



(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)



1-0040784

(51)⁷ A61K 9/50

(13) B

(21) 1-2017-05263

(22) 02/06/2016

(86) PCT/NO2016/050113 02/06/2016

(87) WO 2016/195509 A1 08/12/2016

(30) 20150715 03/06/2015 NO; 1509608.4 03/06/2015 GB

(45) 26/08/2024 437

(43) 25/10/2018 367A

(73) EWOS INNOVATION AS (NO)

4335 Dirdal, Norway

(72) Simon WADSWORTH (NO); Goran KLARIC (NO); Suwan Nalin JAYASINGH (GB).

(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) THỨC ĂN CHỨC NĂNG CHỨA VIÊN THỨC ĂN CHO CÁ VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỨC ĂN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thức ăn chức năng chứa viên thức ăn cho cá và phương pháp sản xuất thức ăn chức năng này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến hệ phân phối qua đường miệng chứa etylendiamoni alginat là chất mang để phân phối được chất đại phân tử. Hệ phân phối qua đường miệng theo sáng chế đặc biệt thích hợp để sử dụng kết hợp với thực phẩm chức năng ở cá.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thức ăn chức năng chứa viên thức ăn cho cá, phương pháp sản xuất thức ăn chức năng này, hệ phân phối qua đường miệng bao gồm etylendiamoni alginat. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất các hạt etylendiamoni alginat và các phương pháp sản xuất thực phẩm chức năng ở dạng viên chứa ít nhất một chất có hoạt tính sinh học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Có nhu cầu cao về hệ phân phối qua đường miệng chứa dược chất hoặc thuốc có hoạt tính sinh học, các hợp chất và các chế phẩm cho các mục đích phòng và điều trị bệnh.

Việc sử dụng tối ưu các chất có hoạt tính sinh học này là quan trọng đối với việc hấp thu tiếp theo của chúng và hiệu lực của chúng trong sinh vật. Do đó cách thức mà các chất có hoạt tính sinh học này được sử dụng là rất quan trọng. Phân phối thuốc qua đường miệng là phương pháp nuốt dược chất với mục đích giải phóng nó vào đường tiêu hóa của người và động vật.

Trong nhiều năm gần đây, việc sử dụng các thành phần chức năng trong công nghiệp nuôi trồng thủy sản gia tăng nhanh và hiện nay nhiều loại thực phẩm chức năng đã sẵn có rộng rãi để sử dụng trong ngành nuôi cá. Liên quan đến điều này, có một nghiên cứu đang được thực hiện để phát triển hệ phân phối qua đường miệng để phân phối các chất có hoạt tính sinh học nhạy cảm cho cá. Phương pháp thuận tiện nhất và ít gây căng thẳng nhất để sử dụng các thuốc và các dược chất khác cho cá nuôi là qua đường thức ăn.

Khi sử dụng qua đường miệng, có một khó khăn là khả năng bất hoạt hoặc phá vỡ hoạt chất trong trong dạ dày trước khi chúng có thể được hấp thu ở ruột. Nhiều chất có hoạt tính sinh học nhạy cảm với nhiệt và có xu hướng thoái biến do axit hoặc do phân giải protein trong đường tiêu hóa. Đặc biệt là với các protein. Một vấn đề khác là phải phân phối đến đúng cơ quan đích để hấp thu cũng như hấp thu một cách hiệu quả.

Do đó hiểu biết về sinh lý học tiêu hóa của cá là rất quan trọng để phân phối các chất có hoạt tính sinh học như protein điều trị qua đường miệng. Cá hồi Đại Tây Dương (*Salmo salar*), là loài có giá trị kinh tế đối với công nghiệp nuôi trồng thủy sản, là cá có dạ dày với đường tiêu hóa khá ngắn. Đường tiêu hóa của cá hồi là cá ăn thịt có thể được chia nhỏ thêm thành ruột trước (miệng, thực quản và dạ dày), ruột giữa (túi mù hạ vị hoặc ruột gần và ruột giữa) và đoạn cuối ruột phôi hoặc ruột xa kết thúc ở trực tràng. Tiêu hóa là quá trình chuyển hóa bao gồm hòa tan và thoái biến các chất dinh dưỡng thành các thành phần nhỏ hơn mà được hấp thu dễ dàng hơn vào dòng máu.

Các thành phần tiêu hóa chính được tiết vào dạ dày là pepsinogen và axit hydrocloric (HCl) và sự tiết cả hai chất này đều được kích thích bởi việc đưa thức ăn vào. Đã được chỉ ra là độ pH dạ dày trung bình là 2,7 tăng đến 4,9 khi cá hồi cầu vồng (*Oncorhynchus mykiss*) chuyển từ trạng thái đói sang trạng thái được cho ăn (Bucking, C. và Wood, C. M. 2009. The effect of postprandial changes in pH along the gastrointestinal tract on the distribution of ions between the solid and fluid phases of the chyme in rainbow trout. *Aquaculture Nutrition*, Tập 15, phát hành lần 3, trang 282-296). Độ pH tăng được duy trì trong tám giờ sau khi ăn.

Hầu hết các protein đều bị thoái biến bởi tác dụng của HCl và pepsin trong dạ dày. Sau khi đi vào dạ dày, hỗn hợp của các chất dinh dưỡng hòa tan và nguyên liệu thức ăn đã tiêu hóa một phần đi vào túi mù hạ vị. Túi mù hạ vị này tạo ra một khoang, trong đó các enzym phân giải protein khác như trypsin, chymotrypsin và aminopeptidaza đang thực hiện sự thủy phân peptit. Đã biết rõ là hầu hết các protein được hấp thu vào dòng máu dưới dạng các axit amin tự do và các peptit ngắn trong vùng môn vị. Khi dịch nuôi axit đi tới ruột gần, nó được trung hòa nhanh bởi bicarbonat (HCO_3^-) trong mật và dịch tụy. Bucking và Wood (2009) đã quan sát thấy độ pH trung bình là 8,2 trên toàn bộ đoạn ruột ở cá bị bỏ đói. Sau khi cho ăn, độ pH giảm xuống 7,5 ở ruột gần và ruột giữa, trong khi đó nó vẫn gần như không thay đổi ở đoạn xa. Tuy nhiên, độ pH trong ruột lại tăng sau khi cho ăn, đạt đến giá trị cao nhất của nó sau tám giờ. Ở thời điểm đó, độ pH có thể là cao hơn 8,5 dọc theo toàn bộ đường ruột với xu hướng tăng về phía phân xa.

Mặc dù môi trường phân giải protein khắc nghiệt trong ruột trước và ruột giữa, một số protein vượt qua được tới ruột xa, tại đó chúng có thể được hấp thu. Ruột xa được xem là vị trí hấp thu quan trọng nhất của các peptit lớn bao gồm các kháng nguyên được sử dụng trong các vacxin đường uống. Do đó các chất đại phân tử như protein cần được sử dụng cho cá, thực sự đi đến được phần xa của ruột là rất quan trọng cho sự hấp thu hiệu quả của chúng. Để bảo vệ các được chất đại phân tử có hoạt tính sinh học không bị phá vỡ trong dạ dày, chúng thường được liên hợp với hệ phân phối qua đường miệng, ví dụ bằng cách bao nang trong polyme thích hợp.

Một khó khăn khác trong việc phân phối các chất là ở chỗ thời gian của nguyên liệu thức ăn đi qua toàn bộ hệ tiêu hóa của cá ăn thịt có thể là rất ngắn. Thời gian đi qua này phụ thuộc vào khẩu phần ăn, thành phần và cấu trúc thức ăn, và có thể là từ 5 đến 35 giờ sau khi ăn thức ăn.

Do đó lựa chọn đúng chất phân phối thích hợp là rất quan trọng. Đặc điểm quan trọng cho sự phù hợp của hệ phân phối qua đường miệng là độ tan thích hợp của chất phân phối để giải phóng thành phần có hoạt tính sinh học ở đúng thời điểm và vị trí trong hệ đường ruột.

Các alginat liên kết chéo là các polyme thường được sử dụng trong các hệ phân phối qua đường miệng. Các đặc điểm liên kết chéo của alginat tạo cơ sở cho nhiều kỹ thuật bao nang khác nhau bao gồm cả quy trình ép và nhũ tương. Các alginat có thể được liên kết chéo bằng cách sử dụng nhiều chất liên kết chéo đã biết. Chất liên kết chéo được sử dụng phổ biến nhất là Ca^{2+} .

Nhiều sản phẩm khác nhau (chất dinh dưỡng, dược chất, và vacxin) có thể được đưa vào chất nền alginat để tránh bị phá hủy do độ pH thấp và các enzym phân giải protein. Các alginat là các polysacarit được phân lập từ tảo nâu như *Ascophyllum nodosum*, *Durvillaea sp.*, *Ecklonia sp.*, *Laminaria sp.*, *Lessonia sp.*, *Sargassum sp.* và *Macrocystis pyrifera* được tìm thấy trong nước ven biển trên toàn cầu. Tảo biển bao gồm hai dạng axit uronic: mannuronic (M) và guluronic (G). Hai khối chuỗi polyme liền kề có thể được liên kết chéo với các cation đa hóa trị (ví dụ, Ca^{2+} hoặc Ba^{2+}) bằng cách tương tác với các nhóm carboxylic trong axit uronic, mà dẫn đến việc tạo thành mạng gel. Alginat liên kết chéo tạo thành có sự tương thích sinh học rất tốt trong các

mô chủ và có thể thoái biến sinh học theo cách kiểm soát được. Các chất có hoạt tính sinh học để phân phối qua đường miệng thường được bao nang hoặc giữ trong alginat trong quá trình liên kết chéo, cụ thể là bằng cách bao nang vào các hạt alginat nhỏ. Các hạt alginat liên kết chéo thường bền ở độ pH thấp và hòa tan ở độ pH cao hơn. Do đó, sự giải phóng nhanh hơn từ các hạt alginat xảy ra trong ruột (các điều kiện kiềm), sau khi các hạt này đi qua môi trường phân giải protein và axit của dạ dày. Các đặc tính này làm cho alginat trở thành hợp chất hiệu quả để sử dụng làm hệ phân phối qua đường miệng ở người và động vật có vú.

