



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003396

(51) **A01K 61/13; A01K 61/59**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00071

(22) 16/09/2019

(67) 1-2019-05055

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/03/2020 384ASC

(73) Đại học Huế (VN)

Số 03 Lê Lợi, phường Vĩnh Ninh, thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế

(72) Nguyễn Quang Linh (VN); Trần Vinh Phương (VN); Phạm Thị Hải Yến (VN); Đặng Thanh Long (VN); Hoàng Thị Ngọc Hân (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC LÀM THỨC ĂN BỔ SUNG TRONG
NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học làm thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản, trong đó bằng cách chiết xuất các hoạt chất từ cây chó đẻ thân xanh (*Phyllanthus amarus*) dạng bột khô với etanol 20% cho phép trích ly hoạt chất trong nguyên liệu đồng thời kết hợp với các chủng vi sinh hữu ích gốc EM₁ chứa *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis*, quy trình cho phép tạo ra chế phẩm vi sinh hữu ích vừa làm thức ăn bổ sung vừa có khả năng ngăn ngừa vi sinh vật gây bệnh, hữu ích sử dụng để nuôi trồng thủy sản.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực chế phẩm sinh học từ thực vật và công nghệ vi sinh, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ thực vật và vi sinh để làm thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản ứng dụng trong phòng trị bệnh trên tôm, cá.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong ngành chăn nuôi, hiện đã có nhiều nghiên cứu nhằm tạo ra các chế phẩm vi sinh hữu ích để tăng sức đề kháng và ngăn ngừa bệnh cho vật nuôi, đặc biệt trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản.

Đơn đăng ký cấp bằng độc quyền sáng chế số 1-2010-02140 đã đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm Bokashi Trầu dựa trên nền dịch chiết lá trầu và vi sinh vật lợi sinh lên men. Chế phẩm vi sinh này có thành phần bao gồm dịch chiết lá trầu chứa chủ yếu eugenol, chavicol, estradiol, cadinen và các hợp chất phenol khác và các vi sinh vật hữu ích thuộc nhóm *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp.. Chế phẩm cho thấy hiệu quả trong việc kháng khuẩn và có tăng cường vi sinh vật có lợi trong đường tiêu hóa của động vật thủy sản. Ngoài ra, với thành phần có nguồn gốc từ nguyên liệu tự nhiên, thân thiện với môi trường, chế phẩm không chỉ giúp tăng cường sức đề kháng của động vật thủy sản mà còn không gây ô nhiễm cũng như tồn dư trong cơ thể động vật thủy sản. Đặc biệt, khi tôm được bổ sung chế phẩm này cho thấy chúng có màu sáng hơn, vỏ kitin cứng hơn so với tôm không được bổ sung chế phẩm.

Đơn đăng ký cấp bằng độc quyền sáng chế số 1-2007-02510 đã đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm sinh học BIO-ATV để phòng trừ và hạn chế lây lan bệnh phát sáng trong nuôi trồng thủy sản. Trong đó quy trình này bao gồm các bước chuẩn bị giống vi sinh vật và lên men sản xuất và tạo chế phẩm. Giống vi sinh vật được sử dụng để tạo chế phẩm vi sinh này được chọn từ các chủng vi sinh vật bản địa được phân lập có khả năng kháng lại sự phát triển và lây lan của các vi khuẩn gây bệnh như *Vibrio* sp. Các chủng vi sinh vật này là chủng vi khuẩn *Lactic* (106) và chủng *Bacillus* (BT) phân lập được từ các đầm nuôi trồng thủy sản được bảo quản trong Phòng Công

nghe sinh học thủy sản của Công ty cổ phần Công nghệ sinh học. Các chủng này có khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh như *V. parahaemolyticus*, *V. cholera*, *V. haverly* và có khả năng phân huỷ các chất hữu cơ tồn dư trong ao nuôi.

