



(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)



1-0036301

(51)⁷ C12N 1/20; C12R 1/225; A23K 10/16; (13) B
A23K 50/75

(21) 1-2019-00919

(22) 07/08/2017

(86) PCT/KR2017/008487 07/08/2017

(87) WO 2018/030730 15/02/2018

(30) 10-2016-0101355 09/08/2016 KR

(45) 25/07/2023 424

(43) 26/08/2019 377A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

(Ssangnim-dong) 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) KIM, Ji Eun (KR); CHAE, Kyeong Su (KR); KIM, Sung Hun (KR); CHEE, Seok Woo (KR); LEE, Joong Su (KR).

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

(54) CHỦNG LACTOBACILLUS SALIVARIUS CJLS1511 ĐƯỢC BẮT HOẠT, CHẾ PHẨM ĐỂ BỔ SUNG CHO THỨC ĂN ĐỘNG VẬT BAO GỒM CHỦNG NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng Lactobacillus salivarius CJLS1511 được bắt hoạt, chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật bao gồm chủng vi khuẩn này, và phương pháp tạo ra chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng *Lactobacillus salivarius* mới CJLS1511, chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật bao gồm chủng này hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó, và phương pháp tạo ra tế bào vi khuẩn được bất hoạt.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi sinh vật chủng *Lactobacillus* sp. là trực khuẩn que axit lactic mà thực việc hiện đồng lên men hoặc dị lên men, và thường tìm thấy trong ruột của động vật bao gồm con người, và quá trình lên men của sản phẩm sữa và rau. Vi sinh vật chủng *Lactobacillus* sp. là axit lactic sản xuất ra vi khuẩn thường tìm thấy trong đường ruột ở động vật, và thực việc hiện đồng lên men hoặc dị lên men sử dụng sản phẩm sữa và rau làm cơ chất của nó. Vi sinh vật chủng *Lactobacillus* sp. được biết đến là duy trì môi trường đường ruột ở điều kiện axit của động vật, ức chế tăng trưởng quá mức của vi khuẩn có hại như là *E. coli* và *Clostridium*, cải thiện bệnh tiêu chảy và táo bón ở động vật, và giúp tổng hợp vitamin, và giảm mức cholesterol trong huyết thanh, và có hoạt tính chống ung thư, v.v.

Các nghiên cứu đã được tiến hành trên tiền sinh vật làm chất bổ sung cho thức ăn theo các đặc tính được đề cập trên đây của vi sinh vật chủng *Lactobacillus* sp. Tiêu chảy do vi khuẩn ở vật nuôi dẫn đến giảm tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống sót. Do đó, để làm tăng sản xuất vật nuôi, các chất kháng sinh khác nhau đã được bổ sung vào chế độ ăn của động vật ở liều dùng được phẩm. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, vấn đề về kháng kháng sinh đã được bàn luận khắp thế giới bởi vì việc sử dụng quá mức của nó. Do đó, ở nhiều nước,

chính phủ bắt đầu hạn chế việc sử dụng các chất kháng sinh trong thức ăn động vật. (Công bố đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-1998-78358) (McEwen and Fedorka-Cray, Antimicrobial use and resistance in animals, Clinical infectious Diseases, Tập 34, tháng 6/2002, trang S93-S106).

(Tài liệu sáng chế 1) Công bố đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-1998-78358

Tài liệu không phải sáng chế

(Tài liệu không phải sáng chế 1) Clinical infectious Diseases, Tập 34, tháng 6/2002, trang S93-S106

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Sáng chế đề xuất chất bổ sung cho thức ăn chứa vi sinh vật chủng *Lactobacillus* sp. mới có khả năng tăng cường việc tăng trọng lượng cơ thể của động vật, tình trạng miễn dịch, khả năng chống bệnh tật của động vật và ức chế tăng trưởng quá mức của vi khuẩn có hại trong đường ruột của động vật.

Giải pháp kỹ thuật

Theo một phương án làm ví dụ của sáng chế, sáng chế đề xuất *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó.

Theo một phương án làm ví dụ khác của sáng chế, sáng chế đề xuất chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật bao gồm *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó.

Theo một phương án làm ví dụ khác của sáng chế, sáng chế đề xuất dạng chất bổ sung cho thức ăn động vật như được mô tả trên đây.

Theo một phương án làm ví dụ khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt

(KCCM11829P), phương pháp này bao gồm:

nuôi cấy *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) để tạo ra dung dịch nuôi cấy,

gia nhiệt dung dịch nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 160°C,

làm mát dung dịch nuôi cấy đã được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 60°C, và

tách *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P) từ dung dịch nuôi cấy được làm mát.

Tác dụng có lợi của sáng chế

Lactobacillus salivarius CJLS1511 theo một phương án làm ví dụ của sáng chế hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó có thể có khả năng làm thoái biến lipid trung tính, hấp phụ nội độc tố, ức chế việc tăng trưởng vi khuẩn gây bệnh, và tăng cường hoạt tính enzym tiêu hóa rất tốt.

Chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật hoặc thức ăn hỗn hợp của nó, bao gồm *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 theo một phương án làm ví dụ của sáng chế hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó, có thể tăng cường hiệu suất tăng trưởng động vật và cải thiện tình trạng miễn dịch nhờ đó giúp cho động vật chống chịu được với bệnh tật có nguồn gốc từ mầm bệnh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

Hình 1 thể hiện ảnh hiển vi điện tử của chủng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó.

Hình 2 thể hiện cây phát sinh loài của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Những nội dung mà không

được mô tả trong bản mô tả này có thể là kiến thức phổ biến hoặc tìm hiểu được bởi chuyên gia trong ngành hoặc ngành tương tự, và do đó, việc mô tả chi tiết về chúng được bỏ qua.

Theo một phương án làm ví dụ của sáng chế, sáng chế đề xuất *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó.

“Tế bào vi khuẩn được bất hoạt của the *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P)” có thể là, ví dụ, *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) chết, cụ thể hơn là, *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt bằng cách gia nhiệt.