Hầu hết các nghiên cứu được thực hiện đến nay đều tập trung vào sự hòa tan chất nền alginat trong các điều kiện thích hợp đối với hệ tiêu hóa của người như độ pH=1,1-2,0 và độ pH=6,8-7,4 ở nhiệt độ là 37°C. Như đã đề cập trên đây, có thể thấy là độ pH > 2,7 là phổ biến nhất trong dạ dày của cá hồi. Đồng thời độ pH > 7,5 là chiếm ưu thế trong các đoạn ruột, mặc dù độ pH > 8,5 cũng không phải là điều kiện bất thường. Ngoài ra, tốc độ đi qua ruột và các điều kiện nhiệt độ trong các quá trình tiêu hóa là rất khác nhau ở các động vật biến nhiệt so với sinh vật hằng nhiệt như động vật có vú. Ví dụ, nhiệt độ mùa đông có thể thấp hơn 4°C trong khi nhiệt độ mùa hè có thể có giá trị cao nhất trên 18°C trong nước biển Na-uy, mà tại đó cá hồi Đại Tây Dương được nuôi.

Các chất nền alginat thường được biết là không thích hợp hoặc hiệu quả để phân phối các chất có hoạt tính sinh học vào đường tiêu hóa dưới của động vật có ruột ngắn. Nhược điểm chính của hệ phân phối qua đường miệng chứa alginat thường được biết là khả năng hòa tan không hoàn toàn hoặc không đủ trong hệ ruột có độ dài giới hạn. Điều này đặc biệt đúng với cá ăn thịt và ăn tạp thích nguyên liệu động vật mà thường có đường ruột ngắn như cá hồi, cá vược, cá tráp, cá tuyết, cá bơn lưỡi ngựa, cá bơn, cá bơn flounder, cá ba sa và cá mú. Do ruột chúng ngắn, thời gian lưu của nguyên liệu thức ăn cũng như thời gian cửa sổ để giải phóng và hấp thu các thành phần hoạt chất bị giới hạn.

Do đó, vấn đề kỹ thuật mục tiêu của sáng chế là đề xuất chất mang để phân phối qua đường miệng chất có hoạt tính sinh học, cụ thể là các dược chất đại phân tử và các protein điều trị vào ruột của động vật.

Cụ thể là, mục đích của sáng chế là đề xuất hệ phân phối qua đường miệng hòa tan nhanh và không phụ thuộc nhiệt độ, cụ thể là cho các loài sống trong nước lạnh.

Cụ thể hơn, mục đích của sáng chế là đề xuất hệ phân phối qua đường miệng để sử dụng ở cá, cụ thể là cá có dạ dày và đường ruột ngắn.

Ngoài ra, mục đích của sáng chế là đề xuất hệ phân phối qua đường miệng để sử dụng ở cá ăn thịt hoặc ăn tạp có dạ dày, và cụ thể là cho cá nước lạnh như cá hồi.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất hệ phân phối qua đường miệng bảo vệ chất có hoạt tính sinh học không bị thoái biến do axit và do phân giải protein trong dạ dày và sau đó giải phóng chúng trong vùng ruột ở độ pH kiềm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến hệ phân phối qua đường miệng chứa etylendiamoni alginat và ít nhất một chất có hoạt tính sinh học để sử dụng trong việc phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh. Hệ phân phối qua đường miệng này nhờ các đặc điểm hòa tan tốt hơn của nó là đặc biệt thích hợp để sử dụng ở động vật, đặc biệt là ở động vật có đường ruột ngắn như cá ăn thịt và ăn tạp ưa thích nguyên liệu động vật. Cụ thể là, hệ phân phối qua đường miệng này rất thích hợp để phân phối qua miệng các chất có hoạt tính sinh học cho động vật biến nhiệt mà có thể tiêu hóa ở nhiệt độ thấp.

Tốt hơn, nếu chất có hoạt tính sinh học này được bao nang hoặc được giữ trong etylendiamoni alginat.

Tốt hơn nữa, nếu chất có hoạt tính sinh học cần được phân phối được chọn từ nhóm bao gồm protein, peptit, vacxin, kháng thể, kháng nguyên, hormon, enzym, chất kích thích miễn dịch, thuốc, lợi khuẩn, chất xơ kích thích sự phát triển của lợi khuẩn trong ruột (prebiotic), polynucleotit, nucleotit, và axit amin.

Trong một phương án được ưu tiên hơn, hệ phân phối qua đường miệng được sử dụng cho động vật biến nhiệt có đường tiêu hóa bao gồm ruột và dạ dày, tốt hơn, nếu ở loài nước lạnh, tốt hơn nữa nếu là cá.

Trong một phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến hệ phân phối qua đường miệng để sử dụng ở cá được chọn từ nhóm bao gồm loài ăn tạp và ăn thịt, tốt hơn, nếu từ loài cá nước lạnh.

Cụ thể là, hệ phân phối qua đường miệng này thích hợp để sử dụng ở cá, tốt hơn, nếu là cá có dạ dày, tốt hơn nữa là cho cá có đường ruột ngắn, tốt nhất là ở loài được chọn từ nhóm bao gồm cá hồi, cá vược, cá tráp, cá tuyết, cá bơn lưỡi ngựa, cá bơn sao, cá bơn flounder, cá mú, cá ngừ, cá rô phi, và cá tra.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến etylendiamoni alginat để sử dụng làm hệ phân phối qua đường miệng để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh. Việc sử dụng được ưu tiên hơn là ở cá, tốt hơn, nếu ở loài ăn tạp hoặc ăn thịt. Thậm chí tốt hơn nữa, là sử dụng ở cá nước lạnh.

Tốt hơn, nếu chất nền alginat là ở dạng hạt, tốt hơn, là hạt tròn, và tốt nhất là ở dạng các hạt hình cầu. Tốt hơn, nếu các hạt tròn etylendiamoni alginat có cỡ hạt trung bình nằm trong khoảng từ 1 μm đến 10 mm, tốt hơn nữa, nếu nằm trong khoảng từ 300 μm đến 2000 μm . Trong một phương án được ưu tiên khác theo sáng chế, cỡ hạt trung bình này không lớn hơn 300 μm , tốt hơn, nếu không lớn hơn 200 μm , tốt hơn nữa, nếu không lớn hơn 100 μm và tốt nhất là không lớn hơn 25 μm . Đây là ưu điểm khi kết hợp với các viên thức ăn trong máy bao chân không. Mặc dù cỡ hạt trung bình được ưu tiên hơn để bổ sung vào trước khi ép là nhỏ hơn 300 μm , cỡ hạt nằm trong khoảng từ 300 μm đến 2000 μm cũng chấp nhận được. Ngoài ra, cỡ hạt trung bình được ưu tiên hơn của hạt tròn alginat để sử dụng bằng đường miệng độc lập là lớn hơn 100 μm và sẽ phụ thuộc vào kích thước của cả sinh vật và liều đích.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến thực phẩm chức năng chứa ít nhất một chất có hoạt tính sinh học được bao nang hoặc giữ trong etylendiamoni alginat. Việc kết hợp chất có hoạt tính sinh học đã được bao nang trong alginat vào các viên thức ăn là thao tác cần thiết khi nó trở thành thức ăn cho động vật, đặc biệt là thức ăn cho cá. Việc kết hợp hữu hiệu vào viên thức ăn làm giảm sự mất thành phần có hoạt tính sinh học do xử lý thức ăn và đảm bảo cung cấp ổn định các liều đã được kê đơn.

Tốt hơn, nếu alginat chứa chất có hoạt tính sinh học trong thực phẩm chức năng là ở dạng các hạt tròn.

Tốt hơn, nếu etylendiamoni alginat được tạo hình thành các hạt, tốt hơn, nếu là các hạt tròn và tốt nhất là ở dạng các hạt hình cầu. Trong một phương án được ưu tiên hơn theo sáng chế cỡ hạt trung bình của các hạt tròn alginat không lớn hơn 2000 μm , tốt hơn, nếu không lớn hơn 1000 μm , tốt hơn nữa, nếu không lớn hơn 300 μm , và tốt nhất là không lớn hơn 25 μm .

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến thực phẩm chức năng chứa ít nhất một chất có hoạt tính sinh học được bao nang trong etylendiamoni alginat để sử dụng trong việc phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh. Sử dụng ưu tiên hơn của thực phẩm chức năng này là ở cá.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất các hạt etylendiamoni alginat chứa ít nhất một chất có hoạt tính sinh học bằng quá trình liên kết chéo alginat với etylendiamoni nhờ đó hình dạng alginat mong muốn được tạo ra bằng (i) phương pháp ép trước khi xử lý trong dung dịch etylendiamoni hoặc (ii) phương pháp nhũ tương. Trong quy trình này, hình dạng và kích thước mong muốn của alginat đều được tạo ra bằng phương pháp ép trước khi xử lý trong dung dịch etylendiamoni hoặc bằng phương pháp nhũ tương kết hợp với etylendiamoni này.

Phương pháp ép (i) có thể được chọn từ nhóm bao gồm kỹ thuật phun được hỗ trợ bằng khí động lực học, kỹ thuật phá vỡ phun tầng điện từ, kỹ thuật in phun mực, kỹ thuật in 3D, kỹ thuật phun điện, và sự nhỏ giọt do dòng khí đồng trục và trong đó phương pháp nhũ tương (ii) có thể là phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp tự giọt, phương pháp tạo gel trong, và phương pháp tạo gel ngoài.

Quy trình này có thể bao gồm các bước sau đây:

- (i) bào chế chế phẩm bao nang bằng cách hòa tan alginat trong dung dịch chứa ít nhất một chất có hoạt tính sinh học cần được phân phối,
- (ii) tạo ra tia chứa các giọt alginat với sự hỗ trợ của áp suất không khí bằng cách ép dung dịch trong bước (i) qua vòi có kích thước thích hợp được đặt trong buồng tăng áp được lắp với cửa ra có kích thước phù hợp với vòi này,
- (iii) tập trung tia chứa các giọt nhỏ trong bước (ii) lên dung dịch liên kết chéo chứa etylendiamin dihydroclorua, sau đó

(iv) lọc ra các hạt tròn alginat thu được.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất thực phẩm chức năng chứa ít nhất một chất có hoạt tính sinh học, trong đó quy trình này bao gồm các bước sau đây:

(i) điều chế huyền phù dầu chứa các hạt tròn etylendiamoni alginat mà chất có hoạt tính sinh học đã được giữ hoặc bao nang trong đó,

(ii) trộn huyền phù của bước (i) với viên thức ăn trong máy bao chân không,

(iii) rút không khí từ máy bao tạo ra môi trường có áp suất giảm, và

(iv) từ từ trả lại áp suất khí quyển bằng cách để không khí đi vào lại máy bao mà đẩy huyền phù của bước (i) vào các lỗ rỗng của viên thức ăn.

