 0,2ml axit metaphosphoric 25% được thêm vào 1ml dịch nổi lên trên thu được, tiếp theo ly tâm ở tốc độ 10000 vòng/phút trong 5 phút. Dịch nổi lên trên thu được được lọc qua bộ lọc 0,2 μ m và hàm lượng axetat của chúng được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí (GC: gas chromatography) (Agilent Technologies 7890A).

Bốn chủng tiêu thụ lactat tiêu thụ lactat để tạo ra axetat. Hàm lượng axetat được đo. Tỷ lệ biến đổi được biểu diễn bằng công thức 1:

Công thức 1

Tỷ lệ biến đổi của lượng lactat ban đầu thành axetat (%) = (lượng axetat đã tạo ra/lượng lactat ban đầu)*100

Kết quả là, tỷ lệ biến đổi lactat-thành-axetat của CJBL219 là cao nhất (59,4%) và tỷ lệ này của CJBL215 là 44,9% (bảng 4, Fig.3).

Bảng 4: Lượng axetat được tạo ra sau khi tiêu thụ lactat trong môi trường và tỷ lệ chuyển hóa

Chủng	Hàm lượng axetat (mM)	Tỷ lệ chuyển hóa được tính bởi công thức 1 (%)
CJBL219	8,91	59,4
CJBL215	6,74	44,9
CJBS16	3,74	24,9
CJBS62	1,99	13,3

(2) Đo lượng lactat đã tiêu thụ và lượng axetat được tạo ra bởi các chủng đã sàng lọc

Lượng lactat đã tiêu thụ và axetat được tạo ra bởi các chủng đã sàng lọc trong môi trường được định lượng.

Môi trường BHI (Difco) được cấy nhiễm bằng CJBS16, CJBL215, CJBL219, và CJBS62 đã sàng lọc và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và 200 vòng/phút trong 16 giờ để hoạt hóa chúng.

Môi trường đã bổ sung lactat 15mM, dịch chiết nấm men 10g/l, Pepton 20g/l,

và NaCl 10g/l được cấy nhiễm bằng mỗi chủng (5%) và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và 200 vòng/phút trong 48 giờ. Ở thời điểm 9 giờ và 48 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, mẫu được thu hồi.

1) Định lượng lactat

2) Định lượng axetat

Mỗi canh thang nuôi cấy được ly tâm, 0,2ml axit metaphosphoric 25% được thêm vào 1ml dịch nổi lên trên thu được, tiếp theo ly tâm ở tốc độ 10000 vòng/phút trong 5 phút. Dịch nổi lên trên thu được được lọc qua bộ lọc 0,2µm và hàm lượng axetat của chúng được phân tích bằng phương pháp GC (Agilent Technologies 7890A). Kết quả được thể hiện trong Bảng 5 và Fig.4 và Fig.5.

Công thức 2

Tỷ lệ biến đổi của lượng lactat đã tiêu thụ thành axetat (%) = (lượng axetat đã tạo ra/lượng lactat đã tiêu thụ) *100

Bảng 5: Hàm lượng của lactat và axetat trong môi trường ở các thời điểm khác nhau trong quá trình nuôi cấy và tỷ lệ chuyển hóa

		0 giờ	9 giờ	48 giờ
CJBL215	Lượng lactat (mM)	13,12	8,35	6,59
	Lượng axetat (mM)	0	2,50	5,94
	Tỷ lệ chuyển hóa được tính bởi công thức 2 (%)		52,4	91,1
CJBL 219	Lượng lactat (mM)	13,12	8,52	6,74
	Lượng axetat (mM)	0	2,87	6,49
	Tỷ lệ chuyển hóa được tính bởi công thức 2 (%)		62,4	101,8

Ví dụ 5: Độ ổn định của các chủng này

(1) Xác nhận sự tan huyết của các chủng này

(2) Xác định độ nhạy cảm của các chủng này với kháng sinh

Bảng 6: Mức ức chế sinh trưởng của các chủng bởi kháng sinh

Kháng sinh	Đường kính của vùng sạch xung quanh kháng sinh (mm)		
	CJBL215	CJBL219	CJBS62

Amp10 (Ampixilin)	10	8	10
C30 (Clindamycin)	14	4	9
CN120 (Gentamixin)	18	12	12
K30 (Kanamycin)	13	9	10
TE30 (Tetracyclin)	5	8	12
VA30 (Vancomycin)	9	6	7
E15 (Erythromycin)	13	13	11
SAM20 (Ampixilin/Sulbactam)	15	12	13
S10 (Chloramphenicol)	3	3	6
DA2 (Streptomycin)	6	7	9

Ví dụ 6: Điều chế chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa các chủng vi khuẩn

9l canh thang đậu tương (soy broth) chứa tryptic được cấy nhiễm bằng mỗi trong số các chủng bacillus CJBL215, CJBL219, và CJBL62 (hai loài của *Bacillus licheniformis* và một loài của *Bacillus subtilis*) và nuôi cấy ở nhiệt độ 36°C trong 36 giờ.

