



(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)



1-0040676

(51)⁷ C12N 1/20; C12R 1/225; A23K 10/16; (13) B
A23K 20/00

(21) 1-2018-00537

(22) 03/06/2016

(86) PCT/KR2016/005889 03/06/2016

(87) WO/2017/026635 16/02/2017

(30) 10-2015-0113792 12/08/2015 KR

(45) 26/08/2024 437

(43) 25/06/2018 363A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

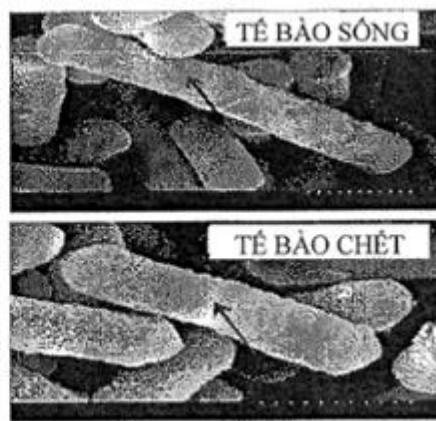
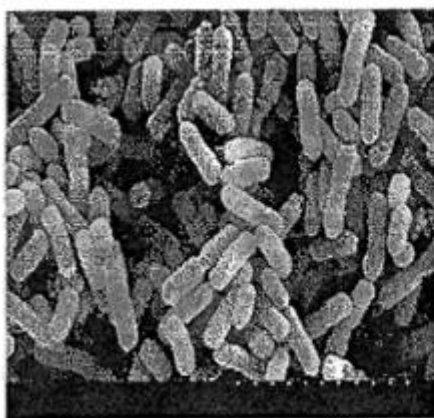
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 45060, Korea

(72) LEE, Joong Su (KR); BAE, Gi Duk (KR); LEE, Eun Kyung (KR); KIM, Sung Hun (KR); CHEE, Seok Woo (KR).

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

(54) CHỦNG VI SINH VẬT LACTOBACILLUS SP., CHẾ PHẨM DÙNG CHO THỨC ĂN CHĂN NUÔI VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT TẾ BÀO BẤT HOẠT CỦA CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi sinh vật *Lactobacillus* dùng làm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa tế bào bất hoạt của chủng này, và phương pháp sản xuất tế bào bất hoạt của chủng này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi sinh vật *Lactobacillus* sp. mới và chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lactobacillus sp. là vi khuẩn axit lactic lên men đồng thể hoặc lên men dị thể có thể thường được tìm thấy trong đường ruột của động vật, kể cả người, và trong quá trình lên men của các sản phẩm sữa và rau củ. *Lactobacillus* sp. duy trì độ pH axit của ruột để ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn có hại như *E. coli* và *Clostridium* sp. và để cải thiện bệnh tiêu chảy và táo bón. *Lactobacillus* sp. được biết đến là có vai trò trong quá trình tổng hợp vitamin, hoạt tính chống ung thư, làm giảm cholesterol trong huyết thanh, và v.v..

Các nghiên cứu đã được thực hiện trên probiotic dưới dạng các chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo những đặc tính nêu trên của vi sinh vật *Lactobacillus* sp. Bệnh tiêu chảy do vi khuẩn gây ra trong chăn nuôi sẽ làm giảm tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống. Do đó, để tăng năng suất chăn nuôi, nhiều kháng sinh khác nhau đã được bổ sung vào chế độ ăn của động vật ở liều lượng được phẩm. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, vấn đề kháng kháng sinh và tác dụng độc hại của chất kháng sinh còn lại trong sản phẩm thịt đã được thảo luận trên phạm vi toàn thế giới do việc sử dụng quá mức. Theo đó, các chính phủ ở nhiều quốc gia đã bắt đầu hạn chế việc sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi và nghĩ tới phương pháp hữu cơ để nuôi vật nuôi (công bố đơn patent Hàn quốc số 10-1998-78358) (McEwen and Fedorka-Cray, Antimicrobial use and resistance in animals, Clinical infectious Diseases, tập 34, 6.2002, trang S93-S106).

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng những tế bào đã bị giết chết bằng nhiệt hoặc đã bị chết (sau đây gọi là bất hoạt) của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 thuộc giống *Lactobacillus* có các tác dụng sau. Đầu tiên, các tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 có khả năng ức chế sự bám dính cạnh tranh của các vi khuẩn đường ruột có hại vào các tế bào biểu mô ruột, góp phần tạo nên sự hình thành của hệ thực vật vi khuẩn đường ruột. Các tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 sản xuất ra axit lipoteichoic để ngăn ngừa các vi khuẩn đường ruột có hại xâm nhập vào màng niêm mạc ruột. Axit lipoteichoic là thành phần cấu thành nên thành tế bào được loại bỏ khỏi các tế bào vi khuẩn bất hoạt có thành tế bào bị phá hủy trong ruột non. Kết quả là, các vi khuẩn đường ruột có hại như *E. coli* và *Salmonella* sp. không bị hấp phụ vào bề mặt của màng niêm mạc ruột trong môi trường ruột và bài tiết bởi các chất bài tiết ở ruột và sự nhu động ruột. Ngoài ra, việc sử dụng các tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 trong thức ăn chăn nuôi có tác dụng gia tăng tỷ lệ tăng trọng của động vật và dẫn đến tăng hiệu quả của thức ăn chăn nuôi do chúng có khả năng phân hủy các triglycerit. Hơn nữa, việc hấp thu thức ăn chăn nuôi bao gồm các tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 có tác dụng tăng cường miễn dịch của động vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng vi sinh vật *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 là *Lactobacillus* sp. mới và chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa tế bào bất hoạt của *Lactobacillus* sp. và nhằm mục đích cải thiện tỷ lệ tăng trọng của động vật và cải thiện tính miễn dịch của động vật chống lại bệnh tật khi động vật tiêu hóa thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm thức ăn chăn nuôi.