Bên cạnh việc đưa (các) chất có hoạt tính sinh học đã được bao nang vào thức ăn sau khi ép, việc đưa (các) chất có hoạt tính sinh học đã được bao nang vào trước khi ép là khả thi.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất thực phẩm chức năng chứa ít nhất một chất có hoạt tính sinh học trong đó quy trình này bao gồm các bước sau đây:

(i) điều chế hỗn hợp khô bằng cách trộn các hạt tròn etylendiamoni alginat chứa ít nhất một chất có hoạt tính sinh học với bột thức ăn chứa thành phần thức ăn không chứa dầu khác,

(ii) bào chế chất ép bằng cách ép hỗn hợp khô trong bước (i) bằng cách sử dụng máy ép hoặc bằng cách sử dụng máy ép viên,

(iii) tạo ra các viên nền bằng cách sấy khô chất ép trong bước (ii) trong buồng sấy, và

(iv) tạo ra thức ăn thành phẩm bằng cách bao dầu các viên nền của bước (iii) trong quy trình bao ngâm chân không.

Các phương án được ưu tiên hơn cũng được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Các phương án của sáng chế sẽ được mô tả, bằng các ví dụ kèm theo các sơ đồ sau đây, trong đó:

Fig. 1 thể hiện các hình ảnh qua kính hiển vi soi nổi (SMZ) (Leica MZ10 F) của a) các hạt tròn Ca-alginat được nhồi bằng dextran xanh (BD-Ca-alg; $d_{\text{trung bình}} = 3,0$ mm), b) các hạt tròn EDA-alginat được nhồi bằng dextran xanh (BD-EDA-alg; $d_{\text{trung bình}} = 3,7$ mm);

Fig. 2 thể hiện profin hòa tan dưới dạng đường cong của tỉ lệ phần trăm giải phóng dextran xanh (BD) tích lũy trung bình từ các hạt tròn alginat theo thời gian. Các thử nghiệm hòa tan được thực hiện trong đệm kali hydro phthalat /HCl (độ pH=3,0) trong 15 phút sau đó là đệm phosphat (độ pH=8,0) trong 50 phút tiếp theo. Sự giải phóng là dưới LoQ ($3,9 \times 10^{-3}$ mg ml⁻¹) trong môi trường axit do đó fig này chỉ mô tả sự giải phóng trong môi trường hòa tan kiềm. Các thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn (SD) dựa trên năm mẫu ở mỗi điểm. BD-EDA-alg ký hiệu các hạt tròn etylendiamoni alginat được nhồi bằng BD; BD-Ca-alg có nghĩa là các hạt tròn canxi alginat được nhồi bằng BD;

Fig. 3 thể hiện nồng độ HRP trong bốn khoang tiêu hóa (dạ dày, túi mù hạ vị, ruột giữa và ruột xa) của ba nhóm cá hồi Đại Tây dương (Ca-alginat, EDA-alginat và đối chứng). Thanh sai số thể hiện các khoảng tin cậy 95%. Nhóm Ca-alginat nhận HRP được bao nang trong canxi alginat (HRP-Ca-alg). Nhóm EDA-alginat nhận HRP được bao nang trong etylendiamoni alginat (HRP-EDA-alg). Nhóm đối chứng không nhận được bất kỳ HRP nào.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất hệ phân phối qua đường miệng mới để phân phối các chất có hoạt tính sinh học đến ruột. Hệ phân phối qua đường miệng này là đặc biệt thích hợp để sử dụng trong các sinh vật có đường ruột ngắn như cá ăn thịt. Cụ thể là, hệ phân phối qua đường miệng này là thích hợp để phân phối qua miệng các chất có hoạt tính sinh học vào động vật biến nhiệt mà có thể tiêu hóa ở nhiệt độ thấp.

Theo sáng chế, natri alginat được liên kết chéo với etylendiamin dihydroclorua để tạo ra etylendiamoni alginat. Ưu điểm của phương pháp này là không bao gồm chất hóa học khác. Ngoài ra, phương pháp đã được mô tả để liên kết chéo alginat với etylendiamoni hydroclorua là nhanh hơn, dễ dàng hơn, ít tốn kém hơn, và không bao gồm các chất hóa học nguy hiểm so với các phương pháp đã biết khác.

Theo sáng chế, etylendiamoni alginat được sử dụng làm hệ phân phối qua đường miệng cho các chất có hoạt tính sinh học, cụ thể là ở cá. Các chất này được bao nang hoặc giữ trong chất nền etylendiamoni alginat trong quá trình liên kết chéo alginat với các dication etylendiamoni. Tốt hơn, nếu các vi hạt tròn alginat nhỏ được tạo ra trong quá trình liên kết chéo bao gồm hai bước chính: 1) tạo ra các giọt alginat bằng thiết bị như đầu phun hoặc đầu xịt được lắp với vòi như được tìm thấy trong kỹ thuật phun được hỗ trợ bằng khí động lực học hoặc bằng các phương pháp khác đã biết đối với người có kiến thức trung bình để tạo ra các giọt chất lỏng (ví dụ, kỹ thuật phun được hỗ trợ bằng khí động lực học, kỹ thuật phá vỡ phun tầng điện từ, kỹ thuật in phun mực, kỹ thuật in 3D, kỹ thuật phun điện, kỹ thuật nhỏ giọt nhờ dòng khí đồng trục v.v...); 2) thu các giọt alginat vào dung dịch liên kết chéo chứa etylendiamoni. Ngoài ra, phương pháp nhũ tương (ví dụ, phương pháp tụ giọt, phương pháp tạo gel trong và phương pháp tạo gel ngoài, v.v...) có thể được sử dụng kết hợp với etylendiamoni.

Chất nền etylendiamoni alginat thường có dạng hạt hình học bất kỳ đối với các hạt, ví dụ, hình sợi, hình cầu, hình xuyên, hình elip tròn xoay và còn bao gồm các sợi và bông. Tốt hơn, nếu các hạt này được tạo hình cân đối, mặc dù chất nền alginat này cũng có thể ở dạng hạt được tạo hình không cân đối. Trong một phương án được ưu tiên hơn chất nền này là ở dạng các hạt tròn, tốt hơn nữa nếu ở dạng các hạt hình cầu.

Các hạt tròn alginat tạo thành chứa (các) chất có hoạt tính sinh học có thể được sử dụng bằng đường tiêu hóa trong thức ăn hoặc ngoài thức ăn (độc lập, đối với thức ăn) cho sinh vật đích. Cỡ hạt trung bình được ưu tiên của hạt tròn alginat nằm trong khoảng từ 1 μm đến 10 mm. Để kết hợp với các viên thức ăn trong máy bao chân không, cỡ hạt trung bình của các hạt tròn alginat thường có thể nằm trong khoảng từ 300 μm đến 2000 μm . Tuy nhiên, cỡ hạt trung bình được ưu tiên hơn để bổ sung vào trước khi ép là nhỏ hơn 300 μm . Cỡ hạt được ưu tiên hơn là nhỏ hơn 300 μm , tốt hơn nữa nếu

nhỏ hơn 100 μm và tốt nhất nếu nhỏ hơn 25 μm . Cỡ hạt trung bình được ưu tiên hơn của hạt tròn alginat để sử dụng độc lập (không kết hợp với thức ăn) là lớn hơn 100 μm . Để sử dụng như vậy, cỡ hạt của hạt tròn sẽ phụ thuộc vào cả kích thước động vật và liều đích và có thể được điều chỉnh tương ứng. Tuy nhiên, đường sử dụng ưu tiên hơn cho cá là đường miệng với các hạt alginat trong thức ăn.

Các hạt tròn alginat nhỏ chứa (các) chất có hoạt tính sinh học được kết hợp ưu tiên vào các viên thức ăn bằng quy trình thích hợp như bao ngậm trong chân không, trước khi chúng được sử dụng bằng đường miệng cho các sinh vật đích, như cá. Ngoài ra, các hạt tròn có thể được trộn với các thành phần thức ăn khác trước khi tạo viên. Các thành phần này có thể, ví dụ, là các thành phần thức ăn thông thường đã được biết đối với người có kiến thức trung bình. Tốt hơn, nếu các hạt tròn alginat chứa một hoặc vài thành phần có hoạt tính sinh học được trộn với bột ban đầu (hỗn hợp khô chứa tất cả các thành phần thức ăn ngoại trừ dầu) trước khi ép hoặc cách thức bất kỳ khác để tạo ra các viên thức ăn.

Mô tả chi tiết về quy trình được ưu tiên theo sáng chế để liên kết chéo alginat với etylendiamin dihydroclorua cũng như quy trình được ưu tiên để sản xuất các hạt tròn etylendiamoni alginat nhỏ được nhồi bằng một hoặc nhiều chất có hoạt tính sinh học được cung cấp trong phần thử nghiệm dưới đây. Ngoài ra, quy trình được ưu tiên theo sáng chế để kết hợp các hạt tròn alginat vào viên thức ăn được cung cấp trong phần thử nghiệm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phần thử nghiệm:

Tác dụng của etylendiamoni alginat (EDA-alginat) được kiểm tra và được chứng minh trong hai thiết bị thử nghiệm khác nhau trên *in vitro* và *in vivo*. Các kết quả thu được được so sánh với hệ phân phối qua đường miệng thông thường dựa trên alginat được liên kết chéo với Ca^{2+} (Ca-alginat).

Như đã mô tả trên đây, các điều kiện tiêu hóa ở cá, là biến nhiệt và đặc biệt là ở cá ăn thịt có ruột ngắn, khác với các điều kiện tiêu hóa của nhiều sinh vật khác, đặc biệt là với động vật có vú và người. Do đó, trong sáng chế, hệ phân phối qua đường miệng theo sáng chế được thử nghiệm, cả trong thử nghiệm hòa tan chuẩn đã biết cũng như trong thử nghiệm, mà đã được điều chỉnh cho thích hợp với các điều kiện tiêu hóa điển

hình cho cá hồi biến nhiệt. Thứ nhất, sự giải phóng dextran xanh từ Ca-alginat và EDA-alginat được thử nghiệm *in vitro* trong thử nghiệm hòa tan chuẩn (độ pH=1,2 và độ pH=6,8 ở 37°C). Thứ hai, sự giải phóng từ các alginat tương tự được thử nghiệm trong môi trường hòa tan kiềm có độ pH= 8,0 và độ pH=8,6 ở 18°C. Dựa vào các kết quả từ các thử nghiệm trước, chiến lược thử nghiệm hòa tan mới (độ pH=3,0 sau đó độ pH=8,6 ở 4°C hoặc ở 18°C) được phát triển. Cuối cùng, sự giải phóng peroxidaza củ cải ngựa (HRP) từ cả Ca-alginat và EDA-alginat được đánh giá *in vivo* trong thử nghiệm cho ăn để chứng minh sự phù hợp của etylenđiamoni alginat như là hệ phân phối qua đường miệng cho các đại phân tử ở cá.

