



(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)



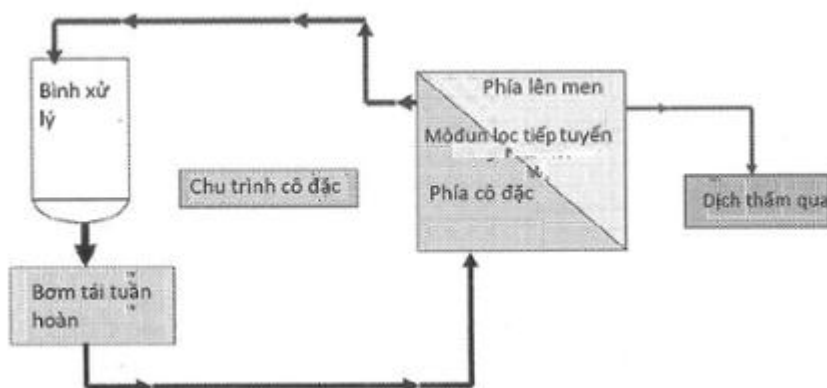
1-0041901

(51)⁷ C12N 1/20; A23K 50/10; A23K 50/20; (13) B
A61K 35/744; A61P 31/04; C12N 1/04;
A23K 10/18; A23K 50/75

- (21) 1-2019-04807 (22) 31/01/2018
(86) PCT/US2018/016321 31/01/2018 (87) WO2018/144653 09/08/2018
(30) 62/452,804 31/01/2017 US; 62/452,816 31/01/2017 US; 62/510,723 24/05/2017 US
(45) 25/12/2024 441 (43) 25/12/2019 381A
(73) 1. KANSAS STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION (US)
2005 Research Park Circle, Suite 105, Manhattan, Kansas 66502, United States of America
2. MS BIOTECH, INC. (US)
2489 W. Main Street, Littleton, Colorado 80120, United States of America
(72) DROUILLARD, James Scott (US); APERCE, Celine Caroline (FR); HERREN, Gina Rae (US); ELLERMAN, Tara Jo (US); SCALETTI, Ciana Marie (US); VAN JORDAN, Katherine (US); LATTIMER, James Morris (US); BEYER, Scott (US); UWITUZE, Solange (RW); DOUTHIT, Teresa Lea (US); GUNKEL, Christina Denise (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT TẾ BÀO MEGASPHAERA ELSDENII ĐÔNG KHÔ HOẶC TẾ BÀO VI KHUẨN YẾM KHÍ ĐÔNG KHÔ TRÊN QUY MÔ THƯƠNG MẠI

(57) Sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô, chất phụ gia thực phẩm dạng rắn, chế phẩm và bộ kit chứa các tế bào này. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera* đông khô được bao nang, tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô, tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được bao nang, tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc nấm men đông khô và tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc nấm men đông khô được bao nang. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp không nhằm mục đích chữa bệnh để cải thiện độ sinh khả dụng của phospho có nguồn gốc thực vật trong chế độ ăn của động vật và hiệu suất sinh trưởng ở động vật.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tế bào *Megasphaera elsdenii*, phương pháp sản xuất tế bào *M. elsdenii*, chất phụ gia thực phẩm và chế phẩm chứa các tế bào này, và việc sử dụng bao gồm sử dụng các tế bào này cho động vật, bao gồm, ví dụ, để cải thiện hiệu suất sinh trưởng và/hoặc thể trạng. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào vi sinh vật, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở tế bào vi khuẩn hiếu khí, tế bào vi khuẩn yếm khí, và tế bào nấm men, và phương pháp sản xuất tế bào vi sinh vật, chất phụ gia thực phẩm và chế phẩm chứa các tế bào vi sinh vật, và việc sử dụng bao gồm sử dụng các tế bào vi sinh vật này cho động vật, bao gồm, ví dụ, để cải thiện hiệu suất sinh trưởng và/hoặc thể trạng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Megasphaera elsdenii (tức là, *M. elsdenii*) là song cầu khuẩn Gram âm, không di động, sử dụng lactat làm nguồn cacbon ưu tiên và có thể hỗ trợ ngăn ngừa chứng nhiễm toan, một rối loạn tiêu hóa phổ biến ảnh hưởng đến hàng triệu con bò và gia súc lấy sữa mỗi năm.