Tác giả sáng chế đã gom đầu của ruột nhỏ từ gà giò, rửa với nước khử trùng làm thành vĩa trên môi trường MRS có bổ sung 0,001% bromphenicol đỏ tía (BCP), và được nuôi cấy yếm khí ở 37°C. Ở đây, khoảng 50 chủng sản xuất ra axit lactic được chọn và được cấy chuyển. Các chủng này được đưa vào tách thứ cấp bằng phương pháp tách hình thái, nhờ đó thu được 24 loại trực khuẩn. 24 loại trực khuẩn được đưa vào tách thứ ba bằng cách so sánh khi xét đến khả năng có hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính tiêu hóa enzym, nhờ đó thu được 10 chủng. Đo độ bền mật, độ bền axit, và khả năng bám dính vào thành tế bào đường ruột động vật của chủng sản xuất ra axit lactic, và trong số chúng, một chủng trong đó đường lên men, ức chế việc tăng trưởng vi khuẩn gây bệnh, hoạt tính tiêu hóa enzym, và làm thoái biến lipid trung tính là tốt nhất, được tách.

Chủng sản xuất ra axit lactic được tách được định rõ là *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 và được ký gửi vào ngày 12/04/2016 (Số ký gửi: KCCM11829P) ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms - KCCM).

Các đặc tính về hình thái và sinh lý của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

[Bảng 1]

1. Các đặc tính hình thái học (hình thái học khi tăng trưởng trong môi trường MRS rắn)	
- Hình dạng tế bào	Trực khuẩn que
- Tính đa hình của tế bào	Không
- Tính linh hoạt	Không
- Hình thành vô tính	Không
2. Các đặc tính về sinh lý	
- Vết gram	Gram dương
- Catalaza	Âm tính
- Oxidaza	Âm tính
- Nhiệt độ và thời gian phát triển	37°C, 18 đến 48 giờ
- Yêu cầu về oxy	Yếm khí ngẫu nhiên

Ngoài ra, *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 có dạng que như được thể hiện trên Hình 1, và không hình thành bào tử. Khi chủng bị giết, sự khác nhau giữa các tế bào sống và tế bào chết được khẳng định bằng hoạt tính glycoprotein trên bề mặt thành tế bào.

Phân tích hóa sinh về *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được tiến hành bằng cách sử dụng kit API. Kết quả là, nó được nhận diện là có khả năng lên men hydrat cacbon là tương tự với chủng tiêu chuẩn *Lactobacillus salivarius* ATCC11741 hoặc KCCM 40210, như được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây. Theo phân tích 16s rRNA mà được tiến hành bởi Macrogen, Inc., nó được nhận

điện là có các đặc tính sinh học phân tử 99% là tương tự với chủng tiêu chuẩn *Lactobacillus salivarius* ATCC11741 hoặc KCCM 40210, như được thể hiện trên Hình 2.

[Bảng 2]

Phân tích về việc sử dụng đường của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511

Số	Loại carbohydrat	<i>Lactobacillus salivarius</i> CJLS1511
0	Temoin	-
1	Glyxerol	-
2	Erythritol	-
3	D-arabinoza	-
4	L-arabinoza	-
5	D-riboza	-
6	D-xyloza	-
7	L-xyloza	-
8	D-adonito	-
9	Metyl- α D-xylopyranozit	+
10	D-galactoza	+
11	D-glucoza	+
12	D-fructoza	+
13	D-manoza	-
14	L-sorboza	-
15	L-ramnoza	-
16	D-ulxitol	-

17	Inositol	+
18	D-manitol	+
19	D-sorbitol	+
20	Metyl- α D-manopyranozit	-
21	Metyl- α D-glucopyranozit	-
22	N-axetylglucosamin	+
23	Amygdalin	-
24	Arbutin	+
25	Asculin	-
26	Salixin	+
27	D-xelobioza	-
28	D-maltoza	+
29	D-lactoza	+
30	D-mellibioza	+
31	D-sacaroza	+
32	D-trehaloza	+
33	Inulin	-
34	D-melesitoza	-
35	D-rafinoza	+
36	Amidon	-
37	Glycogen	-
38	Xylitol	-
39	Genthiobioza	-
40	D-turanoza	-

41	D-lyxoza	-
42	D-tagatoza	-
43	D-fucoza	-
44	L-fucoza	-
45	D-arabitol	-
46	L-arabitol	-
47	Gluconat	-
48	2-ketogluconat	-
49	5-ketogluconat	-

Lactobacillus salivarius CJLS1511 (KCCM11829P) có thể có độ bền axit, độ bền mật, hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính tiêu hóa enzym, và làm thoái biến lipid trung tính rất tốt, và có thể cải thiện hiệu quả tác dụng của thức ăn và tăng trọng lượng cơ thể của động vật khi được sử dụng làm thành phần bổ sung cho thức ăn động vật hoặc thức ăn hỗn hợp của nó.

Lactobacillus salivarius CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P) thể hiện khả năng ức chế bám dính cạnh tranh với vi khuẩn có hại ở đường ruột, nhờ đó góp phần vào việc hình thành vi sinh vật đường ruột, và axit lipoteichoic, mà là thành phần thành tế bào mà được rửa trôi trong khi màng tế bào của tế bào vi khuẩn được bất hoạt bị hủy hoại trong ruột nhỏ, có thể can thiệp với việc tạo khuẩn lạc của vi khuẩn có hại ở đường ruột trong màng ruột. Ngoài ra, *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P) có tính kỵ nước và tính keo tụ cao hơn so với của các tế bào sống, và do đó, có thể gắn vào vi sinh vật gây bệnh và nội độc tố tốt hơn so với các tế bào sống, nhờ đó cải thiện khả năng chống bệnh tật. Hơn nữa, khi động vật được cho ăn với vi khuẩn của

Lactobacillus salivarius CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P), có thể cải thiện được cả hai tiêu chí là trọng lượng cơ thể động vật và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn.

Lactobacillus salivarius CJLS1511 (KCCM11829P) hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó còn có thể bao gồm thêm tác nhân bảo vệ. Các ví dụ về tác nhân bảo vệ bao gồm ít nhất là một loại trong số nấm men, phân chiết nấm men, monosacarit, polysacarit, tinh bột, và đường như là đường thô và đường tinh chế. Cụ thể là, tác nhân bảo vệ có thể bao gồm ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm phân chiết nấm men, dextroza và đường thô. Khi tác nhân bảo vệ được sử dụng, có thể ngăn ngừa *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó khỏi môi trường bên ngoài để ngăn ngừa nhiễm bẩn, và kéo dài thời gian bảo quản của nó.