Các nguyên liệu được sử dụng trong các thử nghiệm

Natri alginat (Protanal LF 20/40) thu được từ FMC BioPolymer AS (Na Uy). Peroxidaza củ cải ngựa (HRP, P/N 31491, Thermo Fisher Scientific) thu được từ Perbio Science UK Ltd. Nước khử ion (nước DI, thuốc thử phân tích) được mua từ Fische Chemical Ltd. (UK). Các thuốc thử sau đây được mua từ VWR Ltd (UK): canxi clorua dihydrat (AnalaR NORMAPUR®, thuốc thử phân tích ACS), natri bicacbonat (AnalaR NORMAPUR®, thuốc thử phân tích ACS), natri hydroxit ($\geq 98\%$, bông, Alfa Aesar), kali hydro phtalat ($\geq 99\%$, Alfa Aesar) và axit hydrocloric (37%, AnalaR NORMAPUR®, thuốc thử phân tích). Các thuốc thử sau đây được mua từ Sigma-Aldrich Ltd. (UK): etylenđiamin dihydroclorua (98%, Aldrich), glyxin ($\geq 99\%$, ReagentPlus®), dinatri phosphat dihydrat ($\geq 99\%$, thuốc thử phân tích), mononatri phosphat dihydrat ($\geq 98\%$, thuốc thử phân tích), dextran xanh, BD (khối lượng phân tử = 2.000.000; [xanh phản ứng 2] = từ 0,10 đến 0,12 mmol g⁻¹ dextran) và hệ cơ chất lỏng 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) (sử dụng được ngay). Viên nền EWOS Opal 200 (BP, 5,8% chất béo) được sản xuất tại Trung tâm Kỹ thuật của EWOS Innovation AS ở Dirdal (Na Uy). Dầu cá (EWOS ID: 20180) thu được từ Egersund Sildoljefabrikk AS (Egersund, Na Uy).

Các dung dịch gốc:

Chế phẩm bao nang dextran xanh (BD-EncForm) được bào chế bằng cách hòa tan natri alginat (2,0% khối lượng/thể tích) trong dung dịch BD (50,0 mg ml⁻¹) ở nhiệt độ xung quanh.

Đệm có độ pH=1,2: đệm natri clorua/axit hydrocloric (NaCl/HCl , độ pH=1,2) được điều chế bằng cách trộn dung dịch NaCl (250 ml, 23,38 g l^{-1} , NaCl 0,4M) với dung dịch HCl 0,4M (425 ml). Trước khi làm tăng thể tích đến 1000 ml bằng nước DI, độ pH của dung dịch đệm được điều chỉnh đến 1,2.

Đệm có độ pH=3,0: Dung dịch kali hydro phtalat (500 ml, 81,69 g l^{-1} , KPH 0,4M) được kết hợp với dung dịch HCl (223 ml, HCl 0,4M) để tạo ra dung dịch gốc chứa đệm KPH/ HCl (độ pH=3,0). Dung dịch đệm này được bổ sung thêm nước DI đến tổng thể tích là 1000 ml.

Đệm có độ pH=6,8: Dung dịch mononatri phosphat dihydrat (255 ml, 62,40 g l^{-1} , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4M) được trộn với dung dịch dinatri phosphat dihydrat (245 ml, 71,20 g l^{-1} , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4M) để tạo ra đệm phosphat (độ pH=6,8). Đệm tạo thành được điều chỉnh đến độ pH=6,8 trước khi tăng thể tích đến 1000 ml bằng nước DI.

Đệm có độ pH=8,0: Đệm phosphat (độ pH=8,0) được tạo ra bằng cách kết hợp dung dịch mononatri phosphat dihydrat (26,5 ml, 62,40 g l^{-1} , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,4M) với dung dịch dinatri phosphat dihydrat (473,5 ml, 71,20 g l^{-1} , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4M). Dung dịch đệm tạo thành được điều chỉnh đến độ pH=8,0 và sau đó được pha loãng với nước DI đến thể tích cuối cùng là 1000 ml.

Đệm có độ pH=8,6: Dung dịch glyxin (250 ml, 30,03 g l^{-1} , Gly 0,4M) được trộn với dung dịch natri hydroxit (20 ml, 16 g l^{-1} , NaOH 0,4M) để tạo ra đệm Gly/ NaOH . Sau khi điều chỉnh độ pH đến 8,6, dung dịch đệm được tạo ra được pha loãng đến thể tích 1000 ml bằng nước DI.

Natri bicacbonat (150 g l^{-1} , NaHCO_3) được hòa tan trong nước DI để tạo ra dung dịch NaHCO_3 bão hòa. Các tinh thể NaHCO_3 không tan bất kỳ được lọc ra trước khi sử dụng.

Chế phẩm bao nang peroxidaza củ cải ngựa (HRP) (HRP-EncForm) được bào chế bằng cách hòa tan natri alginat (2,0% khối lượng/khối lượng) trong dung dịch HRP (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nước DI) ở 4°C.

Dung dịch gốc HRP (5 mg ml⁻¹) được điều chế bằng cách hòa tan bột HRP (10,0 mg) trong nước DI (2,0 ml). Các phần phân ước của dung dịch HRP này (20,0 µl) được bảo quản ở -20°C trước khi thiết lập đường cong chuẩn trong thử nghiệm enzym này.

Các dung dịch liên kết chéo (dung dịch CaCl₂ và dung dịch EDA·2HCl) được điều chế bằng cách hòa tan riêng canxi clorua dihydrat (36,8 g l⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0,25M) và etylendiamin dihydroclorua (33,3 g l⁻¹, EDA·2HCl 0,25M) trong nước DI.

Thử nghiệm hòa tan in vitro của các vi hạt alginat

Dextran xanh (BD) được chọn làm hợp chất mẫu cho sự giải phóng được kích thích của các thành phần dược chất (API) từ chất nền alginat.

Bào chế hạt tròn alginat được nhồi bằng dextran xanh

BD-EncForm ([BD] = 50,0 mg ml⁻¹) được ép từ xylanh nhựa 60 ml (BD Plastipak™) qua kim (đường kính trong = 2,0 mm) vào dung dịch liên kết chéo. Tốc độ dòng (50,00 ml giờ⁻¹) được duy trì hằng định bằng bơm xylanh (Harvard PHD4400, Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge, Anh) làm việc theo chế độ thể tích (thể tích đích = 1,50 ml). Hệ thống này được sử dụng để ép 80 mẻ BD-EncForm mỗi mẻ 1,50 ml. Các dung dịch liên kết chéo, dung dịch CaCl₂ (40 × 10,0 ml) và dung dịch EDA·2HCl (40 × 10,0 ml) được sử dụng lần lượt để tạo ra các hạt tròn BD-Ca-alg (40 mẻ) và BD-EDA-alg (40 mẻ). Mỗi mẻ giống nhau ở chỗ các hạt tròn alginat được tách ra từ dung dịch liên kết chéo 10 phút sau khi hạt tròn cuối cùng được tạo ra. Sau đó, các hạt tròn alginat thu được được nhồi bằng BD được rửa bằng nước DI (3 × 5 ml). Các hạt tròn BD-Ca-alg (10 mẻ) và BD-EDA-alg (10 mẻ) được sử dụng để xác định hiệu suất bao nang trong khi các mẻ còn lại được sử dụng trong thử nghiệm hòa tan. Sự phân bố cỡ hạt và hình dạng hạt được xác định bằng kính hiển vi soi nổi (Leica MZ10 F, Leica Microsystems, Wetzlar, Đức).

Hiệu suất bao nang của dextran xanh

Hạt tròn BD-Ca-alg (10 mẻ) và BD-EDA-alg (10 mẻ) được bổ sung vào dung dịch NaHCO₃ bão hòa (20 × 9,0 ml, độ pH = 8,0). Do đó, tất cả các hạt được hòa tan hoàn toàn sau hai giờ trong khi khuấy. Để thể tích của tất cả các mẫu bằng nhau, mức thể tích của các dung dịch tạo thành được điều chỉnh đến 10 ml bằng nước DI. Các dung

dịch mới tạo ra này ($n = 20$) được lọc qua các đầu lọc xylan (0,45 μm , VWR) trước khi phủ lên đĩa polystyren 96 lỗ (Nunc™, Sigma-Aldrich) cho thử nghiệm điểm kết thúc. Độ hấp thụ của BD được đo bằng cách sử dụng máy đọc khay vi thể VERSAmax (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, Mỹ) ở 610 nm và 24°C. Nồng độ BD của các mẫu được xác định bằng cách sử dụng đường cong chuẩn nằm trong khoảng từ 1,0 đến $3,9 \times 10^{-3}$ mg ml⁻¹. Các đường cong chuẩn được tạo ra bằng cách lập đồ thị các nồng độ BD của chín dung dịch pha loãng tuần tự hai lần của dung dịch BD (1,0 mg ml⁻¹) theo độ hấp thụ. Dung dịch BD (1,0 mg ml⁻¹) thu được từ BD-EncForm ([BD] = 50,0 mg ml⁻¹) bằng cách sử dụng dung dịch NaHCO₃ bão hòa làm chất pha loãng.

A. Thử nghiệm hòa tan chuẩn

Máy đo độ hòa tan (Caleva 8ST, Caleva International Ltd, Anh) được lắp ống hòa tan ($V = 1000$ ml) và các giỏ quay bằng thép không gỉ (mắt lưới 40) được sử dụng để đánh giá sự giải phóng BD từ hai loại hạt tròn alginate khác nhau. Hệ thống này tuân theo các quy định chuẩn đối với Thiết bị 1 được đặt ra bởi Dược điển Mỹ (USP) và được mô tả trong Chương Tổng quan <711>.

Môi trường hòa tan (300 ml; đệm NaCl/HCl, độ pH=1,2 hoặc đệm phosphat, độ pH=6,8) được bổ sung vào mỗi ống và sau đó để ôn hòa qua đêm ở 37°C. Thử nghiệm hòa tan bắt đầu trong vòng 2 giờ sau khi tạo ra các hạt tròn alginate theo quy trình được mô tả trên đây. Các hạt tròn alginate (BD-Ca-alg hoặc BD-EDA-alg) được đặt vào giỏ quay (100 vòng/phút) và sau đó được nhấn chìm vào các ống hòa tan. Các thử nghiệm sau đây được thực hiện năm lần ở 37°C: Thử nghiệm 1) BD-Ca-alg ở độ pH=1,2, Thử nghiệm 2) BD-EDA-alg ở độ pH=1,2, Thử nghiệm 3) BD-Ca-alg ở độ pH=6,8 và Thử nghiệm 4) BD-EDA-alg ở độ pH=6,8.