Giải pháp kỹ thuật

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng vi sinh vật *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) hoặc tế bào bất hoạt của chủng này.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P), bao gồm các bước: nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) để điều chế dung dịch nuôi cấy, gia nhiệt gián tiếp dung dịch nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 160°C bằng cách sử dụng thiết bị trao đổi nhiệt, làm lạnh nhanh dung dịch nuôi cấy đã gia nhiệt gián tiếp đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 60°C ở tốc độ nằm trong khoảng từ 10 đến 100l/phút, và phân lập tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) từ dung dịch nuôi cấy đã làm lạnh nhanh.

Tác dụng có lợi

Tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 theo sáng chế có khả năng phân hủy triglycerit, hấp phụ nội độc tố, ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh, và hoạt hóa các enzym tiêu hóa. Nhờ khả năng này, thức ăn chăn nuôi chứa các tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 có thể cải thiện tỷ lệ tăng trọng hàng ngày của động vật và tính miễn dịch của động vật chống lại bệnh tật.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hình ảnh hiển vi điện tử của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505.

Fig. 2 thể hiện cây phát sinh chủng loại của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505.

Fig. 3 thể hiện ảnh hiển vi điện tử cho biết số lượng tế bào vi khuẩn bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 và *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450 dưới dạng chủng tiêu chuẩn bám dính vào tế bào nội mô ruột sau khi khả năng bám dính của các chủng này vào tế bào nội mô ruột được đánh giá.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mô hình tốt nhất

Ở đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn. Việc bộc lộ không được thể hiện ở đây sẽ dễ dàng nhận biết và đánh giá cao bởi người có trình độ trong lĩnh vực này và do đó việc mô tả chúng sẽ được bỏ qua.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P).

Các tác giả sáng chế đã lấy mẫu đầu xa của ruột non của lợn con, rửa mẫu bằng nước cất vô khuẩn và phủ mẫu đã rửa lên môi trường MRS đã bổ sung 0,001% tím đỏ bromcresol (BCP: bromcresol purple). Sau khi nuôi cấy kỵ khí ở nhiệt độ 37°C, 47 chủng tạo ra axit lactic được sàng lọc. Các chủng đã sàng lọc được nuôi cấy thứ cấp và 23 loài trong số chúng được phân lập lần thứ hai bằng phương pháp hình thái. Hoạt tính chống vi khuẩn và hoạt tính enzym tiêu hóa của 23 loài được so sánh. Trong số các loài này, 11 loài được phân lập lần thứ ba. 11 chủng tạo ra axit lactic phân lập được được đo về khả năng dung nạp axit mật, khả năng dung nạp axit, và khả năng hấp phụ ở tế bào trên thành ruột của động vật. Một chủng có các đặc tính tốt nhất về lên men đường, khả năng ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh, hoạt tính enzym tiêu hóa, và khả năng phân hủy triglycerit được phân lập cuối cùng.

Chủng tạo ra axit lactic được phân lập cuối cùng được gọi là *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 và được lưu giữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc (KCCM) vào ngày 8 tháng 7, 2015 (số đăng ký

KCCM11721P).

Các đặc tính hình thái và sinh lý của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

1. Đặc tính hình thái (Hình thái học khi phát triển trong môi trường MRS rắn)	
- Hình dạng tế bào	Bacillus
- Sự đa hình của tế bào	-
- Tính di động	-
- Sự hình thành bào tử	-
2. Đặc tính sinh lý	
- Nhuộm gram	Gram dương
- Catalaza	Âm
- Oxidaza	Âm
- Nhiệt độ và thời gian phát triển	37°C, 18-48 giờ
- Nhu cầu oxy	Kỵ khí không bắt buộc

Như thể hiện trên Fig. 1, *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 là dạng trực khuẩn và không tạo ra bào tử. Tế bào sống và tế bào bất hoạt của chúng được phân biệt với nhau bởi hoạt tính của glycoprotein trên bề mặt thành tế bào.

Lactobacillus rhamnosus CJLR1505 được phân tích bằng cách sử dụng kit API dùng cho thử nghiệm sinh hóa. Kết quả là, *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được xác định là có khả năng huy động đường tương tự như *Lactobacillus rhamnosus*, như được thể hiện trên Bảng 2. Trình tự rARN 16s của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được yêu cầu để giải trình tự (Macrogen). Kết quả là, các đặc tính sinh học phân tử của

Lactobacillus rhamnosus CJLR1505 được phát hiện là tương tự (99%) với các đặc tính sinh học của chủng *Lactobacillus rhamnosus*, như thể hiện trên Fig. 2.

Bảng 2: Phân tích khả năng huy động đường của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505

Số thứ tự	Đường	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJLR1505
0	Temoin	-
1	Glyxerol	-
2	Erythritol	-
3	D-arabinoza	+
4	L-arabinoza	-
5	D-riboza	+
6	D-xyloza	-
7	L-xyloza	-
8	D-adonitol	-
9	Metyl- α D-xylopyranosit	-
10	D-galactoza	+
11	D-glucoza	+
12	D-fructoza	+
13	D-mannoza	+
14	L-sorboza	-
15	L-rhamnoza	+
16	D-ulxitol	+
17	Inositol	$\pm$
18	D-manitol	+
19	D-sorbitol	+
20	Metyl- α D-mannopyranosit	-
21	Metyl- α D-glucopyranosit	-
22	N-axetylglucosamin	+
23	Amygdalin	+
24	Arbutin	+
25	Aesculin	+
26	Salixin	+
27	D-xenlobioza	+
28	D-maltoza	-
29	D-lactoza	+
30	D-melibioza	-
31	D-sacaroza	+
32	D-trehaloza	+