Khi gia súc và các động vật nhai lại khác ăn lượng lớn thức ăn chứa tinh bột (ví dụ, hạt ngũ cốc) hoặc các đường đơn giản, các vi sinh vật cơ hội trong dạ dày có thể nhanh chóng lên men các hợp chất này thành axit lactic. Axit lactic là axit hữu cơ mạnh và có thể dẫn đến chứng nhiễm toan lactic, làm phá vỡ hoạt động tiêu hóa bình thường và gây thương tổn lớn cho thành ống tiêu hóa ở động vật nhai lại. Các động vật bị ảnh hưởng sẽ cho hiệu suất dưới tối ưu. Và, thể cấp tính nhất của chứng nhiễm toan lactic có thể gây thương tổn không phục hồi cho hệ tiêu hóa và hệ hô hấp của động vật, cũng như tăng tỷ lệ chết.

M. elsdenii có thể hỗ trợ kiểm soát chứng nhiễm toan lactic bởi khả năng chuyển hóa axit lactic của vi khuẩn này thành các axit béo dễ bay hơi (VFA; ví dụ, butyrat, propionat, và axetat), là các chất hữu cơ ít có hại hơn. Tuy nhiên, quần thể *M. elsdenii* trong ống dạ dày-ruột của động vật nhai lại thường ở mức quá thấp để ngăn ngừa nguy cơ nhiễm toan. Do đó, đã phát triển giống nuôi cấy lỏng chứa các tế bào sống thuộc chủng *M. elsdenii*, Lactipro®, để làm tăng tỷ lệ khu trú của *M. elsdenii* trong ống dạ dày-ruột của động vật

nhai lại. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,550,139. Tuy nhiên, có nhiều rào cản thực tiễn hạn chế việc sử dụng sản phẩm chứa *M. elsdenii*, bao gồm khó khăn trong việc duy trì sản phẩm chứa *M. elsdenii* trong điều kiện yếm khí mà sinh vật này cần và khó khăn trong vận chuyển sản phẩm chứa *M. elsdenii* từ dây chuyền sản xuất đến vị trí sử dụng cuối trong vòng 14 ngày, mà sau thời gian đó khả năng sống của *M. elsdenii* trong sản phẩm sẽ giảm đáng kể.

Trong khi patent Mỹ số 4,138,498 thảo luận chung về dạng đông khô tiềm năng chứa *M. elsdenii*, tài liệu này không đưa ra phương pháp bất kỳ sản xuất *M. elsdenii* đông khô mà có thể được sử dụng trong quy mô thương mại để khắc phục được các hạn chế thương mại vốn có. Hơn nữa, ít nhất một nhóm gần đây đã thông báo rằng vi sinh vật đông khô, bao gồm các vi khuẩn yếm khí như *M. elsdenii*, là không thiết thực về mặt thương mại. Xem, ví dụ, WO 2017/015022.

Do đó, vẫn có nhu cầu về tế bào *Megasphaera*, tế bào *Megasphaera elsdenii*, bao gồm phương pháp sản xuất các tế bào này, mà khắc phục được các hạn chế vốn có. Cũng có nhu cầu về các tế bào vi sinh vật khác, như *Bifidobacterium*, như *B. breve*, *Lactobacillus*, như *L. plantarum*, *Bifidobacterium*, như *B. animalis* subsp. *lactis*, *Pediococcus*, như *P. acidilactici*, *Lactobacillus*, như *L. casei*, *Bacillus*, như *B. subtilis*, *Saccharomyces*, như *S. boulardii* và *S. cerevisiae*, bao gồm phương pháp sản xuất chúng, mà khắc phục được các hạn chế vốn có.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô, bao gồm các bước: (a) tạo giống nuôi cấy chứa các tế bào *M. elsdenii* trong điều kiện yếm khí và môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, lactat, dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, sorbitol, manitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men và tổ hợp của chúng, (b) thu hoạch tế bào trong điều kiện yếm khí, (c) đông lạnh các tế bào, và (d) đông khô các tế bào, trong đó khoảng 1×10^3 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô được tạo ra.