Các mẫu (1,0 ml mẫu⁻¹) được lấy từ ống này cách nhau năm phút trong 50 phút. Sau đó thể tích tương đương của môi trường hòa tan (1,0 ml, 37°C) được bổ sung vào để giữ mức chất lỏng trong các ống hằng định. Tất cả các mẫu được lọc qua đầu lọc xylan (0,45 μm , VWR) trước khi đặt chúng lên đĩa polystyren 96 lỗ (Nunc™, Sigma-Aldrich) cho thử nghiệm điểm kết thúc. Việc đọc đĩa được thực hiện bằng máy đọc khay vi thể VERSAmax (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, Mỹ) ở 610 nm và 24°C. Lượng BD giải phóng được xác định bằng cách áp dụng phép tiếp cận đường cong

chuẩn. Các đường cong chuẩn được tạo ra bằng cách lập đồ thị các nồng độ BD của chín dung dịch pha loãng tuần tự hai lần của dung dịch BD ($1,0 \text{ mg ml}^{-1}$) theo độ hấp thụ nằm trong khoảng từ $1,0$ đến $3,9 \times 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$. Dung dịch BD ($1,0 \text{ mg ml}^{-1}$) thu được từ BD-EncForm ($[\text{BD}] = 50,0 \text{ mg ml}^{-1}$) bằng cách sử dụng đệm thử nghiệm làm chất pha loãng.

B. Đánh giá môi trường hòa tan kiềm

Để lựa chọn môi trường hòa tan kiềm, là đại diện cho ruột cá hồi về nhiệt độ và độ pH, bốn thử nghiệm hòa tan được thực hiện như đã mô tả trong phần trước. Các thử nghiệm sau đây được thực hiện lặp lại năm lần trong môi trường hòa tan (đệm phosphate, độ pH= 8,0 và đệm Gly/NaOH, độ pH=8,6) ở 18°C : Thử nghiệm 5) BD-Ca-alg ở độ pH=8,0, Thử nghiệm 6) BD-EDA-alg ở độ pH=8,0, Thử nghiệm 7) BD-Ca-alg ở độ pH=8,6, và Thử nghiệm 8) BD-EDA-alg ở độ pH=8,6. Nồng độ BD trong các mẫu được xác định theo cách tương tự như đã được mô tả trước đây trong thử nghiệm hòa tan chuẩn.

C. Chiến lược thử nghiệm hòa tan mới được làm cho phù hợp với cá

Các điều kiện được áp dụng trong thử nghiệm này là phù hợp với các điều kiện mà các hạt tròn alginat thường được tiếp xúc trong quá trình đi qua đường tiêu hóa của cá hồi Đại Tây Dương. Do đó, các hạt tròn alginat đầu tiên được nhả chìm vào môi trường hòa tan axit hóa (đệm KPH/HCl, độ pH=3,0) trong 15 phút và sau đó dung dịch đệm axit được thay thế bằng môi trường hòa tan kiềm (đệm phosphate, độ pH=8,0). Trong thử nghiệm này, Thiết bị UPS 1 giống như đã mô tả trước đây được sử dụng. Để lặp lại các điều kiện tự nhiên mà cá hồi Đại Tây Dương sống trong đó một cách đầy đủ nhất có thể, hai nhiệt độ khác nhau (4°C và 18°C) được áp dụng trong thử nghiệm này. Các nhiệt độ đã chọn thường tương ứng với nhiệt độ nước trong mùa hè và mùa đông ở bờ biển Na Uy. Do đó, bốn thử nghiệm hòa tan sau đây được thực hiện năm lần: Thử nghiệm 9) BD-Ca-alg ở độ pH=3,0 – 8,0 và 4°C , Thử nghiệm 10) BD-EDA-alg ở độ pH=3,0 – 8,0 và 4°C , Thử nghiệm 11) BD-Ca-alg ở độ pH=3,0 – 8,0 và 18°C , Thử nghiệm 12) BD-EDA-alg ở độ pH=3,0 – 8,0 và 18°C . Mẫu đầu tiên được lấy sau 15 phút trong đệm KPH/HCl (độ pH=3,0). Việc lấy thêm mẫu, bắt đầu 5 phút sau khi thay thế môi trường hòa tan, được thực hiện như đã mô tả trước đây trong quy trình chuẩn.

Tương tự, thử nghiệm điểm kết thúc được thực hiện theo quy trình đã mô tả trong các phần trước. Hiệu suất bao nang của BD được xem xét khi tính toán tỉ lệ phần trăm giải phóng từ các hạt tròn alginat.

Phân tích thống kê

Profin hòa tan của BD được thể hiện dưới dạng đường cong của tỉ lệ phần trăm giải phóng BD tích lũy trung bình với các thanh sai số (khoảng tin cậy 95%) theo thời gian được tạo ra bằng cách sử dụng chức năng Phân tích số liệu và Đồ thị phân tán trong Microsoft Excel 2010.

Kết quả

Hiệu suất bao nang trung bình của BD trong BD-Ca-alg và BD-EDA-alg lần lượt là 90% (SD = 4%) và 70% (SD = 4%). Kích thước trung bình của hạt tròn Ca-alginat là 3,0 mm trong khi kích thước trung bình của các hạt tròn EDA-alginat là 3,7 mm. Hình dạng của hạt tròn là hình cầu đối với cả hai loại hạt (Fig.1).

Sự giải phóng BD từ hạt tròn Ca-alginat và EDA-alginat đều thấp hơn giới hạn định lượng ($LoQ = 3,9 \times 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$) của thử nghiệm trong các thử nghiệm hòa tan chuẩn (Thử nghiệm 1 và 2 được thực hiện ở độ pH=1,2 ở 37°C; Thử nghiệm 3 và 4 được thực hiện ở độ pH=6,8 ở 37°C).

Tương tự, sự giải phóng BD từ cả hai loại hạt tròn alginat đều thấp hơn LoQ trong các thử nghiệm được thực hiện trong môi trường hòa tan kiềm (Thử nghiệm 5 và Thử nghiệm 6 được thực hiện ở độ pH=8,0 ở 18°C; Thử nghiệm 7 và Thử nghiệm 8 được thực hiện ở độ pH=8,6 ở 18°C). Từ thử nghiệm *in vitro* này có thể thấy là cả chất nền Ca-alginat và EDA-alginat đều hòa tan ít trong các dung dịch đệm có độ pH=1,2 ở 37°C, độ pH=6,8 ở 37°C, độ pH=8,0 ở 18°C và độ pH=8,6 ở 18°C trong khoảng thời gian là 50 phút.

Trong các thử nghiệm hòa tan (Thử nghiệm 9 – 12) được làm cho phù hợp với các điều kiện mà trong đó cá hồi tiêu hóa alginat, sự giải phóng đáng kể BD được quan sát thấy trong cả bốn thử nghiệm. Sự giải phóng, là thấp hơn LoQ ở độ pH=3,0, là khá nhanh sau khi tăng độ pH từ độ pH=3,0 đến độ pH=8,0. Từ Thử nghiệm 12 ở 18°C (Fig. 2), có thể thấy rằng 50% BD được giải phóng từ BD-EDA-alg sau 23 phút, trong khi

85% BD được giải phóng sau 40 phút. Như đã thấy trong Thử nghiệm 10 với hạt tròn BD-EDA-alg tương tự được thực hiện ở 4°C, tỉ lệ giải phóng 50% và 85% được ghi lại lần lượt sau 19 và 39 phút. Tốc độ hòa tan của BD-Ca-alg (Thử nghiệm 11) ở 18°C thấp hơn một chút so với tốc độ giải phóng từ BD-EDA-alg ở cả 4°C và 18°C. Do đó, 50% BD tự do trong dung dịch sau 26 phút. Ngoài ra, 85% BD được giải phóng trong vòng 48 phút. Tuy nhiên, chỉ với 30% BD được hòa tan sau 49 phút, tốc độ hòa tan của BD-Ca-alg ở 4°C (Thử nghiệm 9) là thấp hơn nhiều so với ba thử nghiệm còn lại. Dự đoán trước về tốc độ hòa tan được tính toán bằng cách sử dụng hàm xấp xỉ bậc hai được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Các đường cong hòa tan liên quan đến sự giải phóng dextran xanh (BD) từ canxi (BD-Ca-alg) và etylendiamoni alginat (BD-EDA-alg) ở 4°C và 18°C. Các hàm xấp xỉ bậc nhất và bậc hai của đường cong hòa tan được thể hiện với các hệ số xác định (R^2) tương ứng. Số liệu rất phù hợp với cả hàm tuyến tính và không tuyến tính cách nhau 0 đến 50 phút sau khi thay đổi môi trường hòa tan.

Sản phẩm	Bậc	Đường cong hòa tan	R^2
BD-EDA-alg ở 18°C	Bậc nhất	$y=2,2101x-3,9877$	0,97
	Bậc hai	$y=-0,0112x^2+2,7696x-8,1836$	0,98
BD-EDA-alg ở 4°C	Bậc nhất	$y=2,1061x+2,251$	0,96
	Bậc hai	$y=-0,0264x^2+3,4249x-7,6404$	0,99
BD-Ca-alg ở 18°C	Bậc nhất	$y=1,8109x+1,7095$	0,99
	Bậc hai	$y=-0,01x^2+2,3088x-2,0247$	1,00
BD-Ca-alg ở 4°C	Bậc nhất	$y=0,5760x+4,0063$	0,95
	Bậc hai	$y=-0,0067x^2+0,91121x+1,4852$	0,98

Dược chất, được bao nang trong các chất nền alginat, chủ yếu được giải phóng bằng hai cơ chế: 1) khuếch tán dược chất qua các lỗ của mạng polyme và 2) thoái biến

mạng polyme. Khác với các được chất khối lượng phân tử thấp, dextran xanh (Khối lượng phân tử = 2.000.000) là quá lớn nên nó không thể khuếch tán qua các lỗ của chất nền alginat nếu các lỗ này không giãn thêm (Kim, C. và Lee, E., 1992. The controlled release of blue dextran from alginat beads. *Int. J. Pharm.* 79, 11-19). Do đó, hầu hết sự giải phóng BD từ các chất nền alginat có lẽ xảy ra do sự thoái biến mạng polyme. Trong các thử nghiệm trước, tốc độ giải phóng rất thấp của isothioxyanat dextran huỳnh quang (khối lượng phân tử = 145.000) được quan sát thấy ở độ pH=7,4 trong giờ đầu tiên.