Ví dụ 7: Tác dụng của chất phụ gia thức ăn chăn nuôi lên đặc tính lên men trong dạ cỏ phụ thuộc vào cơ chất

Thử nghiệm được thực hiện để nghiên cứu tác dụng của chất phụ gia thức ăn chăn nuôi lên sự cải thiện khả năng tiêu hóa chất khô và sự gia tăng axetat bằng cách sử dụng hệ nuôi cấy ổn định trong mô hình dạ cỏ.

* Nhóm đối chứng: Các chủng được nuôi cấy trong cùng các điều kiện như nhóm xử lý, ngoại trừ là chất phụ gia thức ăn chăn nuôi không được thêm vào.

Mỗi nhóm xử lý và nhóm đối chứng được nuôi cấy trong tủ áp tĩnh ở nhiệt độ 39°C và hàm lượng lactat của nó, hàm lượng axetat, độ pH, và khả năng tiêu hóa chất khô được đo bằng các phương pháp sau:

Công thức 3

Khả năng tiêu hóa chất khô (%) = (Lượng cơ chất trước khi nuôi cấy - Lượng cơ chất sau khi nuôi cấy)/Lượng cơ chất trước khi nuôi cấy * 100

Lượng cơ chất trước khi nuôi cấy và lượng cơ chất sau khi nuôi cấy được đo sau khi lọc canh thang nuôi cấy qua giấy lọc bằng cách sử dụng bơm chân không và làm khô ở nhiệt độ 60°C qua đêm.

Các thay đổi về nồng độ lactat và axetat trong nhóm xử lý và nhóm đối chứng được đo ở các thời điểm khác nhau trong quá trình nuôi cấy. Kết quả được thể hiện trên Fig.6 và Fig.7.

Theo Fig.6, nồng độ tối thiểu của lactat trong nhóm xử lý là ~10% thấp hơn trong nhóm đối chứng. Theo Fig.7, nồng độ tối đa của axetat trong nhóm xử lý gấp ~2,5 lần nồng độ đó trong nhóm đối chứng.

Giá trị độ pH và giá trị khả năng tiêu hóa chất khô (%) của nhóm xử lý và nhóm đối chứng được thể hiện trên Fig.8, Fig.9, và Fig.10 (tương ứng).

Theo Fig.8, độ pH của nhóm đối chứng thấp hơn 0,5 so với giá trị ban đầu của nó, trong lúc đó độ pH của nhóm xử lý thấp hơn 0,42 so với giá trị ban đầu của nó. Các kết quả cho biết rằng chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có tác dụng làm ổn định dạ cỏ.

Theo Fig.9 và Fig.10, giá trị khả năng tiêu hóa chất khô của nhóm xử lý bằng cách sử dụng thức ăn chăn nuôi đậm đặc và cơ chất TMR được đo là cao hơn 4% và 1,3% so với giá trị đó của nhóm đối chứng, tương ứng. Kết luận là, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể cải thiện khả năng tiêu hóa trong dạ cỏ và có thể làm tăng sự sản sinh axetat, cho thấy sự ảnh hưởng tích cực lên việc gia tăng chất béo sữa.

Ví dụ 8: Tác dụng của chất phụ gia thức ăn chăn nuôi để gia tăng chất béo sữa lên sản lượng sữa của bò sữa

Kết quả của việc cho bò sữa ăn liên tục chất phụ gia thức ăn (mỗi 20g trên mỗi đầu động vật mỗi ngày), chất béo sữa tăng 0,3%p, như thể hiện trên bảng 7. Như có thể nhận thấy từ các kết quả trong bảng 8, nhóm đối chứng cho thấy không có sự thay đổi về mức protein sữa nhưng nhóm xử lý thể hiện sự cải thiện đáng kể về mức protein sữa (0,1%p). Quan sát thấy không có sự thay đổi đáng kể về sản lượng sữa trong nhóm đối chứng, nhưng quan sát thấy có sự gia tăng đáng kể sản lượng sữa (0,4 kg) trong nhóm xử lý (bảng 9).

Từ kết quả nêu trên kết luận rằng chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có ảnh hưởng tích cực lên sự cải thiện chất béo sữa, protein sữa, và sản lượng sữa, thu được sữa với năng suất và chất lượng cao từ bò sữa.