Theo các phương án nhất định, ít nhất hai nguồn cacbon chứa khoảng 50-90% là nguồn cacbon thứ nhất và khoảng 10-50% là nguồn cacbon thứ hai, trong đó nguồn cacbon thứ hai khác với nguồn cacbon thứ nhất, và trong đó 100% là của ít nhất hai nguồn cacbon chứa nguồn cacbon thứ nhất và nguồn cacbon thứ hai.

Sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô, chứa: (a) tạo giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng, (b) thu hoạch tế bào trong điều kiện yếm khí trong vòng 12 giờ sau khi giống nuôi cấy kết thúc pha sinh trưởng theo cấp số nhân của nó và trước khi giống nuôi cấy bắt đầu pha sinh trưởng ổn định của nó, (c) đông lạnh các tế bào, và (d) đông khô các tế bào, trong đó các tế bào *M. elsdenii* đông khô được tạo ra.

Theo các phương án nhất định, việc thu hoạch bao gồm ít nhất một kỹ thuật được chọn từ nhóm gồm: ly tâm, lọc, thẩm tách, thẩm thấu ngược, và tổ hợp của chúng. Theo các phương án nhất định, việc lọc bao gồm lọc dòng tiếp tuyến.

Theo các phương án nhất định, môi trường nuôi cấy chứa chất lỏng, và trong đó việc thu hoạch bao gồm việc loại bỏ khoảng 60% đến khoảng 100% chất lỏng.

Theo các phương án nhất định, việc đông lạnh thực hiện ở nhiệt độ khoảng -80 °C đến khoảng -210 °C.

Sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô, bao gồm các bước: (a) tạo giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng, (b) thu hoạch tế bào, (c) đông lạnh các tế bào ở nhiệt độ khoảng -80 °C đến khoảng -210 °C trong vòng 5 giờ thu hoạch, và (d) đông khô các tế bào, trong đó tế bào *M. elsdenii* đông khô được tạo ra.

Theo các phương án nhất định, việc đông lạnh bao gồm việc cho vật chứa chứa tế bào *M. elsdenii* tiếp xúc với nitơ lỏng.

Theo các phương án nhất định, việc đông lạnh bao gồm việc cho tế bào tiếp xúc với nitơ lỏng.

Theo các phương án nhất định, việc đông lạnh được thực hiện ở nhiệt độ khoảng -196°C và tạo ra các viên tế bào đông lạnh, và trong đó đường kính của các viên đông lạnh này là khoảng 0,001 đến khoảng 0,5 in-xơ.

Theo các phương án nhất định, độ pH của môi trường nuôi cấy *M. elsdenii* trước khi thu hoạch nằm trong khoảng 4,5 đến khoảng 7,0.

Theo các phương án nhất định, khoảng 1×10^3 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ từ khoảng 25°C trong ít nhất 2 tuần.

Theo các phương án nhất định, khoảng 1×10^3 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở khoảng 4°C trong ít nhất 1 tháng.

Theo các phương án nhất định, giống nuôi cấy còn chứa ít nhất một chất bảo quản đông lạnh.

Theo các phương án nhất định, ít nhất một chất bảo quản đông lạnh được chọn từ nhóm gồm: fructoza, glucoza, sucroza, bột sữa, chế phẩm dạng công thức dùng cho nhũ nhi, sữa tách béo, trehaloza, maltodextrin, betain, và tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, ít nhất một chất bảo quản đông lạnh có mặt với lượng từ khoảng 1% đến khoảng 20% (khối lượng/thể tích) của giống nuôi cấy.

Theo các phương án nhất định, *M. elsdenii* đông khô được sản xuất trên quy mô công nghiệp.

Theo các phương án nhất định, thể tích của giống nuôi cấy ít nhất là khoảng 50 lít.

Theo các phương án nhất định, khoảng 1×10^3 đến 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* sống được sau khi đông khô.

Theo các phương án nhất định, tế bào trong giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii*.

Sáng chế hướng đến chất phụ gia thực phẩm dạng rắn chứa tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên.

Theo các phương án nhất định, chất phụ gia thực phẩm dạng rắn còn chứa vi sinh vật khác.

Theo các phương án nhất định, chất phụ gia thực phẩm dạng rắn được chọn từ nhóm gồm: bột, viên cốm, hạt, viên, bánh, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, chất phụ gia thực phẩm dạng rắn là probiotic.