Đơn đăng ký cấp bằng độc quyền giải pháp hữu ích số 2-2010-00094 đã đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học dùng để nuôi tôm sú, trong đó quy trình này bao gồm các bước nhân giống và nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bacillus* để thu sinh khối và phối trộn sinh khối để thu chế phẩm sinh học. Với mục đích tạo ra chế phẩm vừa có hoạt tính kháng khuẩn phổ rộng và vừa làm sạch nước ao nuôi tôm, quy trình này đã sử dụng ba chủng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* bao gồm *Lactobacillus acidophilus* LPG 5, *Lactobacillus helveticus* LRT8 và *Lactobacillus* sp. LRT2 và ba chủng thuộc chi *Bacillus* bao gồm *Bacillus subtilis* BaD, *Bacillus* sp. BaRT và *Bacillus* sp. BaPG để phát triển chế phẩm vi sinh.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu phát triển các chế phẩm vi sinh cho phép phù hợp với điều kiện sử dụng, bảo quản ở trong nước, vừa làm thức ăn cho vật nuôi đồng thời giảm mức độ ô nhiễm môi trường trong nuôi trồng thủy sản.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học làm thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản. Bằng cách chiết xuất thành phần có trong cây chó đẻ thân xanh (*Phyllanthus amarus*) kết hợp với các chủng vi sinh hữu ích *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis*, đã tạo ra chế phẩm sinh học nhằm phòng trị bệnh hoại tử gan tụy trên tôm, xuất huyết trên cá, ngoài ra chế phẩm còn cung cấp các chủng vi sinh vật có lợi giúp hỗ trợ tiêu hóa và kích thích tăng trưởng cho tôm, cá.

Cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học làm thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản. Theo giải pháp hữu ích, quy trình này gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu thực vật bằng cách thu hái cây chó đẻ thân xanh (*Phyllanthus amarus*) tươi bao gồm cả thân, lá, hạt và rễ, sau đó rửa sạch bằng nước và để ráo rồi cắt nhỏ đến kích thước khoảng từ 2 đến 3 cm, sau đó phơi hoặc sấy khô và xay thành bột thu được nguyên liệu thực vật ở dạng bột mịn;

b) thu hỗn hợp dịch chiết bằng cách ngâm nguyên liệu thực vật dạng bột mịn thu được ở trên với etanol 20% theo tỉ lệ 1:5 (trọng lượng/thể tích) trong 96 giờ để trích ly hoạt chất trong nguyên liệu, sau đó để etanol bay hơi tự nhiên trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày thu được hỗn hợp dịch chiết cây chó đẻ thân xanh có hàm lượng etanol nhỏ hơn 5%;

c) tạo chế phẩm vi sinh thứ cấp bằng cách phối trộn các thành phần bao gồm nước, rỉ đường, dấm, cồn 45-50° và chế phẩm hỗn hợp vi sinh gốc (EM₁) chứa *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis* theo tỷ lệ phần trọng lượng là 5,5/1/1/1/1 để thu được hỗn hợp vi sinh thứ cấp chứa *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis* với lượng lớn hơn 10⁵ CFU/mL mỗi loại, sau khi khuấy trộn đều, bịt kín và ủ trong 96 giờ trong điều kiện duy trì nhiệt độ từ 34 đến 39⁰ C, pH từ 3,8 đến 4,5 thu được chế phẩm vi sinh thứ cấp; và

d) thu chế phẩm sinh học bằng cách phối trộn hỗn hợp dịch chiết cây chó đẻ thân xanh với chế phẩm vi sinh thứ cấp theo tỷ lệ 1:3 (theo thể tích), sau khi ủ yếm khí trong 96 giờ trong điều kiện khuấy, lọc bỏ phần bã thô thu được chế phẩm sinh học dạng lỏng chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* và bã huyền phù từ cây chó đẻ thân xanh.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án thực hiện quy trình sản xuất chế phẩm sinh học làm thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản thông qua các ví dụ thực hiện cụ thể. Tuy nhiên, các ví dụ và các phương án thực hiện này chỉ nhằm mục đích làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học làm thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản. Theo giải pháp hữu ích, quy trình này gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) thu hỗn hợp dịch chiết; c) tạo chế phẩm vi sinh thứ cấp; và d) thu chế phẩm sinh học.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu thực vật, tiến hành thu hái cây chó đẻ thân xanh. Cây chó đẻ thân xanh là một loại cây bụi có tên khoa học là *Phyllanthus amarus*. Thành phần sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất chế phẩm theo giải pháp hữu ích bao