Bảng 7: Tác dụng của chất phụ gia thức ăn chăn nuôi lên sự cải thiện chất béo sữa

	Nhóm đối chứng	Nhóm xử lý
Trước khi bắt đầu (trung bình trong 3 tuần)	4,7%	4,7%
Sau khi cho ăn (trung bình trong 4 tuần)	4,7%	5,0%
Lượng tăng về chất béo sữa (%p)	0,0	0,3

Bảng 8: Tác dụng của chất phụ gia thức ăn chăn nuôi lên sự cải thiện protein sữa

	Nhóm đối chứng	Nhóm xử lý
Trước khi bắt đầu (trung bình trong 3 tuần)	3,4%	3,2%
Sau khi cho ăn (trung bình trong 4 tuần)	3,4%	3,3%
Lượng tăng về protein sữa (%p)	0,0	0,1

Bảng 9: Tác dụng của chất phụ gia thức ăn chăn nuôi lên việc cải thiện sản lượng sữa

	Nhóm đối chứng	Nhóm xử lý
Trước khi bắt đầu (trung bình trong 3 tuần)	27,9kg	31,9kg
Sau khi cho ăn (trung bình trong 4 tuần)	28,0kg	32,3kg
Lượng tăng về sản lượng sữa (kg)	0,1	0,4

Ví dụ 9: Tác dụng của chất phụ gia thức ăn chăn nuôi để gia tăng chất béo sữa lên năng suất của bò sữa khi tiếp xúc với ứng suất nhiệt độ cao vào mùa hè

Đối với nhóm đối chứng, thức ăn chăn nuôi không chứa chất phụ gia thức ăn chăn nuôi được cung cấp cho bò sữa trong 4 tuần trong môi trường không có ứng suất nhiệt độ cao. Đối với nhóm xử lý, thức ăn chăn nuôi chứa 0,2% trọng lượng chất phụ gia thức ăn chăn nuôi được cung cấp cho bò sữa ở môi trường có ứng suất nhiệt độ cao trong 4 tuần. Thành phần cơ bản của thức ăn chăn nuôi cung cấp cho nhóm xử lý là giống như thành phần cơ bản của thức ăn chăn nuôi cung cấp cho nhóm đối chứng.

Bảng 10: Tác dụng của chất phụ gia thức ăn chăn nuôi lên năng suất sữa vào mùa hè

	Chất béo sữa	Năng suất sữa
Nhóm đối chứng	3,7%	36,2kg
Nhóm xử lý	3,9%	36,7kg
Lượng tăng	0,2%p	0,5kg

Theo bảng 10, chất béo sữa và sản lượng sữa đo được trong nhóm xử lý được phát hiện là tương ứng cao hơn 0,2%p và 0,5kg so với chất béo sữa và sản lượng sữa đo được trong nhóm đối chứng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi để gia tăng chất béo trong sữa và sản lượng sữa chứa chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis*, trong đó chủng *Bacillus subtilis* bao gồm *Bacillus subtilis* CJBS62 (KCCM12039P).
2. Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi để gia tăng chất béo trong sữa và sản lượng sữa chứa chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis*, trong đó chủng *Bacillus licheniformis* bao gồm một hoặc nhiều chủng được lựa chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus licheniformis* CJBL215 (KCCM12040P) và *Bacillus licheniformis* CJBL219 (KCCM12041P).
3. Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mỗi chủng *Bacillus subtilis* và mỗi chủng *Bacillus licheniformis* có mật độ lập ở nồng độ ít nhất bằng 1×10^7 cfu mỗi gam chất phụ gia thức ăn chăn nuôi.
4. Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chủng *Bacillus licheniformis* tạo ra axetat khi được nuôi cấy trong môi trường chứa lactat trong khoảng thời gian từ 9 đến 48 giờ và chuyển hóa từ 30% đến 70% lượng lactat ban đầu thành axetat.
5. Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chủng *Bacillus subtilis* và chủng *Bacillus licheniformis* được trộn với tỷ lệ trọng lượng nằm trong khoảng từ 1:9 đến 9:1.
6. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chất phụ gia thức ăn chăn nuôi như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

Fig.1

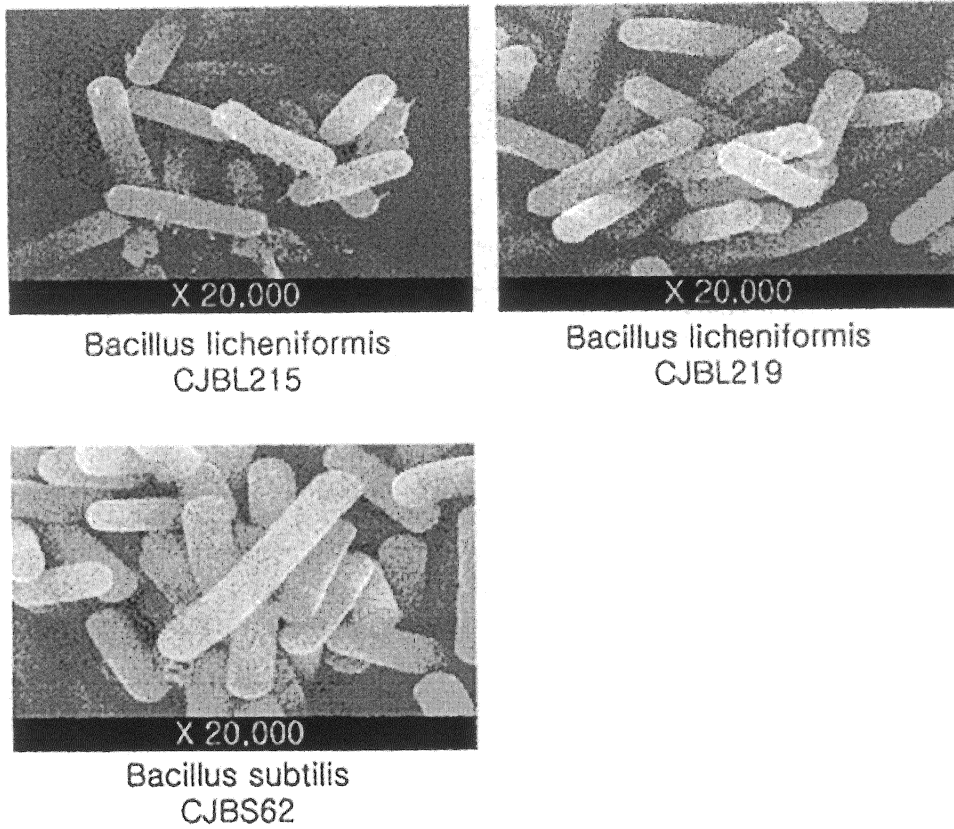
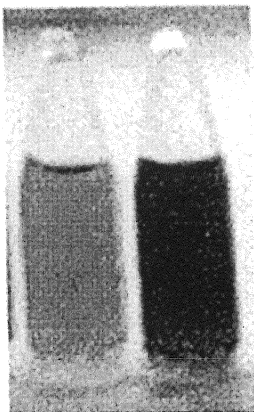