Sáng chế hướng đến chế phẩm chứa tế bào *M. elsdenii* đồng khô được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên hoặc bất kỳ trong số các chất phụ gia thực phẩm dạng rắn.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm là viên nang.

Sáng chế hướng đến bộ kit chứa tế bào *M. elsdenii* đồng khô được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, hoặc bất kỳ trong số chất phụ gia thực phẩm dạng rắn nêu trên, hoặc bất kỳ trong số các chế phẩm nêu trên.

Sáng chế hướng đến phương pháp dùng tế bào *M. elsdenii* cho động vật, bao gồm việc dùng cho động vật tế bào *M. elsdenii* đồng khô được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, chất phụ gia bất kỳ trong số các chất phụ gia thực phẩm dạng rắn nêu trên, hoặc chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm nêu trên.

Sáng chế hướng đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh hoặc rối loạn liên quan đến việc sản xuất axit lactic trong ống dạ dày-ruột của động vật, bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii* đồng khô được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, chất phụ gia bất kỳ trong số các chất phụ gia thực phẩm dạng rắn nêu trên, hoặc chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm nêu trên.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là chứng nhiễm toan.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là chứng nhiễm toan dạ cỏ.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh hô hấp.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh viêm móng ngựa.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh lây nhiễm.

Theo các phương án nhất định, bệnh lây nhiễm là lây nhiễm *Salmonella* hoặc *Campylobacter*.

Sáng chế hướng đến phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm sự sinh trưởng của vi sinh vật cơ hội trong ống dạ dày-ruột của động vật, bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, bất kỳ trong số các chất phụ gia thực phẩm dạng rắn nêu trên, hoặc bất kỳ trong số các chế phẩm nêu trên.

Theo các phương án nhất định, vi sinh vật cơ hội là có khả năng gây bệnh.

Theo các phương án nhất định, vi sinh vật cơ hội là *Salmonella* hoặc *Campylobacter*.

Sáng chế hướng đến phương pháp cải thiện độ sinh khả dụng của phospho có nguồn gốc thực vật trong chế độ ăn của động vật, bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, các chất phụ gia bất kỳ trong số các chất phụ gia thực phẩm dạng rắn nêu trên, hoặc các chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm nêu trên.

Sáng chế hướng đến phương pháp cải thiện hiệu suất sinh trưởng ở động vật, bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, chất phụ gia bất kỳ trong số các chất phụ gia thực phẩm dạng rắn nêu trên, hoặc các chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm nêu trên, trong đó hiệu suất sinh trưởng được cải thiện ở động vật là việc cải thiện: mức hấp thu thức ăn, mức tăng cân trung bình hàng ngày, chỉ số chuyển hóa thức ăn, mức tăng thân thịt, mức sản xuất sữa ở động vật sản xuất sữa, mức sản xuất trứng ở gia cầm, mức khoáng hóa xương, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, tế bào *M. elsdenii* đông khô, chất phụ gia thực phẩm dạng rắn, hoặc chế phẩm được dùng trước khi, đồng thời với, hoặc sau khi cho động vật ăn thức ăn.

Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc trộn tế bào *M. elsdenii* đông khô hoặc chất phụ gia thực phẩm dạng rắn với chất lỏng trước khi dùng.

Theo các phương án nhất định, chất lỏng được dùng qua đường uống hoặc bằng cách phun chất lỏng này lên cơ thể động vật.

Theo các phương án nhất định, việc dùng bao gồm một lần dùng tế bào *M. elsdenii*, chất phụ gia thực phẩm, hoặc chế phẩm.

Theo các phương án nhất định, việc dùng bao gồm việc dùng hàng ngày tế bào *M. elsdenii*, chất phụ gia thực phẩm, hoặc chế phẩm.

Theo các phương án nhất định, việc dùng bao gồm nhiều hơn một lần dùng tế bào *M. elsdenii*, chất phụ gia thực phẩm, hoặc chế phẩm trong một ngày.

Theo các phương án nhất định, động vật là động vật nhai lại.

Theo các phương án nhất định, động vật nhai lại được chọn từ nhóm gồm: gia súc, cừu, dê, nai, trâu, và tuần lộc.

Theo các phương án nhất định, động vật là động vật không nhai lại.