gồm sinh khối tươi, cụ thể là bao gồm bao gồm cả thân, lá, hạt và rễ của cây chó đẻ thân xanh. Nguyên liệu sau khi thu hái được rửa sạch bằng nước và để ráo rồi cắt nhỏ đến kích thước khoảng từ 2 đến 3 cm. Sau đó, phơi (khoảng từ 5-7 ngày) hoặc sấy khô (đến trọng lượng không đổi) và xay thành bột thu được nguyên liệu thực vật ở dạng bột mịn.

Trong bước thu hỗn hợp dịch chiết, để trích ly các thành phần có ích trong nguyên liệu, tiến hành ngâm nguyên liệu thực vật dạng bột mịn thu được ở trên với dung môi là etanol 20%. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi tối ưu là theo tỉ lệ 1:5 (trọng lượng/thể tích). Thời gian ngâm chiết được thực hiện trong 96 giờ để trích ly hoạt chất trong nguyên liệu. Sau đó để etanol bay hơi tự nhiên trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày thu được hỗn hợp dịch chiết cây chó đẻ thân xanh có hàm lượng etanol nhỏ hơn 5%. Sản phẩm thu được là hỗn hợp bao gồm dịch chiết và phần bã không tan từ nguyên liệu.

Trong bước tạo chế phẩm vi sinh thứ cấp, quá trình này nhằm thu được chế phẩm vi sinh thứ cấp từ chế phẩm vi sinh hữu ích gốc (Effective Microorganisms: EM) hay còn gọi là chung là EM₁. Chế phẩm vi sinh gốc EM₁ được sử dụng theo giải pháp hữu ích là chế phẩm vi sinh chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis*. Ví dụ về chế phẩm vi sinh gốc (EM₁) chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis* có trên thị trường có thể mua từ Trung tâm Phát triển Công nghệ Việt Nhật, Hà Nội.

Để thu chế phẩm vi sinh thứ cấp, tiến hành phối trộn các thành phần bao gồm nước, rỉ đường, dấm, còn 45-50° và chế phẩm hỗn hợp vi sinh chứa *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis*. Tỷ lệ phối trộn các thành phần nêu trên tốt nhất là theo tỷ lệ phần trọng lượng là 5,5/1/1/1/1. Hỗn hợp sau khi phối trộn chứa vi sinh thứ cấp với lượng *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis* lớn hơn 10⁵ CFU/mL mỗi loại. Sau khi khuấy trộn đều, bịt kín và ủ trong 96 giờ để lên men. Quá trình này nhằm tăng sinh lượng vi khuẩn hữu ích. Điều kiện ủ được duy trì với nhiệt độ từ 34 đến 39⁰ C, pH từ 3,8 đến 4,5 thu được chế phẩm vi sinh thứ cấp.