Fig.2



Đối chứng Chứng tiêu
thụ lactat

Fig.3

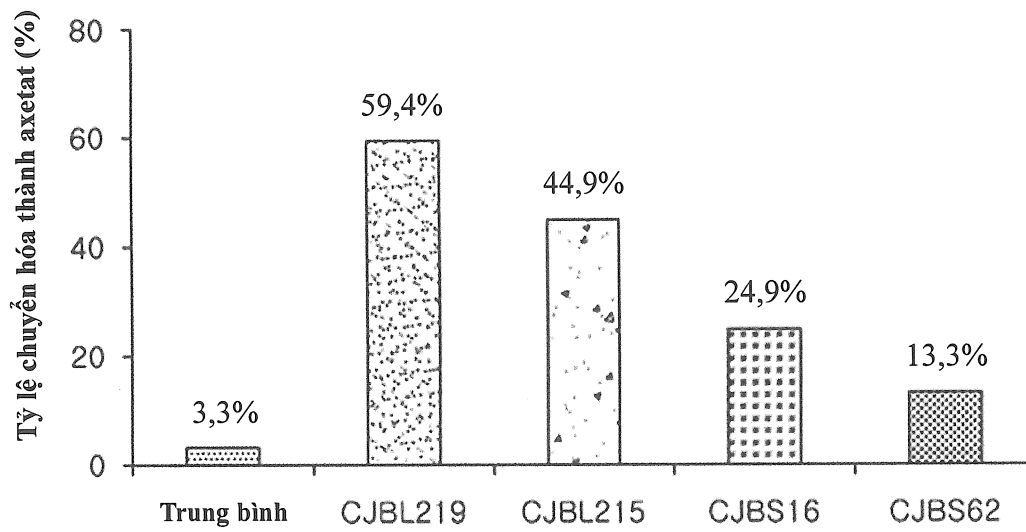


Fig.4

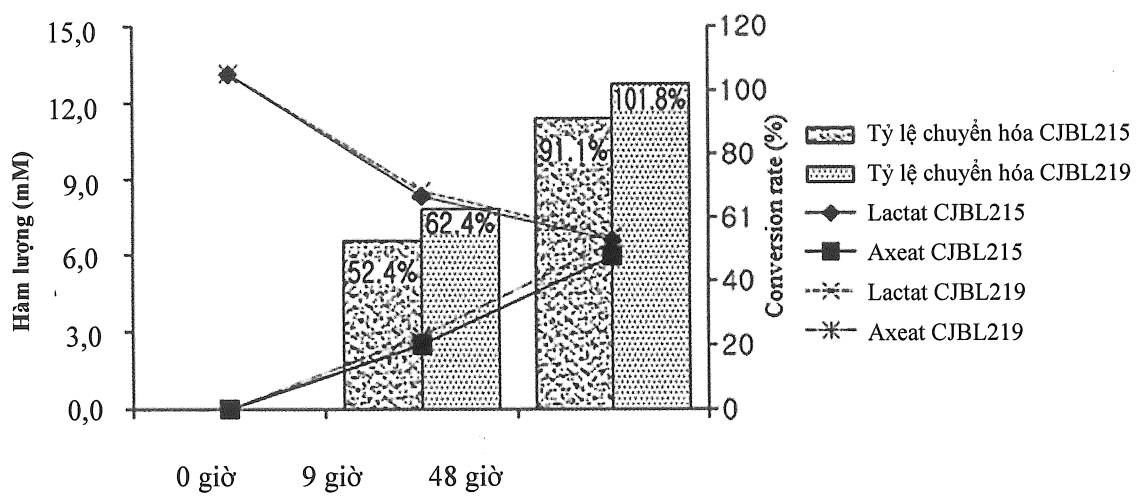