Sự thoái biến EDA-alginat rất ít được dự đoán xảy ra ở độ pH=3,5 – 7,0 vì hầu hết etylendiamin (dạng không tích điện) sẽ tồn tại dưới dạng etylendiamoni (tích điện dương) ở độ pH < 7,0 và hầu hết alginat (axit alginic) sẽ được khử proton (tích điện âm) ở độ pH > 3,5.

Theo các kết quả thử nghiệm được trình bày trong sáng chế, cách hiệu quả để làm yếu cấu trúc liên kết chéo của chất nền alginat là sử dụng môi trường hòa tan axit hóa (độ pH < 3,5) trước khi sử dụng môi trường kiềm (độ pH > 7,0). Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, cơ chế sau đây có thể được áp dụng: Ở độ pH thấp hơn 3,5 (axit alginic, $pK_a = 1,5-3,5$), ion hydro (H^+) thay thế etylendiamoni trong mạng alginat tạo ra cấu trúc không liên kết của axit alginic. Mặc dù axit alginic hòa tan trong nước kém, nó có thể chuyển hóa dễ dàng thành dạng hòa tan trong nước (ví dụ, natri alginat) ở độ pH cao hơn. Đồng thời, độ pH kiềm tăng dần (độ pH > 7,0) làm giảm dần độ bền liên kết chéo của etylendiamoni do khử proton của các nhóm amin của nó và chuyển hóa thành etylendiamin, dạng không tích điện. Do đó, việc xử lý trước bằng môi trường axit hóa (độ pH < 3,5) có thể tạo ra tốc độ giải phóng nhanh hơn nhiều so với việc xử lý trực tiếp bằng môi trường kiềm (độ pH > 7,0). Do đó, các điều kiện chuẩn được áp dụng chung trong các thử nghiệm hòa tan (độ pH = 1,2 và 6,8 ở 37°C) thường khiến cho tốc độ hòa tan rất chậm.

Bằng cách sử dụng lần lượt môi trường có độ pH = 3,0 sau đó là độ pH = 8,0, tốc độ giải phóng cao được thể hiện trong Fig. 2 đạt được. Như được đề cập trên đây, việc đưa các hạt tròn alginat vào đệm axit hóa (độ pH = 3,0) trong khoảng thời gian ngắn có thể chuyển hóa một số EDA-alginat thành axit alginic. Do đó, axit alginic và EDA-alginat còn lại bất kỳ sẽ được hòa tan dễ dàng khi đệm axit được thay thế bằng đệm kiềm (độ

pH = 8,0) trong khi EDA sẽ trở thành tích điện ít hơn. Theo cách tương tự, tốc độ rã của chất nền Ca-alginat tăng dần khi độ pH của môi trường hòa tan tăng. Đồng thời, sức hút của natri tích điện (Na^+) đối với các nhóm carboxylic của alginat tăng dần khi độ pH lớn hơn 8 (Oberyukhtina, I., Bogolitsyn, K., Popova, N., 2001. Physicochemical properties of solutions of natri alginat extracted from brown algae *Laminaria digitata*. Russ. J. Appl., 74, 1645–1649). Mặt khác, canxi phosphat có thể bắt đầu kết tủa dễ dàng từ hệ chứa đệm Ca^{2+} và phosphat ở độ pH > 6,7 (Feenstra, T.P., De Bruyn, P.L., 1979. Formation of canxi phosphats in moderately supersaturated solutions. J. Phys. Chem. 83, 475–479). Theo sáng chế và chiến lược thử nghiệm hòa tan mới được phát triển, có thể thấy rằng EDA-alginat có hiệu quả cao và có khả năng làm hệ phân phối qua đường miệng trong các điều kiện thường được thấy ở cá, trong đó độ pH dạ dày là 2,7 - 4,9 và độ pH ruột là 7,5 - 8,5.

Thường được biết là độ tan của alginat liên kết chéo là phụ thuộc độ pH và nhiệt độ. Theo Fig. 2, có thể kết luận là độ tan của EDA-alginat là phụ thuộc độ pH, nhưng bất ngờ là không bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4 – 18°C. Ngược lại, tốc độ giải phóng của BD từ chất nền Ca-alginat là thấp hơn đáng kể so với tốc độ giải phóng từ EDA-alginat ở 4°C và Ca-alginat ở 18°C. Điều này phù hợp với các kết quả từ thử nghiệm *in vivo* được thực hiện ở 5°C (xem dưới đây). Do đó, theo sáng chế, có thể chứng minh được là etylendiamoni alginat đặc biệt thích hợp làm hệ phân phối qua đường miệng ở các sinh vật biến nhiệt như cá.

Thử nghiệm hòa tan *in vivo* của các vi hạt alginat

Hiệu quả của etylendiamoni alginat làm hệ phân phối qua đường miệng theo sáng chế được thử nghiệm thêm trong thử nghiệm *in vivo* với cá hồi Đại Tây Dương (*Salmo salar*).

Bào chế các vi hạt alginat được nhồi bằng HRP:

Các vi hạt canxi alginat (HRP-Ca-alg) và etylendiamoni alginat (HRP-EDA-alg) được nhồi bằng HRP được tạo ra trong quy trình bao nang được gọi là kỹ thuật phun được hỗ trợ bằng khí động lực học. Trong quy trình phun được hỗ trợ bằng khí động lực học này, tia chứa giọt alginat được tạo ra bằng cách ép HRP-EncForm (2 × 240,0 g) qua đầu phun bằng áp suất không khí. Đầu phun này được lắp với vòi ($\varnothing = 500 \mu\text{m}$) và

cửa ra ($\varnothing = 500 \mu\text{m}$) có cùng kích thước. Tia tạo ra được hướng về phía bề mặt của dung dịch liên kết chéo từ khoảng cách 100 mm. Dung dịch liên kết chéo, dung dịch CaCl_2 (500 ml, 4°C) và dung dịch $\text{EDA}\cdot 2\text{HCl}$ (500 ml, 4°C) được sử dụng để lần lượt tạo ra các vi hạt HRP-Ca-alg (240,0 g) và HRP-EDA-alg (240,0 g). Tốc độ dòng (100 ml giờ⁻¹) của dung dịch alginat được kiểm soát bằng bơm xylanh chính xác cao (PHD 4400, Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge, Anh). Áp suất không khí trong quy trình này được duy trì ở 3,00 bar bằng Bộ điều chỉnh độ chính xác (IR1000, SMC Corporation, Tokyo, Nhật). Các vi hạt tạo thành được lọc ra bằng cách lọc hút và rửa bằng nước DI ($3 \times 20 \text{ ml}$) trước khi bảo quản ở -20°C . Khối lượng thu được của các vi hạt HRP-Ca-alg và HRP-EDA-alg lần lượt là 81,54 g và 78,29 g. Hệ nhiễu xạ laze (HELOS BR CUVETTE, CUV-50ML/US, mô đun quang học R5, Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Đức) được sử dụng để đo cỡ hạt tròn alginat được tạo ra ở bước sóng $\lambda = 632,8 \text{ nm}$. Đường kính trung bình của các vi hạt là 25-26 μm .

Nếu các hạt thu được sẽ được kết hợp vào viên thức ăn qua bề mặt, thì đường kính của vi hạt này phải phù hợp với kích thước lỗ của viên. Điều này đạt được nhờ quy trình được mô tả trên đây.

Sản xuất thức ăn thử nghiệm

Hai loại thức ăn thử nghiệm (5,0 kg mỗi mẻ) chứa HRP được tạo ra bằng cách phủ các vi hạt HRP-alg ($d_{\text{trung vi}} = 25 - 26 \mu\text{m}$) đã được tạo huyền phù trong dầu cá (1210,0 g) lên viên nền EWOS Opal 200 (BP) trong quy trình phủ ngâm chân không (Bảng 2).

Bảng 2: Thành phần của thức ăn thử nghiệm HRP-Ca-thức ăn, HRP-EDA-thức ăn và Ctrl-thức ăn

Tên thức ăn	Hỗn hợp dầu			BP ⁱⁱⁱ [g]	Tổng [g]
	Dầu cá [g]	HRP-Ca- alg ⁱ [g]	HRP-EDA- alg ⁱⁱ [g]		
Ctrl-thức ăn	1210,00	0,00	0,00	3790,00	5000,00

HRP-Ca- thức ăn	1210,00	81,54	0,00	3708,46	5000,00
HRP-EDA- thức ăn	1210,00	0,00	78,29	3711,71	5000,00

ⁱHRP-Ca-alg – sản phẩm được tạo ra bằng cách bao nang dung dịch HRP trong chất nền Ca-alginat

ⁱⁱHRP-EDA-alg – sản phẩm được tạo ra bằng cách bao nang dung dịch HRP trong chất nền EDA-alginat

ⁱⁱⁱBP – viên nền là sản phẩm thức ăn cho cá dạng bán thành phẩm, chất ép khô không trộn dầu.

HRP-Ca-thức ăn được tạo ra bằng cách bao BP (3708,46 g) bằng huyền phù dầu chứa HRP-Ca-alg (81,54 g) trong khi HRP-EDA-thức ăn được tạo ra dễ dàng bằng cách phủ huyền phù dầu chứa HRP-EDA-alg (78,29 g) lên BP (3711,71 g) trong máy bao chân không. Thức ăn đối chứng (Ctrl-thức ăn) không có HRP được tạo ra bằng cách chi bao BP (3790,00 g) bằng dầu cá (1210,00 g).

Thử nghiệm lâm sàng cá

Cá hồi Đại Tây Dương *Salmo salar* (Tổng số: n = 495, $m_{\text{trung bình}} = 394$ g) được phân bố ngẫu nhiên vào chín thùng nước biển tròn ($d = 1$ m, $V = 0,5$ m³, $t_{\text{nước}} = 5^{\circ}\text{C}$) ở EWOS Innovation AS (Dirdal, Na Uy) chín tuần trước khi bắt đầu thử nghiệm lâm sàng. Các thùng được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm (Ca-alginat, EDA-alginat và Đối chứng), với ba thùng được xếp vào mỗi nhóm. Sau giai đoạn thích nghi môi trường chín tuần, nhóm cá Ca-alginat và EDA-alginat được xử lý lần lượt bằng HRP-Ca-thức ăn và HRP-EDA-thức ăn. Nhóm Đối chứng được cho ăn bằng Ctrl-thức ăn. Việc xử lý kéo dài trong hai tuần sau đó lấy mẫu. Tình trạng sức khỏe của cá rất tốt trong khoảng thời gian thử nghiệm lâm sàng kéo dài 11 tuần.