Theo một phương án làm ví dụ khác của sáng chế, sáng chế đề xuất chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật bao gồm *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó. Cụ thể là, chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật có thể bao gồm tế bào vi khuẩn của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P).

Chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật còn có thể bao gồm thêm tá dược. Tá dược không bị giới hạn cụ thể, và có thể là tá dược bất kỳ mà thường được sử dụng trong ngành. Các ví dụ về tá dược có thể bao gồm sacarit như là lactoza, D-manitol, D-sorbitol, sucroza, v.v., gồm như là gồm xantan, gồm guar, gồm arabic, v.v., tinh bột như là tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, v.v., muối vô cơ như là canxi phosphat, canxi sulfat, canxi cacbonatsacarit kết tủa, v.v.

Chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật có thể bao gồm *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó

như được mô tả trên đây với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ cfu đến $1,0 \times 10^{10}$ cfu cho 1 g chế phẩm. Cụ thể, lượng này có thể nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ cfu đến $3,0 \times 10^9$ cfu, và có thể bằng 5×10^8 cfu cho mỗi 1g chế phẩm làm một ví dụ.

phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật có thể có dạng bột, viên, hạt, và tương tự. Lượng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó trong chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10% theo trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 7% theo trọng lượng. Khi chế phẩm bao gồm chủng hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó với lượng nằm trong khoảng được mô tả trên đây, có thể tối đa hóa việc làm thoái biến lipid trung tính, hấp phụ nội độc tố, ức chế việc tăng trưởng vi khuẩn gây bệnh, và làm tăng hoạt tính enzym tiêu hóa của chế phẩm để bổ sung cho chế độ ăn của động vật.

Theo một phương án làm ví dụ khác của sáng chế, sáng chế đề xuất thức ăn động vật được tạo ra bằng cách sử dụng chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật như được mô tả trên đây. Thức ăn động vật có thể được tạo ra bằng cách trộn chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật theo một phương án làm ví dụ của sáng chế với thức ăn động vật thông thường. Lượng chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật theo sáng chế trong thức ăn động vật có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1% theo trọng lượng của tổng trọng lượng thức ăn động vật.

Thức ăn động vật không bị giới hạn cụ thể, và có thể là thức ăn dùng cho động vật nuôi. Thuật ngữ “động vật nuôi” là để chỉ động vật và thú cưng để sản xuất ra sản phẩm động vật và sản phẩm dạng nước mà hữu dụng cho con người, như là sữa, thịt, trứng, lông, da, lông vũ, v.v. Cụ thể là, thức ăn động vật được đề xuất cho động vật nuôi như là chó, bò, gà, lợn, ngựa, v.v. Cụ thể hơn là, nó có thể

được đề xuất cho gia cầm, cụ thể hơn là gà giò.

Thức ăn động vật có thể bao gồm các thành phần như là hydrat cacbon, protein, lipit, vitamin, khoáng chất, v.v., các loại này là các chất dinh dưỡng cơ bản đối với sự tăng trưởng của động vật. ‘Protein’ có thể là protein động vật hoặc protein thực vật, ví dụ, thịt, gia cầm, bột cá, protein đậu tương, protein sữa, gluten, hoặc tương tự. Các ví dụ về ‘hydrat cacbon’ có thể bao gồm ngũ cốc hoặc đậu như là ngô, lúa, lúa mỳ, đại mạch, yến mạch, đậu tương hoặc hỗn hợp của nó. ‘Lipit’ có thể là chất béo động vật, chất béo thực vật, và chất béo có nguồn gốc từ thịt, hoặc tương tự. Mặt khác, còn có thể bao gồm thêm các thành phần khác mà bổ sung chức năng cho thức ăn động vật ngoài các thành phần được mô tả trên đây. Tùy chọn, đường, muối, chất cay, gia vị, tạo hương, và tương tự có thể được kết hợp.

Theo một phương án làm ví dụ khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào vi khuẩn của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P), phương pháp này bao gồm:

nuôi cấy *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) để tạo ra dung dịch nuôi cấy,

gia nhiệt dung dịch nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 160°C,

làm mát dung dịch nuôi cấy đã được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 60°C, và

tách tế bào vi khuẩn của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P) từ dung dịch nuôi cấy được làm mát.

Cụ thể là, trong bước nuôi cấy *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) để tạo ra dung dịch nuôi cấy, aga môi trường, cụ thể là, môi

trường MRS có thể được sử dụng. Việc nuôi cấy có thể được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C trong 5 đến 48 giờ, cụ thể hơn là ở 30 đến 40°C trong 12 đến 36 giờ, cụ thể hơn là ở 35 đến 40°C trong 20 đến 30 giờ, nhờ đó tạo ra được dung dịch nuôi cấy.

Sau đó, gia nhiệt dung dịch nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 160°C. Việc gia nhiệt có thể được tiến hành bằng phương tiện gia nhiệt trực tiếp hoặc phương tiện gia nhiệt gián tiếp, cụ thể có thể được tiến hành bằng cách gia nhiệt gián tiếp như là bộ trao đổi nhiệt. Việc gia nhiệt có thể được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 150°C, cụ thể hơn là, 90°C đến 120°C. *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 có thể được bất hoạt hoặc bị giết bằng cách gia nhiệt.

Dung dịch nuôi cấy được gia nhiệt có thể được làm mát nhanh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 60°C, cụ thể là 20°C đến 50°C, hoặc trong ví dụ, có thể được làm mát nhanh đến 4°C. Việc làm mát có thể được tiến hành ở tốc độ nằm trong khoảng từ 10°C/phút đến 60°C/phút, cụ thể là 20°C/phút đến 50°C/phút, cụ thể hơn là, 30°C/phút đến 40°C/phút. Sau đó, tế bào vi khuẩn được bất hoạt có thể được tách khỏi dung dịch nuôi cấy được làm mát để thu được tế bào vi khuẩn của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P).