Fig.5

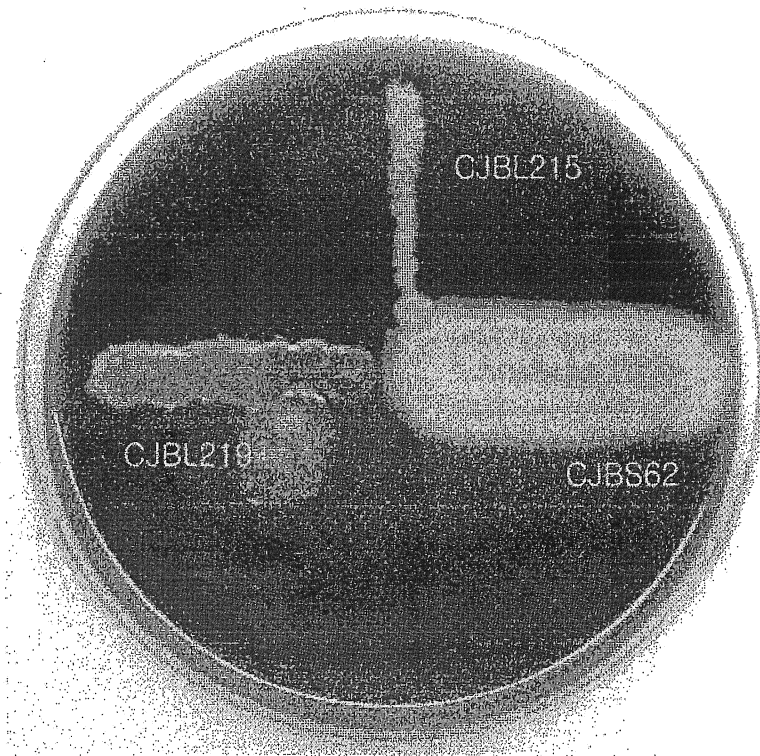


Fig.6

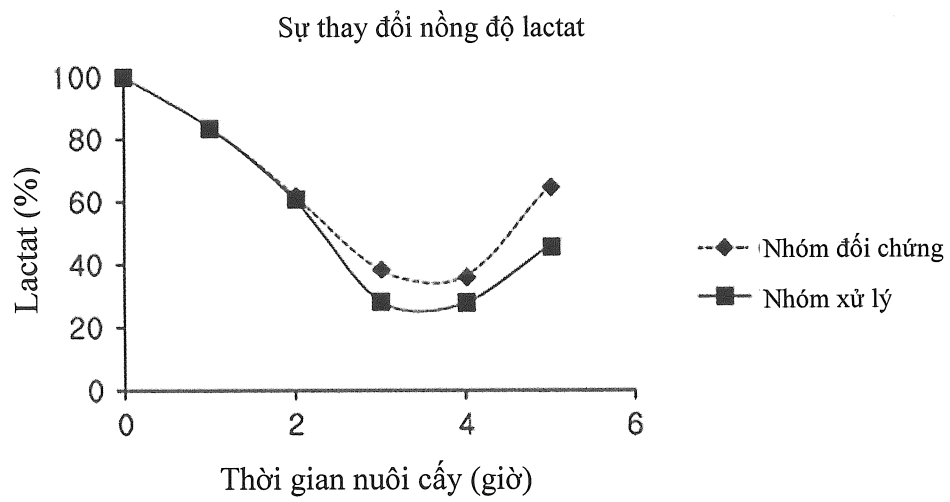


Fig.7

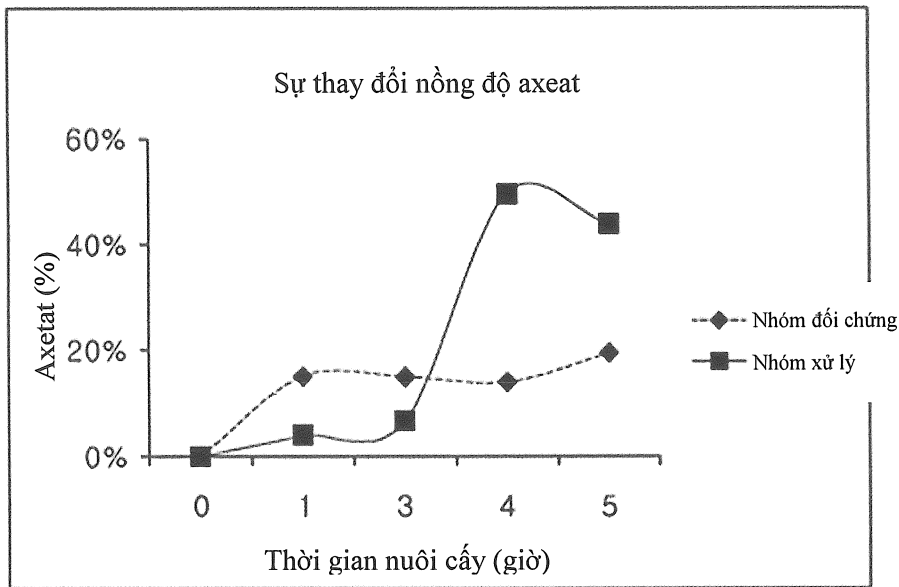