33	Inulin	-
34	D-melezitoza	+
35	D-raffinoza	+
36	Amidon	-
37	Glycogen	-
38	Xylitol	-
39	Gentiobioza	+
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 rhamnosus CJLR1505 (KCCM11721P) có khả năng dung nạp axit, khả năng dung nạp axit mật, hoạt tính chống vi khuẩn, hoạt tính enzym tiêu hóa, và khả năng phân hủy triglycerit rất tốt. Nhờ các ích lợi này, thức ăn chăn nuôi chứa *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) có hiệu quả cao và có tác dụng cải thiện tỷ lệ tăng trọng của động vật.

Tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) có khả năng ức chế sự bám dính cạnh tranh của các vi khuẩn đường ruột có hại vào tế bào nội mô ruột, góp phần hình thành khu hệ vi khuẩn đường ruột. Tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) sinh ra axit lipoteichoic ngăn ngừa các vi khuẩn đường ruột có hại định vị trên niêm mạc ruột. Axit lipoteichoic là yếu tố cấu thành của màng tế bào tách ra khỏi tế bào vi khuẩn bất hoạt có thành tế bào bị phá hủy trong ruột non. Ngoài ra, tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) có thể bám dính vào các vi sinh vật gây bệnh và nội độc tố để tăng cường tính miễn dịch của động vật chống lại bệnh tật nhờ

tính kỵ nước cao hơn và xu hướng kết tập mạnh hơn của chúng so với các tế bào sống của chúng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) hoặc tế bào bất hoạt của chúng.

Chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể chứa thêm chất mang. Chất mang này không bị giới hạn cụ thể và có thể là chất mang bất kỳ trong số các chất mang đã biết trong lĩnh vực này.

Ví dụ về các chất mang thích hợp bao gồm sacarit (ví dụ, lactoza, D-manitol, D-sorbitol và sucroza), tinh bột (ví dụ, tinh bột ngô và tinh bột khoai tây), và muối vô cơ (ví dụ, canxi phosphat, canxi sulfat, và canxi cacbonat kết tủa). Chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể chứa *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) hoặc tế bào bất hoạt của chúng với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ cfu đến $1,0 \times 10^{10}$ cfu mỗi gram. Cụ thể là, chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể chứa *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) hoặc tế bào bất hoạt của chúng với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ cfu đến $3,0 \times 10^9$ cfu mỗi gram. Ví dụ, chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể chứa *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) hoặc tế bào bất hoạt của chúng với lượng 5×10^8 cfu mỗi gram.

Khi hàm lượng của tế bào vi khuẩn bất hoạt nằm trong khoảng xác định nêu trên, khả năng phân hủy triglycerit, hấp phụ nội độc tố, ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh, và hoạt hóa enzym tiêu hóa của chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể được tăng tối đa.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất thức ăn chăn nuôi được sản xuất bằng cách sử dụng chế phẩm thức ăn chăn nuôi. Thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách trộn chế phẩm thức ăn chăn nuôi với thức ăn chăn nuôi chung. Thức ăn chăn nuôi chung có thể chứa các thành phần thông thường, ví dụ, ngô, đậu nành, dầu đậu nành, và axit amin. Theo

phương án khác, thức ăn chăn nuôi có thể được sản xuất bằng cách trộn chế phẩm thức ăn chăn nuôi với chế phẩm thức ăn chăn nuôi khác.

Thức ăn chăn nuôi không bị giới hạn cụ thể miễn là nó cung cấp cho vật nuôi như bò, lợn, và ngựa. Ví dụ, thức ăn chăn nuôi có thể là thức ăn dành cho lợn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P), bao gồm bước nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) để điều chế dung dịch nuôi cấy, gia nhiệt gián tiếp dung dịch nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 160°C bằng cách sử dụng thiết bị trao đổi nhiệt, làm lạnh nhanh dung dịch nuôi cấy đã gia nhiệt gián tiếp đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 60°C ở tốc độ nằm trong khoảng từ 10l/phút đến 100l/phút, và phân lập tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) từ dung dịch nuôi cấy đã làm lạnh nhanh.

Cụ thể là, tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) có thể được sản xuất bằng phương pháp sau. Đầu tiên, *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) được nuôi cấy trong môi trường thạch MRS để điều chế dung dịch nuôi cấy. Theo một phương án, *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) có thể được phủ lên môi trường thạch MRS bằng cách sử dụng một cái vòng và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ để điều chế dung dịch nuôi cấy.

Sau đó, dung dịch nuôi cấy được gia nhiệt gián tiếp ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 160°C bằng cách sử dụng thiết bị trao đổi nhiệt. Cụ thể là, dung dịch nuôi cấy có thể được gia nhiệt gián tiếp ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 150°C, cụ thể hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 90°C đến 120°C.

Dung dịch nuôi cấy đã gia nhiệt gián tiếp được làm lạnh nhanh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 60°C, cụ thể là nhiệt độ nằm trong

khoảng từ 20°C đến 50°C, ví dụ, 4°C, ở tốc độ nằm trong khoảng từ 10l/phút đến 100l/phút. Sau đó, tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) được phân lập từ dung dịch nuôi cấy đã làm lạnh nhanh.

Phương pháp này còn có thể bao gồm bước trộn chất bảo vệ với tế bào bất hoạt đã phân lập, tiếp theo là bước sấy phun.