Phương pháp tạo ra tế bào vi khuẩn của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P) còn có thể bao gồm thêm việc trộn tế bào vi khuẩn được bất hoạt đã được tách với tác nhân bảo vệ. Hơn nữa, sau đó, phương pháp này còn có thể bao gồm thêm việc nghiền hỗn hợp thành bột thu được của tế bào vi khuẩn được bất hoạt và tác nhân bảo vệ. Bằng cách trộn tác nhân bảo vệ như được mô tả trên đây và nghiền hỗn hợp thành bột, có thể ngăn

ngừa tế bào vi khuẩn được bất hoạt khỏi bị nhiễm bẩn từ môi trường bên ngoài và tạo thuận tiện cho việc phân bố tế bào vi khuẩn được bất hoạt.

Tác nhân bảo vệ không bị giới hạn cụ thể, nhưng ví dụ, có thể ít nhất là một loại trong số nấm men, phần chiết nấm men, monosacarit, polysacarit, tinh bột, và đường như là đường thô và đường tinh chế. Cụ thể là, tác nhân bảo vệ có thể bao gồm ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm phần chiết nấm men, dextroza và đường thô.

Việc nghiền thành bột có thể được tiến hành bằng cách làm đông khô nhanh, phun làm khô, hoặc phun làm keo tụ. Cụ thể hơn là, phun làm khô có thể được sử dụng. Phun làm khô còn để chỉ phun mù làm khô, và là phương pháp trong đó chất lỏng được phun đồng thời trong dòng hơi nóng để ngay lập tức thu được sản phẩm được làm khô ở pha lỏng. Là phương pháp để phun chất lỏng, có phương pháp phun ly tâm sử dụng đĩa quay và phương pháp phun có áp suất sử dụng vòi có áp suất. Để thực hiện phun làm khô trên sữa nguyên kem, v.v., có thể sử dụng thiết bị phun làm khô đã được biết đến mà dùng các phương pháp phun này

Khi nghiền cứu để đơn giản vận hành, tốt hơn là tế bào vi khuẩn được bất hoạt và tác nhân bảo vệ được trộn để tạo ra hỗn hợp, sau đó hỗn hợp được tạo huyền phù trong nước, dung dịch huyền phù thu được được đưa vào phun làm khô, trong đó cụ thể là, nhiệt độ cửa vào của không khí nóng nằm trong khoảng từ 120 đến 200°C, tốt hơn là từ 130 đến 170°C, và nhiệt độ cửa ra nằm trong khoảng từ 30 đến 150°C, tốt hơn là, từ 50 đến 100°C. Lượng tác nhân bảo vệ để được bổ sung có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 300 phần theo trọng lượng, cụ thể là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 200 phần theo trọng lượng, dựa trên 100 phần theo trọng lượng của tế bào vi khuẩn được bất hoạt.

Ví dụ, lượng của nấm men hoặc phần chiết nấm men để được có bổ sung là nằm trong khoảng từ 0,04 đến 50 phần theo trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 phần theo trọng lượng, lượng của monosacarit để được bổ sung là nằm trong khoảng từ 1 đến 100 phần theo trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 50 phần theo trọng lượng, và lượng đường để được bổ sung là nằm trong khoảng từ 0,2 đến 50 phần theo trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,4 đến 10 phần theo trọng lượng.

Khẳng định được rằng, khi các chất nền hữu cơ chấp nhận được về sinh lý như là canxi cacbonat, v.v., mà khó hòa tan trong nước, làm chất bổ sung trong vận hành nghiền thành bột, cụ thể là trong vận hành phun làm khô, vận hành được tiến hành dễ dàng. Ở đây, lượng của chất nền vô cơ trong chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật nằm trong khoảng từ 1 đến 99% theo trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 90% theo trọng lượng, và cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 1 đến 10% theo trọng lượng. Ví dụ, chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật chứa bột với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 50% theo trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20% theo trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 15% theo trọng lượng của tế bào vi khuẩn được bất hoạt, và chất nền vô cơ với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 80% theo trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 50%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 20% theo trọng lượng.

Chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật có thể bao gồm *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) hoặc tế bào vi khuẩn được bất hoạt của nó như được mô tả trên đây với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ cfu đến $1,0 \times 10^{10}$ cfu mỗi 1 g chế phẩm. Cụ thể là, trong một ví dụ, lượng này có thể nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ cfu đến $3,0 \times 10^9$ cfu, và có thể là 5×10^8 cfu.

Sau đây, thành phần cấu thành và chức năng của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua thông qua các phương án ví dụ được ưu tiên của sáng chế. Lưu ý rằng, Ví dụ thực hiện sáng chế được mô tả dưới đây được đề xuất chỉ là để lấy ví dụ cho sáng chế, và do đó, sáng chế không chỉ giới hạn ở các Ví dụ thực hiện này.

Những nội dung mà không được mô tả trong bản mô tả này có thể là đã đầy đủ và được hiểu về mặt kỹ thuật được bởi chuyên gia trong ngành, và do đó, việc mô tả chi tiết về chúng được bỏ qua.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 đến 6:

Tính an toàn, độ bền axit, độ bền mật, hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính enzym tiêu hóa và hoạt tính làm thoái biến triglyxerit của chủng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) theo sáng chế được đánh giá như sau, sử dụng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 đã được biết đến trong ngành làm chủng tham chiếu.

Ví dụ thử nghiệm 1: Đánh giá tính an toàn của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P)

Để đánh giá tính an toàn của chủng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P), thử nghiệm tan máu, thử nghiệm hóa lỏng gelatin, khẳng định về việc xuất hiện chất trao đổi có hại (amoniac), và thử nghiệm loại amin phenylalanin, được tiến hành theo phương pháp thử nghiệm đánh giá tính an toàn được giới thiệu bởi tiêu chuẩn dùng cho tổ chức hoạt động công nghiệp công nghệ sinh học Hàn Quốc . Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

[Bảng 3]

Chủng	Các loại thử nghiệm			
	Thử nghiệm hóa lỏng gelatin	Thử nghiệm loại amin phenylalanin	Thử nghiệm tan máu	Thử nghiệm amoniac
Lactobacillus salivarius CJLS1511	Âm tính	Âm tính	tan máu α , an toàn	Âm tính