Theo các phương án nhất định, động vật không nhai lại được chọn từ nhóm gồm: ngựa, gia cầm, và lợn.

Theo các phương án nhất định, động vật là động vật gia cầm.

Theo các phương án nhất định, động vật gia cầm được chọn từ nhóm gồm: gà, ngỗng, vịt, chim cú, gà tây, hoặc chim bồ câu.

Theo các phương án nhất định, động vật gia cầm được chọn từ nhóm gồm: gà hướng thịt, gà sinh sản hướng thịt, và gà sinh sản hướng trứng.

Theo các phương án nhất định, động vật gia cầm là gà.

Theo các phương án nhất định, động vật là ngựa.

Theo các phương án nhất định, ngựa là ngựa, ngựa pony, lừa, hoặc la.

Sáng chế hướng đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh hoặc rối loạn đi kèm với việc sản xuất axit lactic trong ống dạ dày-ruột của động vật gia cầm, bao gồm việc dùng cho động vật gia cầm một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii*.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là chứng nhiễm toan.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh hô hấp.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh lây nhiễm.

Theo các phương án nhất định, bệnh lây nhiễm là lây nhiễm *Salmonella* hoặc *Campylobacter*.

Sáng chế hướng đến phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm sự sinh trưởng của vi sinh vật cơ hội trong ống dạ dày-ruột của động vật gia cầm, bao gồm việc dùng cho động vật gia cầm một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii*.

Theo các phương án nhất định, vi sinh vật cơ hội là mầm bệnh

Theo các phương án nhất định, vi sinh vật cơ hội là *Salmonella* hoặc *Campylobacter*.

Sáng chế hướng đến phương pháp cải thiện độ sinh khả dụng của phospho có nguồn gốc thực vật trong chế độ ăn của động vật gia cầm, bao gồm việc dùng cho động vật gia cầm một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii*.

Sáng chế hướng đến phương pháp cải thiện hiệu suất sinh trưởng ở động vật gia cầm, bao gồm việc dùng cho động vật gia cầm một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii*, trong đó hiệu suất sinh trưởng được cải thiện ở động vật là cải thiện về: mức hấp thu thức ăn, mức tăng cân trung bình hàng ngày, chỉ số chuyển hóa thức ăn, mức tăng thân thịt, mức sản xuất trứng, mức khoáng hóa xương, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, động vật gia cầm được chọn từ nhóm gồm: gà, ngỗng, vịt, chim cút, gà tây, hoặc chim bồ câu.

Theo các phương án nhất định, động vật gia cầm được chọn từ nhóm gồm: gà hướng thịt, gà sinh sản hướng thịt, và gà sinh sản hướng trứng.

Theo các phương án nhất định, động vật gia cầm là gà.

Sáng chế hướng đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh hoặc rối loạn đi kèm với việc sản xuất axit lactic trong ống dạ dày-ruột của ngựa, bao gồm việc dùng cho ngựa một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii*.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là chứng nhiễm toan.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh hô hấp.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh viêm móng ngựa.

Theo các phương án nhất định, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh lây nhiễm.

Theo các phương án nhất định, bệnh lây nhiễm là lây nhiễm *Salmonella* hoặc *Campylobacter*.

Sáng chế hướng đến phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm sự sinh trưởng của vi sinh vật cơ hội trong ống dạ dày-ruột của ngựa, bao gồm việc dùng cho ngựa một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii*.

Theo các phương án nhất định, vi sinh vật cơ hội là mầm bệnh.

Theo các phương án nhất định, vi sinh vật cơ hội là *Salmonella* hoặc *Campylobacter*.

Sáng chế hướng đến phương pháp cải thiện độ sinh khả dụng của phospho có nguồn gốc thực vật trong chế độ ăn của ngựa, bao gồm việc dùng cho ngựa một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii*.

Sáng chế hướng đến phương pháp cải thiện hiệu suất sinh trưởng ở ngựa, bao gồm việc dùng cho ngựa một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii*, trong đó hiệu suất sinh trưởng được cải thiện ở động vật là cải thiện về: mức hấp thu thức ăn, mức tăng cân trung bình hàng ngày, chỉ số chuyển hóa thức ăn, mức tăng thân thịt, mức sản xuất sữa, mức khoáng hóa xương, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, ngựa là ngựa, ngựa pony, lừa, hoặc la.