Chất bảo vệ không bị giới hạn cụ thể và, ví dụ, có thể được chọn từ nhóm bao gồm dịch chiết nấm men, dextroza, đường thô, và hỗn hợp của chúng. Bước trộn với chất bảo vệ và bước sấy phun tiếp theo ngăn ngừa tế bào bất hoạt bị nhiễm bẩn bởi các yếu tố môi trường bên ngoài và tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân bố các tế bào bất hoạt.

Sấy phun là quy trình trong đó chất lỏng được phun cùng một lúc dưới luồng không khí nóng để thu được sản phẩm lỏng khô. Ví dụ về quy trình sấy phun thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phun ly tâm bằng cách sử dụng một đĩa quay và ấn phun áp lực bằng cách sử dụng đầu phun gia áp.

Cụ thể hơn, các tế bào bất hoạt được trộn với dịch chiết nấm men, dextroza, và đường thô, và hỗn hợp tạo ra được sấy phun để thu được bột. Ví dụ, các tế bào bất hoạt có thể được trộn với đường (ví dụ, đường thô) và/hoặc tinh bột (ví dụ, dextroza), tạo huyền phù trong nước (ví dụ, nước cất), và sấy phun để thu được bột. Trong quá trình sấy phun, không khí nóng đi vào qua đầu vào ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120°C đến 200°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 130°C đến 170°C, và thoát ra qua đầu ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 150°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50°C đến 100°C. Tuy nhiên, bước sấy phun không bị giới hạn bởi các điều kiện này.

Dịch chiết nấm men được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 0,04 đến 50 phần trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 phần trọng lượng, dựa trên 100 phần trọng lượng của hỗn hợp. Dextroza được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100 phần trọng lượng, cụ thể

hơn là, nằm trong khoảng từ 10 đến 50 phần trọng lượng, dựa trên 100 phần trọng lượng của hỗn hợp. Đường thô được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 0,2 đến 50 phần trọng lượng, cụ thể hơn là, nằm trong khoảng từ 0,4 đến 10 phần trọng lượng, dựa trên 100 phần trọng lượng của hỗn hợp.

Sau khi sấy phun, bột của tế bào vi khuẩn đã chết có thể được trộn với muối vô cơ (ví dụ, canxi phosphat, canxi sulfat hoặc canxi cacbonat). Muối vô cơ (ví dụ, canxi cacbonat) có lợi trong việc kiểm soát hàm lượng ẩm của bột tế bào bất hoạt do tính hút ẩm của nó.

Cụ thể hơn là, bột của các tế bào bất hoạt có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 50% (trọng lượng), cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 30% (trọng lượng), cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5% (trọng lượng), và muối vô cơ (ví dụ, canxi cacbonat) có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 80% (trọng lượng), cụ thể là nằm trong khoảng từ 5 đến 50% (trọng lượng), cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 20% (trọng lượng), dựa trên tổng trọng lượng của thức ăn chăn nuôi.

Chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa tế bào bất hoạt với lượng ít nhất 10^8 cfu, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^{10} cfu, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10^9 đến 10^{10} cfu mỗi gram. Chế phẩm này tùy ý chứa thêm chất vô cơ với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 99% (trọng lượng), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 90% (trọng lượng), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 10% (trọng lượng).

Phương thức thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, cần hiểu rằng những ví dụ này chỉ được cung cấp để minh họa và không được hiểu dưới bất kỳ hình thức nào là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Việc mô tả chi tiết hiển nhiên đối với người có trình độ trong lĩnh vực này sẽ được bỏ qua.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ thực nghiệm từ 1 đến 6

Lactobacillus rhamnosus CJLR1505 (KCCM11721P) được đánh giá về độ an toàn, khả năng dung nạp axit, khả năng dung nạp axit mật, hoạt tính chống vi khuẩn, hoạt tính enzym tiêu hóa, và khả năng phân hủy triglycerit. *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450 đã biết được sử dụng làm chủng cạnh tranh.

Ví dụ thực nghiệm 1

Đánh giá độ an toàn của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P)

Độ an toàn của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) được đánh giá bởi sự tan huyết, hóa lỏng gelatin, và thử nghiệm phenylalanin deaminaza theo phương pháp thử nghiệm chuẩn đối với độ an toàn được đề xuất bởi Hiệp hội dự án sinh học Hàn quốc (Korea Bioventure Association). Thử nghiệm được thực hiện để nghiên cứu xem liệu các chất chuyển hóa có hại (ví dụ, amoniac) có được tạo ra hay không. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Chủng	Thử nghiệm			
	Hóa lỏng gelatin	Phenylalanin deaminaza	Tan huyết	Tạo amoniac
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJLR1505	Âm tính	Âm tính	Tan huyết α , An toàn	Âm tính

Như có thể được thấy từ kết quả trong bảng 3, *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) âm tính trong tất cả các thử nghiệm,

bao gồm thử nghiệm hóa lỏng gelatin và thử nghiệm phenylalanin deaminaza. *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) không tạo ra amoniac. *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) là an toàn trong thử nghiệm tan huyết.