Fig.8

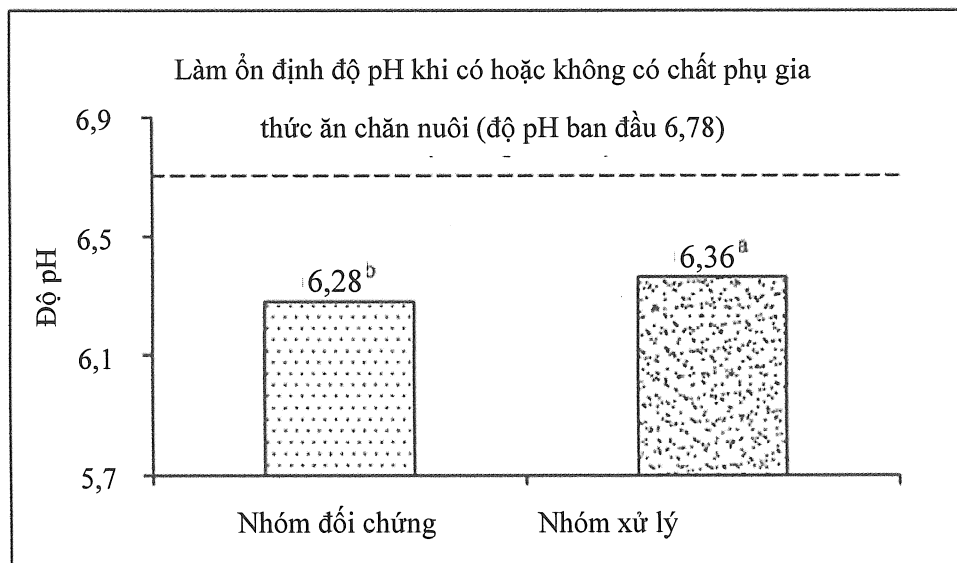


Fig.9

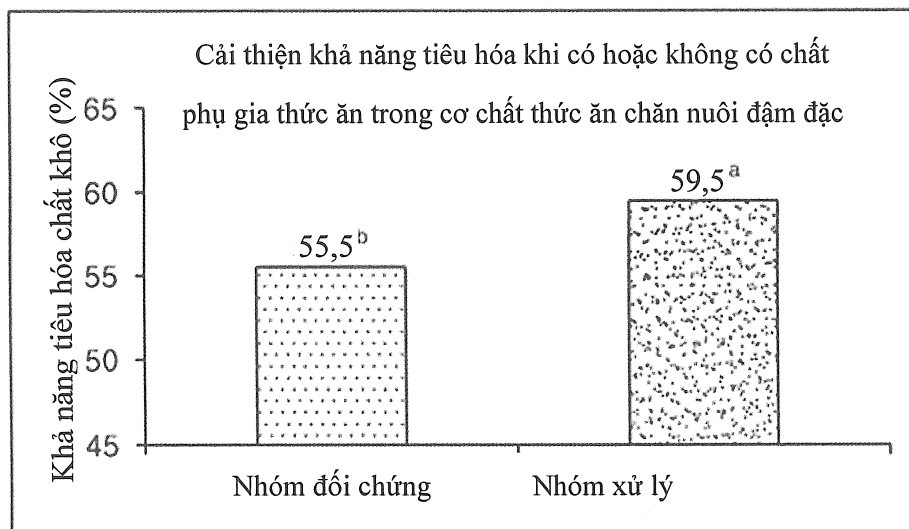
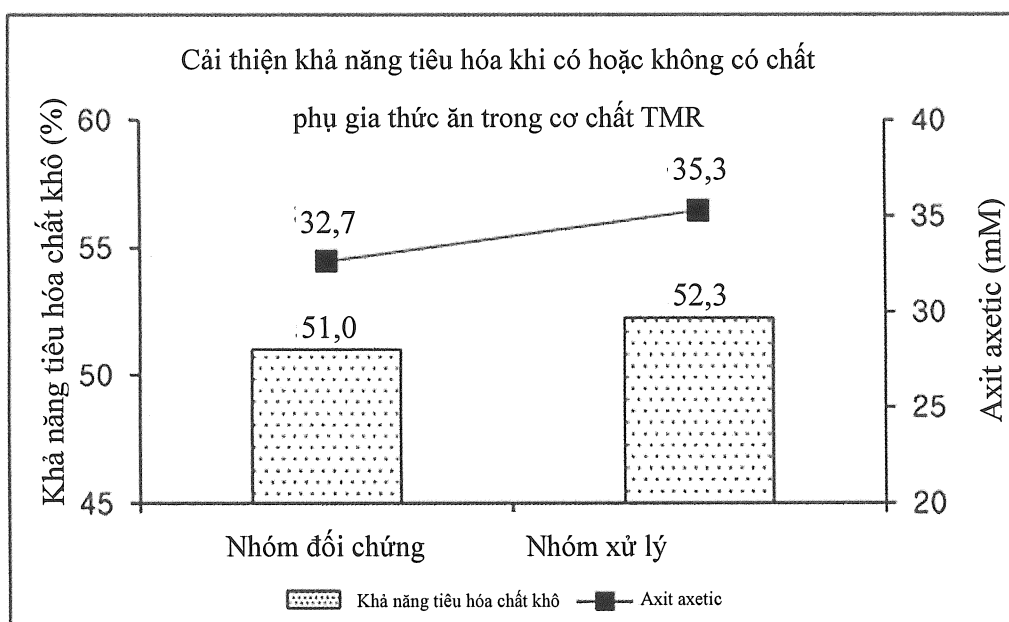