Theo các phương án nhất định, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *M. elsdenii*.

Theo các phương án nhất định, chất phụ gia thực phẩm là bột, viên cơm, hạt, viên, bánh, chất lỏng, gel, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa tế bào *M. elsdenii* hoặc chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm là viên nang.

Theo các phương án nhất định, tế bào *M. elsdenii* là tế bào đông khô.

Theo các phương án nhất định, tế bào *M. elsdenii* được dùng ở dạng lỏng.

Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc tái hydrat hóa chất phụ gia thực phẩm hoặc tế bào đông khô để tạo ra dạng lỏng.

Theo các phương án nhất định, chất lỏng được dùng dưới dạng chế phẩm dùng qua đường uống hoặc bằng cách phun chất lỏng này lên động vật.

Theo các phương án nhất định, tế bào *M. elsdenii* được dùng trước khi, đồng thời với, hoặc sau khi cho động vật ăn thức ăn.

Theo các phương án nhất định, việc dùng bao gồm một lần dùng tế bào *M. elsdenii*.

Theo các phương án nhất định, việc dùng bao gồm việc dùng hàng ngày tế bào *M. elsdenii*.

Theo các phương án nhất định, việc dùng bao gồm nhiều hơn một lần dùng tế bào *M. elsdenii* trong một ngày.

Sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera* đông khô được bao nang, bao gồm các bước: (a) tạo giống nuôi cấy trong điều kiện yếm khí chứa tế bào *Megasphaera* và môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, lactat, dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, manitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men, và tổ hợp của chúng, (b) thu hoạch tế bào trong điều kiện yếm khí, (c) đông lạnh các tế bào, (d) đông khô các tế bào, và (e) bao nang các tế bào, trong đó khoảng 1×10^3 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *Megasphaera* đông khô được bao nang được tạo ra.

Theo các phương án nhất định, phương pháp bao gồm dùng cho động vật tế bào *Megasphaera* đông khô được bao nang.

Theo các phương án nhất định, phương pháp cải thiện hiệu suất sinh trưởng ở động vật bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *Megasphaera* đông khô được bao nang.

Theo các phương án nhất định, hiệu suất sinh trưởng được cải thiện ở động vật là cải thiện về: mức hấp thu thức ăn, mức tăng cân trung bình hàng ngày, chỉ số chuyển hóa thức ăn, mức tăng thân thịt, mức sản xuất sữa ở động vật sản xuất sữa, mức sản xuất trứng ở gia cầm, mức khoáng hóa xương, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm sự sinh trưởng của vi sinh vật cơ hội trong ống dạ dày-ruột của động vật, bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *Megasphaera* đông khô được bao nang.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa tế bào *Megasphaera* đông khô được bao nang.

Sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô, chứa: (a) tạo giống nuôi cấy trong điều kiện yếm khí hoặc điều kiện yếm khí một phần chứa tế bào vi khuẩn yếm khí và môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, lactat, dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, manitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men, và tổ hợp của chúng, (b) thu hoạch tế bào trong điều kiện yếm khí hoặc điều kiện yếm khí một phần, (c) đông lạnh các tế bào, và (d) đông khô các tế bào, trong đó khoảng 1×10^3 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được tạo ra.

Theo các phương án nhất định, phương pháp bao gồm dùng cho động vật tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô.

Theo các phương án nhất định, phương pháp cải thiện hiệu suất sinh trưởng ở động vật bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô.

Theo các phương án nhất định, hiệu suất sinh trưởng được cải thiện ở động vật là cải thiện về: mức hấp thu thức ăn, mức tăng cân trung bình hàng ngày, chỉ số chuyển hóa thức ăn, mức tăng thân thịt, mức sản xuất sữa ở động vật sản xuất sữa, mức sản xuất trứng ở gia cầm, mức khoáng hóa xương, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm sự sinh trưởng của vi sinh vật cơ hội trong ống dạ dày-ruột của động vật bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô.

Sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được bao nang, bao gồm các bước: (a) tạo giống nuôi cấy trong điều kiện yếm khí hoặc điều kiện yếm khí một phần chứa tế bào vi khuẩn yếm khí và môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, lactat, dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, manitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men, và tổ hợp của chúng, (b) thu hoạch tế bào trong điều kiện yếm khí hoặc điều kiện yếm khí một phần, (c) đông lạnh các tế bào, (d) đông khô các tế bào, và (e) bao nang các tế bào, trong đó khoảng 1×10^3 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được bao nang được tạo ra.