Ví dụ thực nghiệm 2

Đánh giá khả năng dung nạp axit của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P)

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 và chủng cạnh tranh *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450 được nuôi cấy sơ bộ trong môi trường MRS. Hai chủng này được pha loãng 10^{-6} lần bằng canh thang MRS có độ pH được điều chỉnh đến các giá trị 2, 3, và 7. Dung dịch vi khuẩn đã pha loãng được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C , phủ lên đĩa thạch MRS ở thời điểm đã xác định trước, và nuôi cấy kỵ khí trong 48 giờ. Sau khi nuôi cấy, số lượng khuẩn lạc được đếm. Kết quả của thử nghiệm dung nạp axit được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Chủng	Canh thang MRS (pH=7)			Canh thang MRS (pH=2)			Canh thang MRS (pH=3)		
	Số lượng tế bào sống (CFU/ml)			Số lượng tế bào sống (CFU/ml)			Số lượng tế bào sống (CFU/ml)		
	0 giờ	1 giờ	3 giờ	0 giờ	1 giờ	3 giờ	0 giờ	1 giờ	3 giờ
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJLR1505	$5,8 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$5,8 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCCM 32450	$6,4 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$	$8,6 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$6,4 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$

Như có thể được nhận thấy từ kết quả trong bảng 4, số lượng tế bào sống của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được giảm ít hơn so với số lượng tế bào sống của chủng cạnh tranh *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450, cho thấy mức dung nạp axit tốt hơn của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505.

Ví dụ thực nghiệm 3

Đánh giá khả năng dung nạp axit mật của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P)

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 và chủng cạnh tranh *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450 được nuôi cấy sơ bộ trong môi trường MRS. Hai chủng nuôi cấy được điều chỉnh đến độ pH=4. Dung dịch axit mật (Oxgall) được thêm vào các giống nuôi cấy sao cho nồng độ bằng 0%, 0,3%, và 1%. Hỗn hợp này được pha loãng 10^{-6} lần bằng canh thang MRS. Dung dịch loãng chưa vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, được phủ lên môi trường thạch MRS ở các thời điểm đã định trước, và nuôi cấy kỵ khí trong 48 giờ. Sau khi nuôi cấy, số lượng khuẩn lạc được đếm. Kết quả được tổng hợp trong bảng 5.

Bảng 5

Chủng	Canh thang MRS (pH=4)			Canh thang MRS (pH=4 và Oxgall 0,3%)			Canh thang MRS (pH=4 và Oxgall 1%)		
	Số lượng tế bào sống (CFU/ml)			Số lượng tế bào sống (CFU/ml)			Số lượng tế bào sống (CFU/ml)		
	0 giờ	1 giờ	3 giờ	0 giờ	1 giờ	3 giờ	0 giờ	1 giờ	3 giờ
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJLR1505	$1,8 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$1,8 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$6,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$7,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^4$
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCCM 32450	$1,6 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$4,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^7$	$4,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2$

Như có thể được quan sát thấy từ kết quả trong bảng 5, nhận thấy rằng số lượng tế bào có thể sống được của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 không giảm đáng kể trong cả dung dịch Oxgall 0,3% và dung dịch Oxgall 1% ở độ pH=4. Ngoài ra, số lượng tế bào sống của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 bị giảm ít hơn so với số lượng tế bào sống của chủng tiêu chuẩn, điều này cho thấy rằng *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 có thể phát triển ngay cả khi có mặt của axit mật trong động vật.

Ví dụ thực nghiệm 4

Đánh giá hoạt tính chống vi khuẩn của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P)

Bốn loài vi khuẩn gây bệnh (*E. coli* K88, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* KCCM 25922, và *Salmonella choleraesuis* KCCM 10709) được nuôi cấy ở dạng lỏng trong 24 giờ. Các giống nuôi cấy (nồng độ mỗi giống là 10^{5-6} cfu) được phủ bằng tăm bông vô khuẩn lên môi trường canh thang đậu nành chứa tryptic (TSB: tryptic soy broth) (BD, USA).

Sau khi phủ, *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 và *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450 được pha loãng đến nồng độ 10^9 cfu/ml bằng dung dịch đệm PBS. Các dung dịch vi khuẩn loãng (mỗi dung dịch 50µl) được phủ lên đĩa giấy (đường kính 4mm) và để yên ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi chúng thấm đủ vào đĩa giấy, tiếp theo nuôi cấy hiếu khí ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ. Dung dịch nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 3000 ×g trong 10 phút. Dịch nổi lên trên được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm PBS để phân lập chỉ các tế bào vi khuẩn. Kích thước của vùng ức chế được xác định dưới dạng độ khác biệt giữa đường kính của vùng hoàn toàn trong suốt và đường kính của lỗ thạch. Kết quả được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Chủng	<i>E. coli</i> K88	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> KCCM 25922	<i>Salmonella</i> <i>cholerasuis</i> KCCM 10709
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> CJLR1505	++	+++	+++	++
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> KCCM 32450	++	++	++	++

10-15 mm: +, 15-20 mm: ++, 21-25 mm: +++.

Như có thể được nhận thấy từ kết quả trong bảng 6, cả chủng *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 và chủng tiêu chuẩn *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450 đều thể hiện tác dụng ức chế lên sự tăng sinh của các vi sinh vật gây bệnh nhưng chủng *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được phát hiện là có hoạt tính chống vi khuẩn tốt hơn so với chủng tiêu chuẩn *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450l.

Các kết quả này có liên quan đến các tác dụng cố hữu của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 chứ không phải là tác dụng của các chất chuyển hóa được tạo ra từ chủng, điều này chứng minh rằng chủng này có thể ức chế sự tăng sinh của các vi khuẩn gây bệnh khi cung cấp cho động vật.

Ví dụ thực nghiệm 5

Đánh giá hoạt tính enzym tiêu hóa của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P)

Thử nghiệm này được thực hiện để xác định xem liệu chủng *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) có enzym có khả năng phân hủy carbohydrat, protein, và phospho hay không.