Trong bước thu chế phẩm sinh học, tiến hành phối trộn hỗn hợp dịch chiết cây chó đẻ thân xanh với chế phẩm vi sinh thứ cấp thu được ở trên theo tỷ lệ 1:3 (theo thể tích). Sau khi ủ yếm khí trong 96 giờ trong điều kiện khuấy, quá trình này nhằm lên

men, tăng sinh vi khuẩn. Hỗn hợp khi lên men có mùi men thơm ngọt tự nhiên của rỉ đường và mùi hăng đặc trưng của cây chó đẻ thân xanh, kèm theo sự phát triển của hỗn hợp vi sinh vật có ích đồng thời tích tụ các hoạt chất. Sau khi quá trình lên men kết thúc, lọc bỏ phần bã thô có kích thước lớn, phần bã còn lại trong dung dịch chiếm khoảng từ 10 đến 15% trọng lượng ở dạng huyền phù. Chế phẩm sinh học thu được theo giải pháp hữu ích ở dạng lỏng chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* và bã huyền phù từ cây chó đẻ thân xanh.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Sản xuất chế phẩm sinh học từ cây chó đẻ thân xanh

Để sản xuất 100 lít chế phẩm sinh học làm thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản nhằm phòng trị bệnh và hỗ trợ tiêu hóa, kích thích tăng trưởng và giảm hệ số chuyển đổi thức ăn trên tôm, cá, các bước tiến hành như sau.

Thu hái thân, lá, hạt và rễ cây chó đẻ thân xanh (*Phyllanthus amarus*) tươi với lượng 25kg. Sau khi rửa sạch bằng nước, để ráo và cắt nhỏ nguyên liệu đến kích thước khoảng 2 cm. Sau khi phơi nắng (7 ngày) đến khô hoàn toàn (trọng lượng không đổi) thu được 5kg nguyên liệu khô. Phần nguyên liệu này được xay thành bột mịn thu được 0,5 kg nguyên liệu thực vật dạng bột mịn.

Chuyển 05 kg nguyên liệu bột cây chó đẻ thân xanh vào thiết bị ngâm chứa 25 lít etanol 20% và ngâm trong 96 giờ. Quá trình này nhằm trích ly hoạt chất trong nguyên liệu vào dung môi. Sau đó, để cho etanol bay hơi tự nhiên (5 ngày) thu được hỗn hợp dịch chiết cây chó đẻ thân xanh với lượng etanol khoảng 5 %.

Hỗn hợp chế phẩm vi sinh thứ cấp trước đó đã được pha chế từ chế phẩm vi sinh gốc EM₁ từ Trung tâm Phát triển Công nghệ Việt Nhật, Hà Nội bằng cách phối trộn theo tỷ lệ bao gồm: nước: 5,5, rỉ đường: 1, dấm: 1, cồn 45°: 1, và chế phẩm vi sinh gốc (EM₁): 1 (theo trọng lượng). Hỗn hợp này được ủ kín trong điều kiện khuấy trong 96 giờ, duy trì với nhiệt độ từ 34⁰ C, pH 3,8 để thu chế phẩm vi sinh thứ cấp.

Bổ sung 25 lít dịch chiết cây chó đẻ thân xanh thu được ở trên với 75 lít chế phẩm vi sinh thứ cấp thu được 100 lít hỗn hợp. Tiến hành khuấy đều và ủ hỗn hợp trong điều kiện yếm khí trong 96 giờ. Sau đó, lọc hỗn hợp để loại bỏ 1 phần bã có kích thước lớn. Lượng bã có kích thước nhỏ còn lại khoảng 15% trọng lượng chế phẩm ở

dạng huyền phù. Kết quả thu được khoảng 100 lít chế phẩm sinh học có mùi men thơm ngọt tự nhiên của rỉ đường và mùi hăng đặc trưng của cây chó đẻ thân xanh.

Thành phần có trong 100 lít sản phẩm được xác định bao gồm 25 lít dịch chiết chứa các hoạt chất và bã huyền phù từ cây chó đẻ thân xanh và 75 lít chế phẩm sinh học thứ cấp chứa vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Lactobacillus plantarum* với lượng lớn hơn 10^5 CFU/mL.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích cho phép chiết xuất các thành phần hữu ích như *Phyllanthin* từ cây chó đẻ thân xanh (*Phyllanthus amarus*) kết hợp với vi sinh vật hữu ích *Bacillus subtilis* và *Lactobacillus plantarum* có trong chế phẩm vi sinh gốc để tạo ra chế phẩm sinh học làm thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản nhằm ức chế và tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh trên tôm, cá nước lợ.