Fig.10



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	CJ CHEILJEDANG CORPORATION	
<120>	Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa <i>Bacillus subtilis</i> và <i>Bacillus Licheniformis</i> và chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chất phụ gia thức ăn chăn nuôi	
<130>	P17-6153	
<160>	3	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	1506	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	CJBL215 16s rADN	
<400>	1	
	tcacctttttt cgggtttccc ctttacgact tcacccaat catctgtccc accttcggcg	60
	gctggctcca aaaggttacc tcaccgactt cgggtgttac aaactctcgt ggtgtgacgg	120
	gcggtgtgta caaggcccgg gaacgtattc accgcggcat gctgatccgc gattactagc	180
	gattccagct tcacgcagtc gagttgcaga ctgcgatccg aactgagaac agatttgtgg	240
	gattggctta gcctcgcggc ttcgctgccc tttgttctgc ccattgtagc acgtgtgtag	300
	cccaggtcat aaggggcatg atgatttgac gtcacccca ccttcctccg gtttgtcacc	360
	ggcagtcacc ttagagtgcc caactgaatg ctggcaacta agatcaaggg ttgcgctcgt	420
	tgcgggactt aaccaacat ctacgcacac gagctgacga caaccatgca ccacctgtca	480
	ctctgcccc gaaggggaag ccctatctct agggttgtca gaggatgtca agacctggta	540
	aggttcttcg cgttgcttcg aattaaacca catgctccac cgcttgtgcg ggccccgctc	600
	aattcctttg agtttcagtc ttgcgaccgt actccccagg cggagtgcctt aatgcgtttg	660
	ctgcagcact aaaggcgga aaccctctaa cacttagcac tcatcgttta cggcgtggac	720
	taccagggtta tctaatacctg ttcgctcccc acgctttcgc gcctcagcgt cagttacaga	780
	ccagagagtc gccttcgcca ctggtgttcc tccacatctc tacgcatttc accgctacac	840
	gtggaattcc actctcctct tctgcactca agttccccag tttccaatga ccctccccgg	900
	ttgagccggg ggctttcaca tcagacttaa gaaaccgcct gcgcgcgctt tacgccaat	960
	aattccggac aacgcttgcc acctacgtat taccgcggt gctggcacgt agttagccgt	1020
	ggctttctgg tcaggtaccg tcaaggtacc gccctattcg aacggtactt gttcttccct	1080
	aacaacagag ttttacgatc cgaaaacctt catcactcac gcggcggttg tccgtcagac	1140

```

tttcgtccat tgcggaagat tccctactgc tgcctcccggt aggagtctgg gccgtgtctc 1200
agtcccagtg tggccgatca ccctctcagg tcggctacgc atcgttgcct tggtagagccg 1260
ttacctcacc aactagctaa tgcgccgcgg gtccatctgt aagtggtagc taaaagccac 1320
cttttatgtt tgaaccatgc ggttcaaaca agcatccggt attagccccg gtttcccgga 1380
gttatcccag tcttacaggc aggttaccca cgtgttactc acccgtcgc cgctaacatc 1440
agggagcaag ctcccatctg tccgctcgac ttgcatgtat taggcacgcc gccagcgttc 1500
gtctga 1506

```

```

<210>      2
<211>      1504
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>      CJBL219 16s rADN