Sữa gầy 0,5% được thêm vào môi trường thạch MRS để nghiên cứu xem liệu chủng này có hoạt tính proteaza hay không. 0,2% metyl xenluloza được thêm vào môi trường thạch MRS để nghiên cứu xem liệu chủng này có hoạt tính xenluloza hay không. 0,2% (trọng lượng/thể tích) tinh bột ngô được thêm vào môi trường thạch MRS để nghiên cứu xem liệu chủng này có hoạt tính α -amylaza hay không, và môi trường được bổ sung 0,5% Ca-phytat được điều chế để nghiên cứu xem liệu chủng này có hoạt tính phytaza hay không. Các chủng đã phân lập được tạo vạch cấy lên môi trường đã điều chế, nuôi cấy trong 24 giờ, và quan sát.

Môi trường nuôi cấy được xử lý bằng chất phản ứng đỏ Congo 2% (Sigma, USA) và rửa bằng dung dịch natri clorua (NaCl) 1M. Hoạt tính α -amylaza và xenluloza được xác định bằng cách quan sát sự thay đổi màu sắc. Hoạt tính proteaza và phytaza được xác định phụ thuộc vào việc liệu vùng trong suốt có được tạo thành hay không. Kết quả được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7

Chủng	Hoạt tính proteaza	Hoạt tính phytaza	Hoạt tính lipaza	Hoạt tính xenluloza	Hoạt tính amylaza
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJLR1505	+++	+++	++++	++++	++++
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCCM 32450	++	++	+++	+++	+++

1-10 mm: +, 11-20 mm: ++, 21-30 mm: +++, 31-35 mm: ++++

Như có thể được nhận thấy từ kết quả trong bảng 7, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 có hoạt tính enzym tiêu hóa cao hơn chủng tiêu chuẩn *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450.

Các kết quả này chứng minh rằng *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 có thể cải thiện hiệu quả của thức ăn chăn nuôi khi cung cấp cho động vật nuôi.

Ví dụ thực nghiệm 6

Đánh giá khả năng hoạt hóa sự phân hủy triglycerit của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P)

Hoạt tính hydroxylaza muối mật (BSH: bile salt hydrolase) của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được nghiên cứu. Kết quả là, chất kết tủa màu trắng được tạo thành trong môi trường MRS rắn đã bổ sung taurodeoxycholat hydrat 2mM (TDCA, Sigma, USA), chứng minh hoạt tính enzym của chủng này. *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 thể hiện profil kết tủa tương tự với chủng tiêu chuẩn *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450 dưới dạng đối chứng dương TDCA. Tuy nhiên, không quan sát thấy sự kết tủa trong môi trường đã bổ sung natri glycodeoxycholat 2mM (GDCA, Sigma, USA) và sự phát triển của vi khuẩn bị hạn chế. Kết quả được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8

Tên axit mật/chủng liên hợp	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJLR1505	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCCM 32450
TDCA	+	+
GDCA	+	-

+: phát triển, -: không phát triển

Như có thể quan sát được từ kết quả trong bảng 8, *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 có khả năng dung nạp axit mật cao và tạo ra BSH có khả năng phân hủy triglycerit. Các kết quả này cho biết rằng *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 là chủng chức năng mà có thể tác động đến sự tăng trọng của động vật khi cung cấp cho động vật.

Ví dụ thực nghiệm từ 7 đến 9

Mỗi *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) và *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450 dưới dạng chủng tiêu chuẩn được

phủ lên trong môi trường thạch MRS bằng cách sử dụng vòng và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ.

Sau đó, dung dịch nuôi cấy được gia nhiệt gián tiếp ở nhiệt độ 100°C bằng cách sử dụng thiết bị trao đổi nhiệt và làm lạnh nhanh đến 10°C ở tốc độ nằm trong khoảng từ 30l/phút đến 100l/phút. Tế bào bất hoạt của chúng được phân lập từ dung dịch nuôi cấy đã làm lạnh nhanh.

Khả năng của các tế bào bất hoạt bám dính vào tế bào nội mô ruột được kiểm tra. Tính kỵ nước của tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 và xu hướng kết tụ của tế bào bất hoạt của chúng được so sánh với tế bào sống của chủng này. Mức tăng trọng hằng ngày và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn chăn nuôi của thức ăn chăn nuôi thông thường chứa tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được so sánh thức ăn chăn nuôi thông thường không chứa tế bào bất hoạt của chúng.

Ví dụ thực nghiệm 7

Đánh giá khả năng của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) bám dính vào tế bào nội mô ruột

Tế bào HT-29 là tế bào động vật được mua từ Ngân hàng dòng tế bào Hàn quốc (KCLB: Korea Cell Line Bank) và khả năng của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) bám dính vào tế bào nội mô ruột được thử nghiệm theo phương pháp của Kim và các đồng tác giả (Kim et. al., Probiotic properties of *Lactobacillus* and Bifidobacterium strains isolated from porcine gastrointestinal tract, Applied Microbiology and Biotechnology, tập 74, 4.2007, trang 1103-1111) và Hirano và các đồng tác giả (Hirano et. al., The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic Escherichia coli infection of human intestinal cells in vitro, Microbiology and Immunology, tập 47, 2003, trang 405-109). Tế bào HT-29 tạo đơn lớn được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm PBS và 0,5ml môi trường RPMI1640 không chứa kháng sinh được thêm vào đó.

Tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 và tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450 ở nồng độ khoảng 10^9 tế bào/ml được tạo huyền phù trong môi trường RPMI, cấy nhiễm vào các đĩa có lỗ, và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ. Sau khi nuôi cấy xong, mỗi giống nuôi cấy được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm PBS để loại bỏ tế bào bất hoạt không bám dính chúng và xác nhận khả năng bám dính vào tế bào nội mô ruột sau khi rửa của chủng này. Sau khi nhuộm gram, số lượng tế bào bất hoạt được đếm dưới kính hiển vi để đánh giá khả năng bám dính vào tế bào nội mô ruột. Kết quả thực nghiệm được thể hiện trên Fig. 3.