Lấy mẫu

Trước khi lấy mẫu, cá (n = 15 cá mỗi thùng) được gây mê bằng Finquel® (100 mg l⁻¹). Khối lượng của từng con cá được ghi lại cho mỗi con cá được lấy mẫu. Các mẫu sau đây được lấy 1) Dạ dày, 2) Túi mù hạ vị, 3) Ruột giữa, và 4) Ruột xa. Mỗi khoang tiêu hóa được lấy mẫu được mở bằng cách cắt dọc và đặt vào bình chứa nước

DI (10,0 ml, $t = 4^{\circ}\text{C}$). Sau khi lắc mạnh, thành phần chất rắn được tách ra khỏi pha lỏng bằng cách lọc bằng trọng lực. Dịch lọc thu được (2 ml) từ mỗi bình được chuyển sang ống Eppendorf và được bảo quản ở -20°C đến khi thử nghiệm.

Phân tích mẫu

Các mẫu được làm tan và ly tâm lắng ở tốc độ 4000 vòng/phút trong bốn phút trước khi sử dụng. Các mẫu dạ dày và túi mù hạ vị được sử dụng không pha loãng trong khi các mẫu ruột xa và ruột giữa được pha loãng 1:200 bằng nước DI (4°C) trước khi thử nghiệm. Đối với các mẫu ruột giữa và ruột xa đã pha loãng (1:200) thấp hơn giới hạn định lượng ($0,391 \text{ ng ml}^{-1}$), các dung dịch pha loãng thấp hơn như 1:10 và 1:100 hoặc không pha loãng được sử dụng để làm tăng độ nhạy. Thử nghiệm động học được thực hiện bằng cách dùng pipet đưa các phần phân ước của các mẫu ($50 \mu\text{l}$) lên đĩa polystyren 96 lỗ (Nunc™, Sigma-Aldrich). Phản ứng được khởi động bằng cách bổ sung cơ chất lỏng 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) ($50 \mu\text{l}$, 37°C). Phép đo độ hấp thụ được thực hiện bằng cách sử dụng máy đọc khay vi thể VERSAmax (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, Mỹ) ở 655 nm. Tốc độ động học được ghi lại mỗi 20 giây trong tổng số 10 phút ở 37°C . Nồng độ HRP của các mẫu này được xác định bằng cách sử dụng đường cong chuẩn làm công cụ định lượng từ 0,391 đến 200 ng ml^{-1} . Đường cong chuẩn được tạo ra bằng cách lập đồ thị các nồng độ HRP của 10 dung dịch pha loãng tuần tự hai lần của dung dịch HRP (200 ng ml^{-1}) theo tốc độ động học của chúng (độ dốc của các đường cong độ hấp thụ theo thời gian).

Phân tích thống kê

Các nồng độ HRP trung bình với các thanh sai số (khoảng tin cậy 95%) được phát hiện ra trong các khoang khác nhau của đường tiêu hóa được tính toán và được biểu diễn trong đồ thị bằng cách sử dụng Thống kê IBM SPSS cho Windows, phiên bản 22.0.

Kết quả

Trong thử nghiệm lâm sàng này, cá tiêu thụ trung bình 12-13 g thức ăn trong quá trình xử lý với thức ăn chứa HRP được bao nang trong alginat. Do đó, cá đã được xử lý ($m_{\text{trung bình}} = 490 - 500 \text{ g}$) nhận được từ 230 đến $240 \mu\text{g}$ HRP trong khoảng thời gian này (Bảng 3).

Bảng 3: Liều HRP liên quan đến kích thước cá theo đơn vị khối lượng và lượng thức ăn sử dụng hàng tuần (FI) cho mỗi con cá. Liều này được chỉ ra là liều HRP hàng tuần cho mỗi con cá ($\mu\text{g cá}^{-1} \text{tuần}^{-1}$) và liều HRP hàng tuần cho mỗi đơn vị khối lượng cá ($\mu\text{g cá}^{-1} \text{tuần}^{-1}$). Thức ăn được sử dụng: không có HRP (Ctrl-thức ăn), có HRP được bao nang trong canxi alginat (HRP-Ca-thức ăn), HRP được bao nang trong etylendiamoni alginat (HRP-EDA-thức ăn).

Nhóm	Thức ăn	Kích thước cá (g) $\pm$ SD	FI (g cá ⁻¹ tuần ⁻¹) $\pm$ SD	Liều HRP ⁱ ($\mu\text{g cá}^{-1}$ tuần ⁻¹) $\pm$ SD	Liều HRP ($\mu\text{g kg}^{-1}$ tuần ⁻¹) $\pm$ SD
Đối chứng	Ctrl-thức ăn	492 $\pm$ 121	12,7 $\pm$ 1,7	0,00	0,00
Ca-alginat	HRP-Ca-thức ăn	495 $\pm$ 95	12,5 $\pm$ 1,4	239 $\pm$ 26	483 $\pm$ 46
EDA-alginat	HRP-EDA-thức ăn	499 $\pm$ 108	12,1 $\pm$ 0,9	232 $\pm$ 17	465 $\pm$ 50

Liều ⁱHRP là lý thuyết và giả định sự hao hụt do quá trình xử lý rất ít.

Nhóm cá (Ca-alginat) được nuôi bằng HRP-Ca-thức ăn có nồng độ HRP cao hơn đáng kể trong ruột xa so với các khoang tiêu hóa (GI) khác (Fig. 3). Mặt khác, cá được nuôi bằng HRP-EDA-thức ăn có nồng độ HRP cao hơn đáng kể trong ruột giữa so với trong các đoạn GI khác. Ngoài ra, nhóm này cũng có nồng độ HRP cao hơn đáng kể trong ruột xa. Ngược lại với các nhóm được xử lý bằng HRP, hoạt tính peroxidaza là khá thấp trong các nhóm đối chứng.

Theo Fig. 3, có thể thấy là sự giải phóng HRP là nhanh hơn đáng kể từ hạt tròn EDA-alginat so với từ hạt tròn Ca-alginat. Theo các kết quả của thử nghiệm này, không dự kiến là sự giải phóng được chất từ EDA-alginat bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi nhiệt độ theo mùa trong môi trường sống của cá hồi Đại Tây Dương. Các đặc điểm đã chứng minh được trong thử nghiệm này làm cho hệ phân phối qua đường miệng dựa trên EDA-alginat rất hiệu quả đối với cá như cá hồi Đại Tây Dương.

Tóm lại, sáng chế không những chỉ ra các khác biệt tồn tại giữa các chất nền alginat liên kết chéo khác nhau mà còn xác định được hệ phân phối qua đường miệng

mới, hiệu quả hơn. Các khác biệt giữa EDA-alginat và Ca-alginat là đặc biệt rõ ràng về tốc độ hòa tan ở nhiệt độ thấp. Điều này rất phù hợp với các sinh vật biến nhiệt sống ở nhiệt độ thấp như cá hồi Đại Tây Dương. Để nhận biết các đặc điểm này của các hạt tròn alginat, chiến lược thử nghiệm hòa tan mới đã đề cập trên đây được phát triển. Chiến lược mới này làm cho thử nghiệm hòa tan điển hình cao đối với các điều kiện tiêu hóa được tìm thấy ở cá có dạ dày. Do đó, các kết quả được tạo ra bởi thử nghiệm hòa tan được thiết kế lại này là phù hợp cao với các kết quả thu được từ thử nghiệm *in vivo*. Trên tất cả, EDA-alginat là hệ phân phối rất tốt được chất đại phân tử cho động vật biến nhiệt như cá hồi. Ngoài ra, có bằng chứng thuyết phục là hệ phân phối này độc lập với nhiệt độ một cách bất ngờ trong khoảng nhiệt độ của môi trường sống của cá hồi. Hệ quả thực tiễn của các kết quả của thử nghiệm này là lượng dược chất được phân phối là không phụ thuộc nhiệt độ môi trường khi sử dụng hệ phân phối qua đường miệng mới này.

Ưu điểm của các vi hạt tròn etylendiamoni alginat như là hệ phân phối qua đường miệng khi được kết hợp vào thức ăn cho cá và được sử dụng bằng đường miệng cho cá, là ở chỗ các hạt tròn này hòa tan hiệu quả trong ruột cá và phân phối thành phần tại đúng vị trí để hấp thụ trong các điều kiện tiêu hóa thường được thấy ở cá. Tuy nhiên, sáng chế, mặc dù được phát hiện ra là đặc biệt thích hợp để sử dụng ở cá, không bị giới hạn vào nhóm sinh vật này và cũng có thể được sử dụng làm hệ phân phối qua đường miệng cho các đại phân tử ở động vật có vú bao gồm người, động vật lưỡng cư, bò sát, chim, giáp xác, động vật thân mềm, v.v..

Chất có hoạt tính sinh học theo sáng chế bao gồm dược chất, chất, hợp chất, chế phẩm bất kỳ hoặc hỗn hợp của chúng, mà là hữu hiệu trong việc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ở sinh vật và là thích hợp để bao nang trong alginat và sau đó phân phối bằng đường miệng. Chất có hoạt tính sinh học này bao gồm các chất như protein, peptit, vaccin, kháng thể, kháng nguyên, hormon, dược chất, dược chất đại phân tử cụ thể, axit amin, nucleotit, polynucleotit, enzym, và chất có hoạt tính sinh lý bất kỳ, chất dinh dưỡng, chất xơ kích thích sự phát triển của lợi khuẩn trong ruột, lợi khuẩn, chất kích thích miễn dịch và các chất tương tự.

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, thuật ngữ sinh vật “nước lạnh” có nghĩa là động vật biến nhiệt bất kỳ thường sống trong nhiệt độ môi trường trung bình là khoảng 20°C hoặc thấp hơn. Tương tự “cá nước lạnh” là cá sống trong nhiệt độ nước trung bình là khoảng 20°C hoặc thấp hơn. Ví dụ điển hình về cá nước lạnh là cá biển nước lạnh như cá tuyết và họ cá hồi.

Thuật ngữ “đường ruột ngắn” hoặc “ruột ngắn” liên quan đến cá có nghĩa là tổng độ dài của ruột không lớn hơn khoảng 2,5 lần độ dài cơ thể của cá này.