Như được khẳng định trong Bảng 3, phát hiện ra rằng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) là âm tính trong tất cả các thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm loại amin phenylalanin, và thử nghiệm khẳng định về việc có amoniac, và là an toàn trong thử nghiệm tan máu

Ví dụ thử nghiệm 2: Đánh giá độ bền axit của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P)

Chủng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 mà đã được nuôi cấy trước đây trong môi trường MRS và chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn mà là chủng để so sánh, được pha loãng 10^{-6} lần với dung dịch MRS được điều chỉnh để có độ pH bằng 2, 3 và 7, tương ứng. Mỗi dung dịch chủng được pha loãng được nuôi cấy ở 37°C, làm thành vĩa trên môi trường aga MRS trong khoảng thời gian xác định trước, và được nuôi cấy yếm khí trong 48 giờ. Sau đó, đo số khuẩn lạc. Các kết quả của thử nghiệm độ bền axit được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

[Bảng 4]

Chủng	Canh MRS (pH7)	Canh MRS (pH2)	Canh MRS (pH3)
	Số lượng tế bào	Số lượng tế bào	Số lượng tế bào

	sống đếm được (CFU/mL)			sống đếm được (CFU/mL)			sống đếm được (CFU/mL)		
	0 h	1 h	3 h	0 h	1 h	3 h	0 h	1 h	3 h
Lactobacillus salivarius CJLS1511	5,8 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁸	6,2 x 10 ⁸	5,8 x 10 ⁸	2,3 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁵	5,8 x 10 ⁸	3,5 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸
Lactobacillus salivarius KCCM 40210	6,4 x 10 ⁸	6,8 x 10 ⁸	8,6 x 10 ⁸	6,4 x 10 ⁸	2,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²	6,4 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁸	5,0 x 10 ⁶

Như được khẳng định từ Bảng 4, *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 cho thấy giảm ít hơn về số lượng tế bào sống đếm được so với số lượng tế bào sống đếm được của chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn mà là chủng để so sánh, ở pH nằm trong khoảng từ 2 đến 4, nhờ đó có độ bền axit rất tốt.

Ví dụ thử nghiệm 3: Đánh giá độ bền mật của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P)

Chủng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 mà đã được nuôi cấy trước đây trong môi trường MRS và chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn mà là chủng để so sánh, được điều chỉnh để có độ pH bằng 4, tương ứng, và nồng độ của dung dịch axit mật (Oxgall) được điều chỉnh đến 0%, 0,3%, và 1%, tương ứng, và được pha loãng 10⁻⁶ lần với dung dịch MRS. Mỗi dung dịch chủng được pha loãng được nuôi cấy ở 37°C, làm thành vĩa trên môi trường aga MRS trong khoảng thời gian xác định trước, và được nuôi cấy yếm khí trong 48 giờ. Sau đó, đo số khuẩn lạc. Các kết quả về việc đo số lượng tế bào sống đếm được được tổng kết trong Bảng 5 dưới đây:

[Bảng 5]

Chủng	Canh MRS (pH4)			Canh MRS (pH4 và Oxygall 0,3%)			Canh MRS (pH4 và Oxygall 1%)		
	Số lượng tế bào sống đếm được (CFU/mL)			Số lượng tế bào sống đếm được (CFU/mL)			Số lượng tế bào sống đếm được (CFU/mL)		
	0 h	1 h	3 h	0 h	1 h	3 h	0 h	1 h	3 h
Lactobacillus salivarius CJLS1511	2,4 x 10 ⁸	4 x 10 ⁸	5,6 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸	4,0 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁸	5,6 x 10 ⁵	5,2 x 10 ³
Lactobacillus salivarius KCCM 40210	2,0 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁵	2,0 x 10 ²	2,0 x 10 ⁸	2,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²

Như đánh giá được từ Bảng 5, số lượng tế bào sống đếm được của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 là giảm ở cả hai dung dịch axit mật 0,3% và 1% (Oxygall) ở pH 4. Tuy nhiên, mức giảm số lượng tế bào sống đếm được là thấp hơn nhiều so với mức giảm số lượng tế bào sống đếm được của chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn, và do đó, phát hiện ra rằng chủng được dùng có thể được tăng trưởng thậm chí nếu axit mật có mặt nội sinh ở thân động vật.

Ví dụ thử nghiệm 4: Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của *Lactobacillus salivarius* CbaJLS1511 (KCCM11829P)

Ba mầm bệnh (*E. coli* K88, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* KCCM 25922, *Salmonella choleraesuis* KCCM 10709) mà được

nuôi cấy lỏng trong môi trường TSB (canh đậu tương Tryptic) (BD, USA) trong 24 giờ được làm thành vĩa đồng nhất ở 10^{5-6} cfu/ml sử dụng gạc bông được khử trùng.

Sau khi làm thành vĩa, *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 và chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn được pha loãng trong đệm PBS đến 10^9 cfu/mL, tương ứng, trong đĩa giấy với đường kính bằng 4mm, và sau đó được phân tán trong 50 μ l. Dung dịch pha loãng được để ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi nó thâm nhập đủ vào trong đĩa giấy, và sau đó được nuôi cấy ưa khí ở 37°C trong 18 giờ. Ở đây, dung dịch pha loãng chỉ bao gồm các chủng mà được ly tâm ($3.000 \times g$, 10 phút) đối với lớp dịch nổi sau khi nuôi cấy và rửa với đệm PBS 3 lần. Kích cỡ của vòng ức chế được đo bởi sự khác nhau giữa đường kính của toàn bộ vòng trong suốt và đường kính của rãnh aga. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây.

[Bảng 6]

Chủng	<i>E. coli</i> K88	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 25922	<i>Salmonella choleraesuis</i> KCCM 10709
<i>Lactobacillus salivarius</i> CJLS1511	++	++	++	+++
<i>Lactobacillus salivarius</i> KCCM 40210	+	++	+	++
10 đến 15 mm: +, 15 đến 20 mm: ++, 21 đến 25 mm: +++				

Như được khẳng định trong Bảng 6, cả hai chủng *Lactobacillus salivarius*

CJLS1511 và chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn cho thấy tác động ức chế tăng sinh đối lại vi sinh vật gây bệnh. Tuy nhiên, khẳng định được rằng, chủng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 có hoạt tính kháng khuẩn cao hơn so với hoạt tính kháng khuẩn của chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn.