Kết quả thực nghiệm cho thấy rằng số lượng tế bào vi khuẩn bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 sau 2 giờ được xác nhận là $5,4 \times 10^8$ tế bào/ml, là lớn hơn số lượng ($3,2 \times 10^6$ tế bào/ml) của tế bào bất hoạt của chủng tiêu chuẩn *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32450, xác nhận khả năng bám dính vào tế bào nội mô ruột của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 là tốt hơn.

Ví dụ thực nghiệm 8

Đánh giá tính kỵ nước của tế bào sống và tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 và xu hướng kết tụ của tế bào sống và tế bào bất hoạt của chúng

Sự tự kết tụ và kết tụ đồng thời được đánh giá để xác nhận các khác biệt về tính kỵ nước và xu hướng kết tụ giữa tế bào sống và tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505.

Sự tự kết tụ được đánh giá bằng phương pháp sau. Đầu tiên, tế bào sống hoặc tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được pha loãng đến OD₆₀₀ bằng 0,5. 1ml toluen được thêm vào 3ml chủng loãng, tiếp theo khuấy mạnh trong 90 giây. Sau đó, hỗn hợp này được để yên trong chậu nước ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi loại bỏ toluen, OD₆₀₀ của lớp nước được đo.

Sự kết tụ đồng thời được đánh giá bằng phương pháp sau. Đầu tiên, tế

bào sống hoặc tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được trộn với lượng tương tự của *E. coli* K88, *Salmonella typhimurium* KCCM 25922 hoặc *Salmonella cholerasuis* KCCM 10709 làm vi sinh vật gây bệnh (nghĩa là vi sinh vật gây bệnh: tế bào sống hoặc tế bào bất hoạt = 1:1 (mỗi loại 1,5ml). 1ml toluen được thêm vào 3ml hỗn hợp, tiếp theo khuấy mạnh trong 90 giây. Sau đó, hỗn hợp tạo ra được để yên trong chậu nước ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi loại toluen, OD₆₀₀ của lớp nước được đo.

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

Kết quả của sự tự kết tụ và sự kết tụ đồng thời được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9

Chủng gây bệnh		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJLR1505	
		Tế bào sống	Tế bào bất hoạt
Tự kết tụ		11%	35%
Kết tụ đồng thời	<i>E. coli</i> K88	45%	87%
	<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 25922	30%	65%
	<i>Salmonella cholerasuis</i> KCCM 10709	15%	45%

Như có thể quan sát được từ kết quả trong bảng 9, sự tự kết tụ và sự kết tụ đồng thời của tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 cao hơn từ 2-3 lần so với tế bào sống của chủng này. Tính kỵ nước ngoại tế bào của loài vi sinh vật và xu hướng kết tụ của các loài vi sinh vật bị ảnh hưởng bởi các đặc tính và cấu trúc bề mặt của protein bề mặt tế bào. Tính kỵ nước của tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 và xu hướng kết tụ của tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 gia

tăng do cấu trúc protein bề mặt của tế bào bất hoạt của chúng là khác biệt với tế bào sống của chúng, như thể hiện trên Fig. 1. Do đó, *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được hy vọng là có khả năng làm chúng chức năng bám dính vào nội độc tố, ảnh hưởng tới sự kháng bệnh.

Ví dụ thực nghiệm 9

So sánh thức ăn chăn nuôi chứa tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 với thức ăn chăn nuôi thông thường

Hỗn hợp cuối cùng chứa tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 được thêm vào thức ăn chăn nuôi thông thường với liều lượng 0,2% (trọng lượng) để tạo ra thức ăn chăn nuôi thực nghiệm trong chế độ ăn của lợn con đã cai sữa. Thức ăn chăn nuôi thông thường cho lợn con đã cai sữa được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi đối chứng. Thức ăn chăn nuôi được cung cấp cho lợn con đã cai sữa trong 28 ngày. Trọng lượng cơ thể ban đầu (kg), trọng lượng cơ thể cuối cùng (kg), mức tăng trọng hằng ngày (g), lượng thức ăn tiêu thụ hằng ngày (g), và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn của động vật được đo. Kết quả được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10

	Nhóm được sử dụng tế bào bất hoạt của <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJLR1505	Nhóm đối chứng
Số lượng đầu động vật được thử nghiệm	24	24
Trọng lượng ban đầu (kg)	6,98	7,00
Trọng lượng cuối cùng (kg)	18,86*	17,76
Mức tăng trọng hằng ngày (g)	425*	383
Lượng thức ăn tiêu thụ hằng	528	526

ngày (g)		
Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn	1,25*	1,38

* Sự khác biệt đáng kể (thống kê) so với nhóm đối chứng.

Như có thể quan sát được từ kết quả trong bảng 10, nhóm được sử dụng tế bào bất hoạt của *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 thể hiện kết quả tốt hơn đáng kể cả về mức tăng trọng hằng ngày và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn so với nhóm đối chứng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi sinh vật *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P).
2. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chủng vi sinh vật *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) hoặc tế bào bất hoạt của chủng này.
3. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo điểm 2, trong đó chế phẩm này còn chứa chất mang.
4. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo điểm 2 hoặc 3, trong đó chế phẩm thức ăn chăn nuôi này chứa tế bào bất hoạt của chủng vi sinh vật *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ cfu đến $1,0 \times 10^{10}$ cfu mỗi gram.
5. Thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4.
6. Phương pháp sản xuất tế bào bất hoạt của chủng vi sinh vật *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P), bao gồm bước nuôi cấy chủng vi sinh vật *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) này để điều chế dung dịch nuôi cấy, gia nhiệt gián tiếp dung dịch nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 160°C bằng cách sử dụng thiết bị trao đổi nhiệt, làm lạnh nhanh dung dịch nuôi cấy đã gia nhiệt gián tiếp đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 60°C ở tốc độ nằm trong khoảng từ 10l/phút đến 100l/phút, và phân lập tế bào bất hoạt của chủng vi sinh vật *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P) từ dung dịch nuôi cấy đã làm lạnh nhanh.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước trộn chất bảo vệ với tế bào bất hoạt đã được phân lập của chủng vi sinh vật *Lactobacillus rhamnosus* CJLR1505 (KCCM11721P), tiếp theo là bước sấy phun hỗn hợp thu được.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó chất bảo vệ được chọn từ nhóm bao gồm dịch chiết nấm men, dextroza, đường thô, và hỗn hợp của chúng.