Sẽ được hiểu là các dấu hiệu của sáng chế được mô tả trên đây có thể được biến đổi mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế như được xác định trong yêu cầu bảo hộ kèm theo đây.

Yêu cầu bảo hộ

1. Thức ăn chức năng chứa viên thức ăn cho cá bao gồm các lỗ rỗng, các lỗ rỗng bao gồm huyền phù dầu chứa các hạt etylendiamoni alginat có kích thước hạt trung bình không quá 2000 micromet, trong đó các hạt etylendiamoni alginat bao gồm ít nhất một chất có hoạt tính sinh học mà được bao nang hoặc được giữ lại trong etylendiamoni alginat, trong đó thức ăn chức năng để sử dụng trong việc điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh ở cá nước lạnh.
2. Thức ăn chức năng theo điểm 1, trong đó huyền phù dầu chứa các hạt etylendiamoni alginat được phủ chân không trên viên thức ăn cho cá.
3. Thức ăn chức năng theo điểm 1, trong đó các hạt etylendiamoni alginat có dạng hạt tròn.
4. Thức ăn chức năng theo điểm 1, trong đó các hạt etylendiamoni alginat có dạng hạt hình cầu.
5. Thức ăn chức năng theo điểm 1, trong đó kích thước hạt trung bình không lớn hơn 1000 μm .
6. Thức ăn chức năng theo điểm 1, trong đó kích thước hạt trung bình không lớn hơn 300 μm .
7. Thức ăn chức năng theo điểm 1, trong đó kích thước hạt trung bình không lớn hơn 25 μm .
8. Phương pháp sản xuất thức ăn chức năng chứa ít nhất một chất có hoạt tính sinh học trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:
 - (i) điều chế huyền phù dầu chứa các hạt tròn etylendiamoni alginat chứa chất có hoạt tính sinh học đã được giữ hoặc bao nang trong đó,
 - (ii) trộn huyền phù của bước (i) với viên thức ăn trong máy bao chân không,
 - (iii) rút không khí từ máy bao tạo ra môi trường có áp suất giảm, và
 - (iv) từ từ khôi phục lại áp suất khí quyển bằng cách để không khí đi vào lại máy bao để đẩy huyền phù của bước (i) vào các lỗ rỗng của viên thức ăn.
9. Phương pháp sản xuất thức ăn chức năng chứa ít nhất một chất có hoạt tính sinh học trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

(i) điều chế hỗn hợp khô bằng cách trộn các hạt tròn etylendiamoni alginat được bao hoặc giữ ít nhất một chất có hoạt tính sinh học với bột thức ăn chứa thành phần thức ăn không chứa dầu khác,

(ii) bào chế chất ép đùn bằng cách ép đùn hỗn hợp khô trong bước (i) bằng cách sử dụng máy ép đùn hoặc bằng cách sử dụng máy ép viên,

(iii) tạo ra các viên nền bằng cách sấy khô chất ép đùn ở bước (ii) trong buồng sấy, và

(iv) tạo ra thức ăn thành phẩm bằng cách bao dầu các viên nền của bước (iii) trong quy trình bao ngâm chân không.

1/3

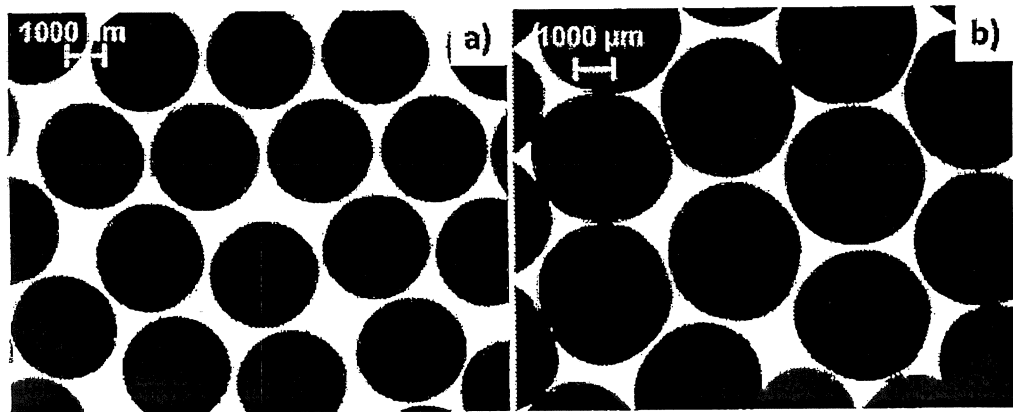


Fig. 1

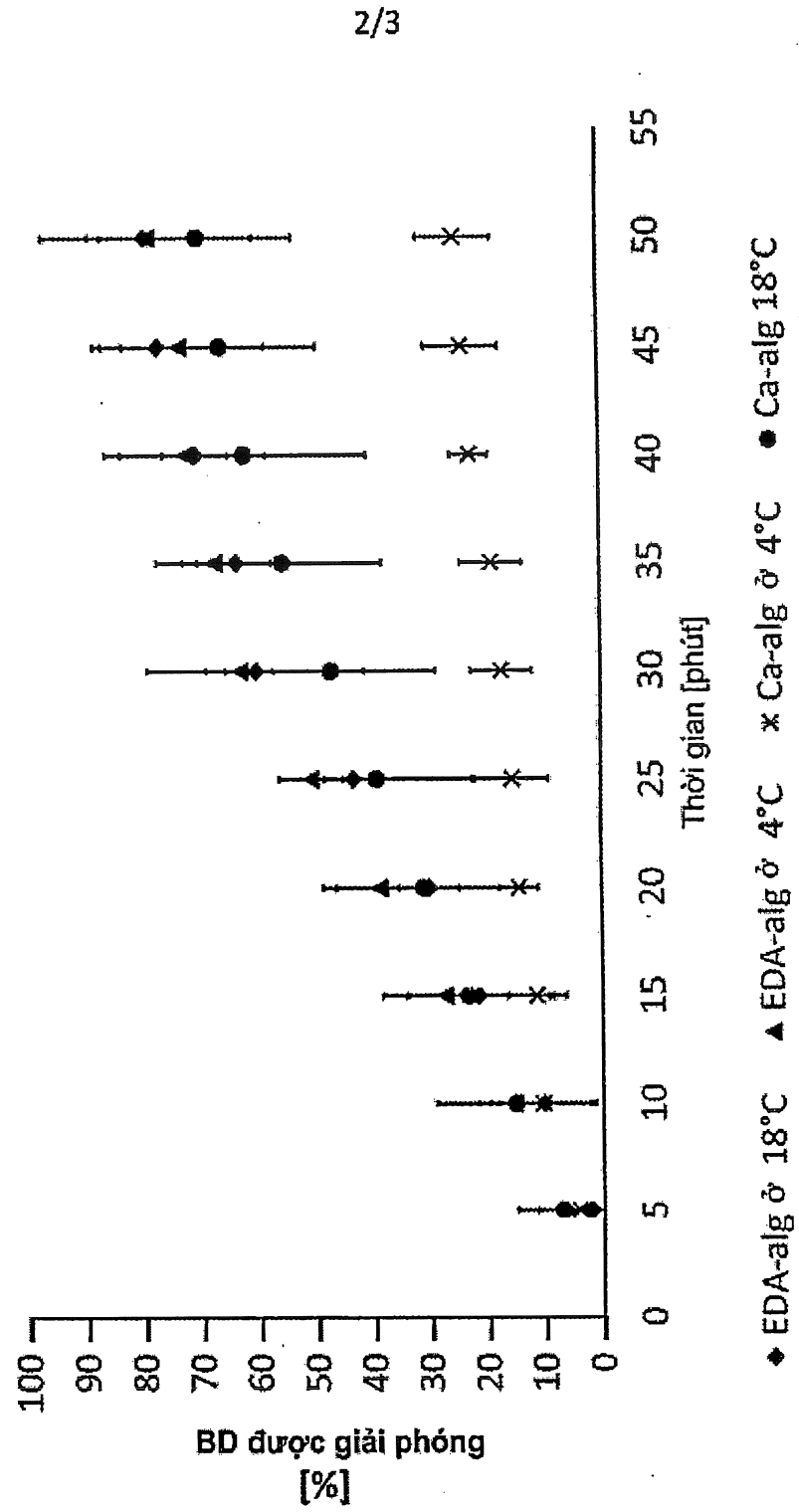


Fig. 2

3/3

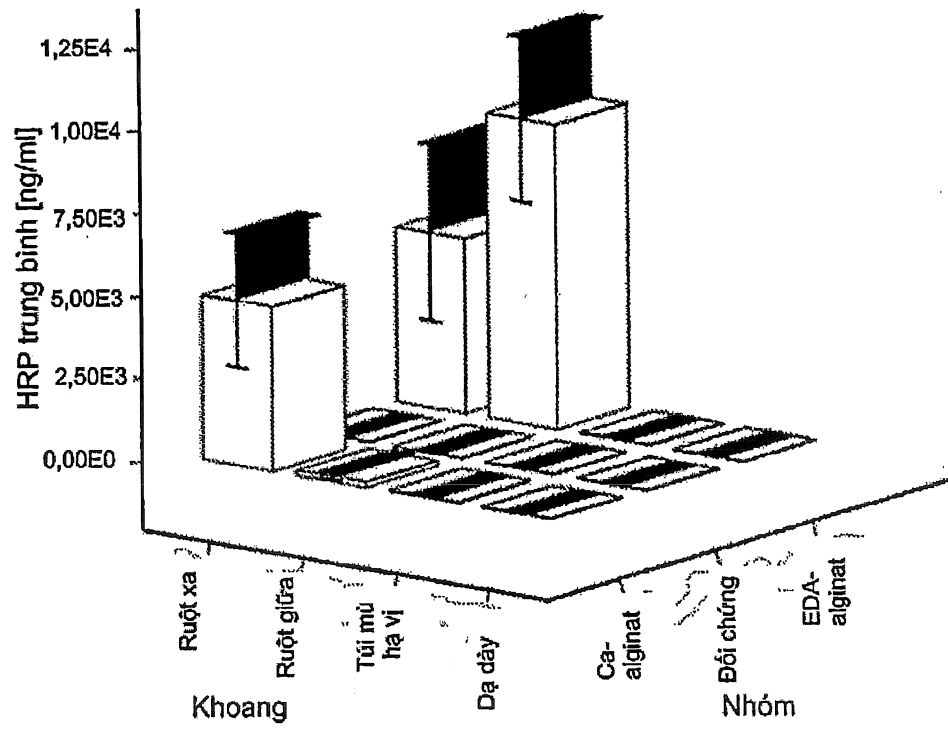


Fig. 3