Thu được các kết quả này là do chính chủng hơn là do hiệu quả của chất trao đổi mà *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 sản xuất ra mà thể hiện rằng, việc tăng trưởng vi sinh vật có hại có thể được ức chế khi được áp dụng cho vật nuôi.

Ví dụ thử nghiệm 5: Đánh giá hoạt tính enzym tiêu hóa của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P)

Thực nghiệm để đánh giá hoạt tính làm thoái biến enzym tiêu hóa được tiến hành để xác định xem chủng là trực khuẩn que axit lactic có enzym với khả năng làm thoái biến hydrat cacbon, protein và phospho.

Để xác định xem hoạt tính proteaza có mặt hay không, sữa nguyên kem 0,5% (trọng lượng/thể tích) được bổ sung vào môi trường aga MRS. Để xác định xem hoạt tính xenluloza có mặt hay không, môi trường aga MRS được có bổ sung metylxenluloza 0,2% (trọng lượng/thể tích). Để xác định xem hoạt tính α -amylaza có mặt hay không, tinh bột ngô 0,2% (trọng lượng/thể tích) được bổ sung vào môi trường aga MRS. Để xác định xem hoạt tính phytaza có mặt hay không, muối phytat canxi 0,5% (trọng lượng/thể tích) được bổ sung vào môi trường. Các chủng được tách ở từng môi trường trong số các môi trường được tạo ra trên đây được làm thành vĩa, được nuôi cấy trong 24 giờ, và được quan sát.

Sự có mặt hoặc không có mặt của hoạt tính α -amylaza và hoạt tính xenluloza được xác định bằng cách rửa môi trường nuôi cấy 24 giờ được xử lý với 2% chất phản ứng đỏ congo (Sigma, USA), tiếp theo là rửa với natri clorua

(NaCl) 1M, và khẳng định sự có mặt hoặc không có mặt của màu. Hơn nữa, việc xác định sự có mặt hoặc không có mặt của hoạt tính proteaza và hoạt tính phytaza được khẳng định bằng sự có mặt của vòng trong suốt, và các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây.

[Bảng 7]

Chủng	Hoạt tính proteaza	Hoạt tính phytaza	Hoạt tính lipaza	Hoạt tính xenluloza	Hoạt tính amylaza
Lactobacillus salivarius CJLS1511	+++	++	+	+++	+++
Lactobacillus salivarius KCCM 40210	+	+	++	++	++

1 đến 10 mm: +, 11 đến 20 mm: ++, 21 đến 30 mm: +++

Như được khẳng định từ Bảng 7, phát hiện ra rằng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 có hoạt tính enzym tiêu hóa cao hơn như là hoạt tính proteaza, hoạt tính phytaza, hoạt tính làm thoái biến xenluloza, và hoạt tính amylaza so với các hoạt tính đó của chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn.

Các kết quả này thể hiện rằng, khi *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được áp dụng cho vật nuôi, tác dụng của thức ăn có thể được cải thiện.

Ví dụ thử nghiệm 6: Đánh giá hoạt tính làm thoái biến lipid trung tính của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P)

Với kết quả nghiên cứu hoạt tính hydrolaza/men thủy phân của muối mật (BSH) của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511, khẳng định được rằng, kết tủa

trắng được hình thành trong môi trường MRS rắn có bổ sung 2mM taurodeoxycholat hydrat (TDCA, Sigma, USA), và do đó, hoạt tính enzym có mặt. Hơn nữa, mẫu đóng cặn của nó là tương tự với mẫu đóng cặn của chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn, mà là chủng kiểm soát dương tính với TDCA. Tuy nhiên, trong môi trường có bổ sung 2mM natri glycodeoxycholat (GDCA, Sigma, USA), chủng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 tăng trưởng tốt, nhưng chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn cho thấy không có kết tủa, và không tăng trưởng tốt. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 8 dưới đây.

[Bảng 8]

Phức axit mật / tên chủng	<i>Lactobacillus salivarius</i> CJLS1511	<i>Lactobacillus salivarius</i> KCCM 40210
TDCA	O	O
GDCA	+	-

O: Có hình thành kết tủa, X: Không hình thành kết tủa, +: Có tăng trưởng, -: Không tăng trưởng

Như đánh giá được từ Bảng 8, *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 có độ bền mật cao và được chuyển hóa thành dạng có khả năng làm thoái biến lipit trung tính bằng cách sản xuất ra BSH, phát hiện ra rằng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 là chủng chức năng mà có thể tác động đến trọng lượng cơ thể khi được dùng cho động vật.

Ví dụ điều chế 1

Chủng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 và chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn được làm thành vĩa trên môi trường aga MRS

với vòng/quai, tương ứng, và được nuôi cấy ở 37°C trong 48 giờ để tạo ra dung dịch nuôi cấy.

Sau đó, mỗi dung dịch nuôi cấy được gia nhiệt gián tiếp ở nhiệt độ bằng 100°C sử dụng bộ trao đổi nhiệt, và làm mát nhanh đến 10°C ở tốc độ nằm trong khoảng từ 30 đến 100 L/phút. Tế bào vi khuẩn được bất hoạt được tách khỏi dung dịch nuôi cấy được làm mát nhanh qua máy ly tâm (3.000 x g, 10 phút) để tạo ra tế bào vi khuẩn của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt và *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210, tương ứng.

Ví dụ điều chế 2

Chủng *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 và chủng *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210 tiêu chuẩn được làm thành vĩa trên môi trường aga MRS với vòng/quai, tương ứng, và được nuôi cấy ở 37°C trong 48 giờ để tạo ra dung dịch nuôi cấy.