Fig. 1

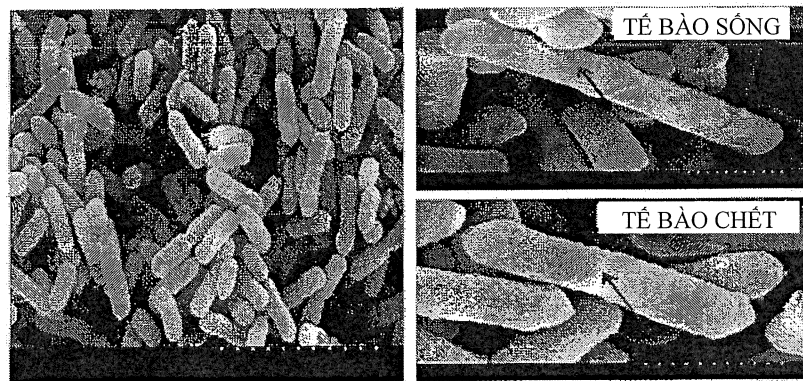


Fig. 2

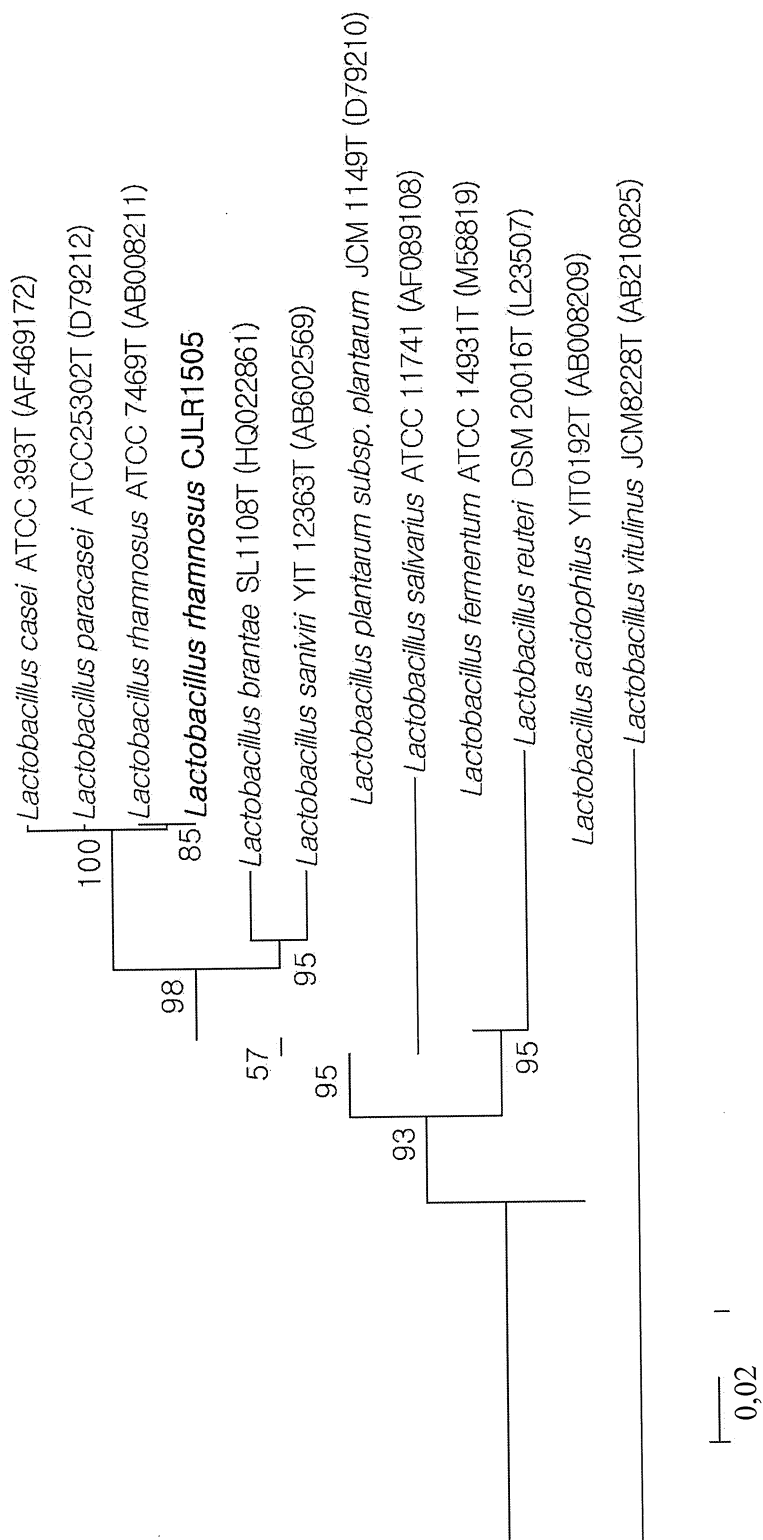


Fig. 3