Bằng cách cải tiến tăng thêm 0,5 đơn vị rỉ đường trong công thức phối trộn tỷ lệ dung môi (chế phẩm sinh học thứ cấp) nhằm làm trung hòa vị đắng có trong cây chó đẻ thân xanh, đồng thời giữ được gia tăng sinh khối cũng tạo môi trường cho các chủng vi sinh vật có lợi phát triển trong chế phẩm sinh học thứ cấp. Ngoài ra việc điều chỉnh dung môi chiết là etanol 20% với thời gian chiết 96 giờ để chiết bột khô cây chó đẻ thân xanh cho thấy giúp sản phẩm thu được có hiệu quả tiêu diệt vi sinh vật tốt hơn, đồng thời chế phẩm thu được bền hơn so với việc chiết xuất từ nguyên liệu tươi.

Chế phẩm sinh học thu được theo giải pháp hữu ích chứa thành phần hoạt chất từ cây chó đẻ thân xanh kết hợp với chế phẩm vi sinh chứa hai chủng vi sinh hữu ích *Bacillus subtilis* và *Lactobacillus plantarum* ngoài khả năng phòng trị bệnh hoại tử gan tụy trên tôm, xuất huyết trên cá, còn cung cấp các chủng vi sinh vật có lợi giúp hỗ trợ tiêu hóa và kích thích tăng trưởng cho tôm, cá như một nguồn dưỡng chất bổ sung giúp tăng cường sức đề kháng cũng như giúp tăng trưởng cho tôm cá nuôi góp phần phát triển ngành nuôi trồng thủy sản một cách bền vững và ổn định, giảm phụ thuộc vào các chất kháng sinh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học làm thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản, trong đó quy trình này gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu thực vật bằng cách thu hái cây chó đẻ thân xanh (*Phyllanthus amarus*) tươi bao gồm cả thân, lá, hạt và rễ, sau đó rửa sạch bằng nước và để ráo rồi cắt nhỏ đến kích thước khoảng từ 2 đến 3 cm, sau đó phơi hoặc sấy khô và xay thành bột thu được nguyên liệu thực vật ở dạng bột mịn;

b) thu hỗn hợp dịch chiết bằng cách ngâm nguyên liệu thực vật dạng bột mịn thu được ở trên với etanol 20% theo tỉ lệ 1:5 (trọng lượng/thể tích) trong 96 giờ để trích ly hoạt chất trong nguyên liệu, sau đó để etanol bay hơi tự nhiên trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày thu được hỗn hợp dịch chiết cây chó đẻ thân xanh có hàm lượng etanol nhỏ hơn 5%;

c) tạo chế phẩm vi sinh thứ cấp bằng cách phối trộn các thành phần bao gồm nước, rỉ đường, dấm, còn 45-50° và chế phẩm hỗn hợp vi sinh gốc (EM₁) chứa *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis* theo tỷ lệ phần trọng lượng là 5,5/1/1/1/1 để thu được hỗn hợp vi sinh thứ cấp chứa *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis* với lượng lớn hơn 10⁵ CFU/mL mỗi loại, sau khi khuấy trộn đều, bịt kín và ủ trong 96 giờ trong điều kiện duy trì nhiệt độ từ 34 đến 39⁰ C, pH từ 3,8 đến 4,5 thu được chế phẩm vi sinh thứ cấp; và

d) Thu chế phẩm sinh học bằng cách phối trộn hỗn hợp dịch chiết cây chó đẻ thân xanh với chế phẩm vi sinh thứ cấp theo tỷ lệ 1:3 (theo thể tích), sau khi ủ yếm khí trong 96 giờ trong điều kiện khuấy, lọc bỏ phần bã thô thu được chế phẩm sinh học dạng lỏng chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* và bã huyền phù từ cây chó đẻ thân xanh.