Sau đó, mỗi dung dịch nuôi cấy được gia nhiệt gián tiếp ở nhiệt độ bằng 100°C sử dụng bộ trao đổi nhiệt, và làm mát nhanh đến 10°C ở tốc độ nằm trong khoảng từ 30 đến 100 L/phút. Tế bào vi khuẩn được bất hoạt được tách khỏi dung dịch nuôi cấy được làm mát nhanh qua máy ly tâm (3.000 x g, 10 phút) để tạo ra *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt và *Lactobacillus salivarius* KCCM 40210, tương ứng. Sau đó, phần chiết nấm men, dextroza, và đường thô được trộn vào đó, tương ứng. Mỗi hỗn hợp được tạo huyền phù trong nước, và đưa huyền phù thu được vào phun làm khô để thu được bột. Cụ thể ở đây là, phun làm khô được tiến hành ở các điều kiện là nhiệt độ cửa vào của không khí nóng bằng 150°C, và nhiệt độ cửa ra bằng 100°C. Làm tác nhân bảo vệ, phần chiết nấm men được bổ sung ở mức 20 phần theo trọng lượng, dextroza được bổ sung ở mức 30 phần theo trọng lượng, và đường thô được bổ sung ở

mức 5 phần theo trọng lượng, dựa trên 100 phần theo trọng lượng của tế bào vi khuẩn được bất hoạt.

Tiến hành thử nghiệm tính kỵ nước và tính keo tụ của tế bào vi khuẩn được bất hoạt được tạo ra trong Ví dụ điều chế 1 bằng phương pháp được mô tả dưới đây. So sánh mức độ tăng trọng lượng cơ thể và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn của thức ăn cơ sở có bổ sung *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt và thức ăn cơ sở không bao gồm tế bào với nhau.

Ví dụ thử nghiệm 7: Đánh giá tính kỵ nước và đồng tích tụ của các tế bào sống và các tế bào của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P)

Để khẳng định sự khác nhau về tính kỵ nước và tính keo tụ giữa các tế bào sống và các tế bào của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt, đánh giá thử nghiệm phản ứng tự keo tụ và đồng tích tụ.

Thử nghiệm đồng tích tụ được tiến hành bằng cách bổ sung 1mL toluen vào 3mL trực khuẩn que axit lactic được pha loãng sao cho OD₆₀₀ bằng 0,5 đối lại các tế bào sống và các tế bào của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt, tiếp theo là lắc xoáy trong 90 giây. Sau đó, mỗi hỗn hợp được để trong bể nước ở 37°C trong 1 giờ, loại toluen, và đo OD₆₀₀ của lớp dung dịch trong nước.

Tiến hành phản ứng đồng tích tụ bằng cách trộn các tế bào sống và các tế bào của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt với vi sinh vật gây bệnh (*E. coli* K88, *Salmonella typhimurium* KCCM 25922, *Salmonella choleraesuis* KCCM 10709) với cùng lượng (vi sinh vật gây bệnh: các tế bào sống hoặc tế bào chết = 1:1 (từng loại là 1,5mL)) để tạo ra hỗn hợp, và bổ sung 1mL toluen vào 3mL hỗn hợp, tương ứng, tiếp theo là lắc xoáy trong 90 giây. Sau đó, mỗi hỗn hợp được để trong bể nước ở 37°C trong 1 giờ, loại toluen, và đo

OD₆₀₀ của lớp dung dịch trong nước.

Tính toán tính kỵ nước (%) bằng $100 \times (\text{OD}_{600} \text{ ban đầu} - \text{OD}_{600} \text{ sau 1 giờ}) / \text{OD}_{600} \text{ ban đầu}$.

Các kết quả của phản ứng tự tích tụ và phản ứng đồng tích tụ giữa các tế bào sống và các tế bào được bất hoạt được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây.

[Bảng 9]

Loại phản ứng / chủng gây bệnh		Lactobacillus salivarius CJLS1511	
		Các tế bào sống	Các tế bào vi khuẩn được bất hoạt
Tự tích tụ		11%	23%
Đồng tích tụ	<i>E. coli</i> K88	54%	64%
	<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 25922	45%	65%
	<i>Salmonella choleraesuis</i> KCCM 10709	30%	45%

Như đánh giá được từ Bảng 9, cả hai là phản ứng tự keo tụ và phản ứng đồng tích tụ của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt thể hiện 1,5 lần cao hơn so với các phản ứng đó ở các tế bào sống. Người ta cho rằng, tính kỵ nước ngoại bào và tính tích tụ của vi sinh vật chịu tác động bởi các đặc tính và cấu trúc bề mặt của các protein bề mặt tế bào, và *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt làm tăng tính kỵ nước và tính tích tụ do cấu trúc protein khác trên bề mặt tế bào so với các đặc tính đó ở các tế bào sống như được thể hiện trên Hình 1. Kết quả là, nó được kỳ vọng để được sử dụng làm chủng chức năng mà tác động đến khả năng chống bệnh tật bằng cách bám dính vào nội độc tố.

Ví dụ thử nghiệm 8: So sánh thức ăn bao gồm *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P) với thức ăn cơ sở thông thường

Gà giò được cho ăn với thức ăn cơ sở có bổ sung 0,2% (trọng lượng/trọng lượng) của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt và thức ăn cơ sở không bao gồm như vậy (nhóm kiểm soát) trong 29 ngày giống như với giai đoạn cho ăn thông thường, và đo trọng lượng cơ thể trung bình ban đầu (g), trọng lượng cơ thể trung bình cuối cùng (g), tăng trung bình hàng ngày (g/ngày), lượng thức ăn được dùng trung bình hàng ngày (g/ngày), và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn, tương ứng. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây.

[Bảng 10]

Phân nhóm	Nhóm đối chứng	Nhóm được xử lý với tế bào vi khuẩn được bất hoạt <i>Lactobacillus salivarius</i> CJLS1511
Số lượng động vật thử nghiệm	150	150
Trọng lượng cơ thể trung bình ban đầu (g)	38,48	38,47
Trọng lượng cơ thể trung bình cuối cùng (g)	1582,00 ^a	1690,24 ^b
Tăng trung bình hàng ngày (g/ngày)	53,23 ^a	56,96 ^b
Lượng thức ăn được	78,76	79,48

dùng trung bình hàng ngày (g/ngày)		
Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn	1,48 ^a	1,40 ^b

^{a,b} Nghĩa là với các đặc tính khác nhau là khác nhau đáng kể ($P < 0,05$).

Như được thể hiện trong Bảng 10, nhóm được xử lý với *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bắt hoạt theo sáng chế cho thấy hiệu quả cao hơn trên cả hai là tăng trọng lượng cơ thể và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn so với các đặc tính đó của nhóm kiểm soát mà không được xử lý với *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt.