```

```

<400>      2
ttttttccgg tttccccttt acgacttcac cccaatcatc tgtcccacct tcggcggctg 60
gctccaaaag gttacctcac cgacttcggg tgttaciaaac tctcgtggtg tgacggggcg 120
tgtgtacaag gcccgggaac gtattcaccg cggcatgctg atccgcgatt actagcgatt 180
ccagcttcac gcagtcgagt tgcagactgc gatccgaact gagagcagat ttgtgggatt 240
ggcttagcct cgcggtctcg ctgccctttg ttctgccccat tgtagcacgt gtgtagccca 300
ggtcataagg ggcatgatga tttgacgtca tccccacctt cctccggttt gtcaccggca 360
gtcaccttag agtgcccaac tgaatgctgg caactaagat caagggttgc gtcggttgcg 420
ggacttaacc caacatctca cgacacgagc tgacgacaac catgcaccac ctgtcactct 480
gccccgaag ggggaagcct atctctaggg gtgtcagagg atgtcaagac ctggtaaggt 540
tcttcgcgtt gcttcgaatt aaaccacatg ctccaccgct tgtgcggggc cccgtcaatt 600
cctttgagtt tcagtcttgc gaccgtactc ccaggcgga gtgcttaatg cgtttgctgc 660
agcactaaag ggcggaaacc ctctaact tagcactcat cgtttacggc gtggactacc 720
agggtatcta atcctgttcg ctccccacgc tttcgcgcct cagcgtcagt tacagaccag 780
agagtcgcct tcgccactgg tgttcctcca catctctacg catttcaccg ctacacgtgg 840
aattccactc tcctcttctg cactcaagtt cccagtttc caatgaccct ccccggttga 900
gccgggggct ttcacatcag acttaagaaa ccgcctgcgc gcgctttacg cccaataatt 960
ccggacaacg cttgccacct acgtattacc gcggctgctg gcacgtagtt agccgtggct 1020
ttctgggttag gtaccgtcaa ggtaccgccc tgttcgaacg gtacttggtc ttccctaaca 1080

```

```

acagagtttt acgatccgaa aaccttcac cactcacgcg cgttgctccg tcagactttc      1140
gtccattgcg gaagattccc tactgctgcc tcccgtagga gtctggggccg tgtctcagtc      1200
ccagtgtggc cgatcaccct ctcaggctcg ctacgcacgc tcgccttggt gagccgttac      1260
ctcaccaact agctaatacg cgcggggtcc atctgtaagt ggtagctaaa agccaccttt      1320
tataattgaa ccatgcggtt caatcaagca tccggtatta gccccgggtt cccggagtta      1380
tcccagtctt acaggcaggt taccacagtg ttactcacc gtccgccgct aacctaaagg      1440
agcaagctcc cgtcgggttc ctcgacttgc atgtattagg cagcccgcca gcgttcgtcc      1500
tgac                                          1504

```

```

<210>      3
<211>      1490
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>      CJBS62 16s rADN

```

```

<400>      3
ccccttacga cttcacccca atcatctgtc ccaccttcgg cggctggctc ctaaaagggt      60
acctcaccca cttcgggtgt tacaaactct cgtggtgtga cgggcgggtg gtacaaggcc      120
cgggaacgta ttcaccgcgg catgctgac cgcgattact agcgattcca gcttcacgca      180
gtcgagttgc agactgcat ccgaactgag aacagatttg tgggattggc ttaacctcgc      240
ggtttcgctg ccctttgttc tgtccattgt agcacgtgtg tagcccaggc cataaggggc      300
atgatgattt gacgtcatcc ccaccttcct ccggtttgtc accggcagtc accttagagt      360
gcccaactga atgctggcaa ctaagatcaa gggttgcgct cgttgcgga cttaacccaa      420
catctcacga cagagctga cgacaaccat gcaccacctg tcaactctgcc cccgaagggg      480
acgtcctatc tctaggattg tcagaggatg tcaagacctg gtaagggttct tcgcgttgct      540
tcgaattaaa ccacatgctc caccgcttgt gcgggcccc gtcaattcct ttgagtttca      600
gtcttgcgac cgtactcccc aggcgggagt cttaatgctg tagctgcagc actaaggggc      660
ggaaaccccc taacacttag cactcatcgt ttacggcgtg gactaccagg gtatctaata      720
ctgttcgctc cccacgcttt cgtcctcag cgtcagttac agaccagaga gtcgccttcg      780
ccactgggtg tctccacat ctctacgcat ttcaccgcta cacgtggaat tccactctcc      840
tcttctgcac tcaagttccc cagtttccaa tgacctccc cggttgagcc gggggctttc      900
acatcagact taagaaaccg cctgcgagcc ctttacgcc aataattccg gacaacgctt      960
gccacctacg tattaccgcg gctgctggca cgtagttagc cgtggctttc tggttaggta      1020

```

ccgtcaaggt accgccctat tcgaacggta cttgttcttc cctaacaaca gagctttacg	1080
atccgaaaac cttcatcact cacgcggcgt tgetccgtca gactttcgtc cattgcggaa	1140
gattccctac tgetgcctcc cgtaggagtc tgggccgtgt ctcagtccca gtgtggccga	1200
tcaccctctc aggtcggcta cgcacgtcgc ccttggtgag ccgttacctc accaactagc	1260
taatgcgccg cgggtccatc tgtaagtggc agccgaagcc accttttatg tttgaaccat	1320
gcggttcaaa caaccatccg gtattagccc cggtttcccg gagttatccc agtcttacag	1380
gcaggttacc cacgtgttac tcaccgctcc gccgctaaca tcaggagca agctcccatc	1440
tgtccgctcg acttgcattg attaggcacg ccgccagcgt tcgtctgacg	1490