Tên của cơ quan ký gửi: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) (nước ngoài)

Số ký gửi: KCCM11829P

Ngày ký gửi: 20160412

HIỆP ƯỚC BUDAPEST VỀ GHI NHẬN QUỐC TẾ VIỆC KÝ GỬI VI SINH VẬT CHO MỤC ĐÍCH THEO ĐUỔI VIỆC BẢO HỘ SÁNG CHẾ

MÀU QUỐC TẾ

Gửi đến: CJ CHEILJEDANG
CJ CHEILJEDANG CENTER 330.
DONGHO-RO JUNG-GU, SEOUL
100-400
REPUBLIC OF KOREA

DẤU NHẬN ĐƠN TRONG TRƯỜNG
HỢP TÀI LIỆU GỐC được cấp theo
Quy tắc 7.1 bởi cơ quan ký gửi quốc tế
được nhận diện ở cuối trang này

I. Nhận diện vi sinh vật	
Dấu hiệu nhận diện được cấp cho người ký gửi: Lactobacillus salivarius CJLS1511	Số ký gửi được cơ quan ký gửi quốc tế cấp: KCCM11829P
II. MÔ TẢ KHOA HỌC VÀ/HOẶC CHỈ ĐỊNH PHÂN LOẠI ĐƯỢC ĐỀ	
Vi sinh vật được nhận diện theo phần I trên đây có kèm theo:	
☐ mô tả khoa học ☐ chỉ định phân loại được đề xuất (Đánh dấu nếu có áp dụng)	
III. NHẬN VÀ CHẤP NHẬN MẪU	
Cơ quan ký gửi quốc tế này chấp nhận vi sinh vật được nhận diện theo phần I trên đây, rằng nó được nhận vào ngày 12 tháng tư năm 2016. (Ngày ký gửi gốc) ¹	

IV. CƠ QUAN KÝ GỬI QUỐC TẾ	
Tên : Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc	(các) chữ ký của người có quyền đại diện cho cơ quan ký gửi quốc tế hoặc của (các) nhân viên có thẩm quyền
Địa chỉ: Yurim B/D 45, Hongjena-e-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861, Republic of Korea	Ngày: 12 tháng 04 năm 2016.

Nếu Quy tắc 6.4 (d) áp dụng, ngày này là ngày mà thẩm quyền của cơ quan ký gửi quốc tế được thực thi: nếu việc ký gửi được thực hiện bên ngoài Hiệp Ước Budapest sau khi có được thẩm quyền của cơ quan ký gửi quốc tế được chuyển thành việc ký gửi theo Hiệp Ước Budapest, ngày này là ngày mà cơ quan ký gửi quốc tế nhận vi sinh vật.

Mẫu BP/4

Trang duy nhất

Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) được bất hoạt.
2. Chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật bao gồm *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) được bất hoạt.
3. Chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật theo điểm 2, trong đó *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) được bất hoạt có mặt với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ cfu đến $1,0 \times 10^{10}$ cfu cho mỗi gam chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật.
4. Chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật theo điểm 2 hoặc 3, còn bao gồm thêm tác nhân bảo vệ của *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) được bất hoạt.
5. Chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật theo điểm 4, trong đó tác nhân bảo vệ ít nhất là một loại được chọn từ nhóm bao gồm nấm men, phần chiết nấm men, monosacarit, polysacarit, tinh bột, và đường.
6. Chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật theo điểm 2 hoặc 3, trong đó động vật là gà giò.
7. Chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật theo điểm 2 hoặc 3, trong đó *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) được bất hoạt có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1% theo trọng lượng của tổng trọng lượng

thức ăn động vật.

8. Thức ăn động vật bao gồm chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật theo điểm 7.

9. Phương pháp tạo ra chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật bao gồm *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P) , phương pháp này bao gồm:

nuôi cấy *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 (KCCM11829P) để tạo ra dung dịch nuôi cấy,

gia nhiệt dung dịch nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 160°C,

làm mát dung dịch nuôi cấy đã được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 60°C,

tách *Lactobacillus salivarius* CJLS1511 được bất hoạt (KCCM11829P) từ dung dịch nuôi cấy được làm mát, và

trộn tế bào được bất hoạt được tách với tá dược,

trong đó chế phẩm để bổ sung cho thức ăn động vật không bao gồm dung dịch nuôi cấy.

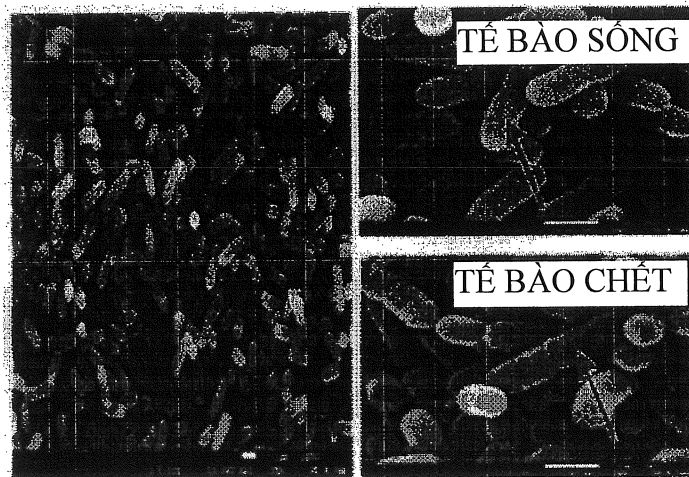
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó việc gia nhiệt được tiến hành bằng cách gia nhiệt gián tiếp thông qua bộ trao đổi nhiệt.

11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó việc làm mát được tiến hành ở tốc độ nằm trong khoảng từ 10°C/phút đến 60°C/phút.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, còn bao gồm thêm việc trộn tế bào vi khuẩn được bất hoạt được tách với tác nhân bảo vệ.

13. Phương pháp theo điểm 12, còn bao gồm thêm việc nghiền thành bột tế bào vi khuẩn được bất hoạt được trộn.

14. Phương pháp theo điểm 12, trong đó tác nhân bảo vệ ít nhất là một loại được chọn từ nhóm bao gồm nấm men, phần chiết nấm men, monosacarit, polysacarit, tinh bột, và đường.

Hình 1

Hình 2