Theo các phương án nhất định, phương pháp bao gồm dùng cho động vật tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được bao nang.

Theo các phương án nhất định, phương pháp cải thiện hiệu suất sinh trưởng ở động vật bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được bao nang.

Theo các phương án nhất định, hiệu suất sinh trưởng được cải thiện ở động vật là cải thiện về: mức hấp thu thức ăn, mức tăng cân trung bình hàng ngày, chỉ số chuyển hóa thức ăn, mức tăng thân thịt, mức sản xuất sữa ở động vật sản xuất sữa, mức sản xuất trứng ở gia cầm, mức khoáng hóa xương, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm sự sinh trưởng của vi sinh vật cơ hội trong ống dạ dày-ruột của động vật bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được bao nang.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được bao nang.

Sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc nấm men đông khô, bao gồm các bước: (a) tạo giống nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí chứa tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men và môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, lactat, dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, manitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men, và tổ hợp của chúng, (b) thu hoạch tế bào, (c) đông lạnh các tế bào, và (d) đông khô các tế bào, trong đó khoảng 1×10^3 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc nấm men đông khô được tạo ra.

Theo các phương án nhất định, phương pháp bao gồm bước dùng cho động vật tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men đông khô.

Theo các phương án nhất định, phương pháp cải thiện hiệu suất sinh trưởng ở động vật bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men đông khô.

Theo các phương án nhất định, hiệu suất sinh trưởng được cải thiện ở động vật là cải thiện về: mức hấp thu thức ăn, mức tăng cân trung bình hàng ngày, chỉ số chuyển hóa thức ăn, mức tăng thân thịt, mức sản xuất sữa ở động vật sản xuất sữa, mức sản xuất trứng ở gia cầm, mức khoáng hóa xương, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm sự sinh trưởng của vi sinh vật cơ hội trong ống dạ dày-ruột của động vật bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men đông khô.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men đông khô.

Sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men đông khô được bao nang, bao gồm các bước: (a) tạo giống nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí chứa tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men và môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, lactat, dextroza,

fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, manitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men, và tổ hợp của chúng, (b) thu hoạch tế bào trong điều kiện hiếu khí, (c) đông lạnh các tế bào, (d) đông khô các tế bào, và (e) bao nang các tế bào, trong đó khoảng 1×10^3 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men đông khô được bao nang được tạo ra.

Theo các phương án nhất định, phương pháp bao gồm bước dùng cho động vật tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men đông khô được bao nang.

Theo các phương án nhất định, phương pháp cải thiện hiệu suất sinh trưởng ở động vật bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men đông khô được bao nang.

Theo các phương án nhất định, hiệu suất sinh trưởng được cải thiện ở động vật là cải thiện về: mức hấp thu thức ăn, mức tăng cân trung bình hàng ngày, chỉ số chuyển hóa thức ăn, mức tăng thân thịt, mức sản xuất sữa ở động vật sản xuất sữa, mức sản xuất trứng ở gia cầm, mức khoáng hóa xương, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm sự sinh trưởng của vi sinh vật cơ hội trong ống dạ dày-ruột của động vật bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men đông khô được bao nang.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men đông khô được bao nang.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản đến khả năng sống của giống nuôi cấy lỏng của *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 trong khoảng thời gian 28 ngày về mặt hiệu suất tế bào *M. elsdenii* tính theo đơn vị tạo khuẩn lạc trên ml ("CFU/mL") theo thang đo logarit ("Log10").

FIG. 2 thể hiện khả năng sống của giống nuôi cấy lỏng của *M. elsdenii* NCIMB 41125 sau 0, 7, 14, 21, và 28 ngày bảo quản ở nhiệt độ trong phòng về mặt hiệu suất tế bào *M. elsdenii* tính theo CFU/mL theo thang đo Log10.

FIG. 3 thể hiện biểu đồ hệ thống lọc dòng tiếp tuyến ("TFF").

FIG. 4 thể hiện hiệu suất tế bào *M. elsdenii* tính theo CFU/mL của phần cô đặc trên trực y theo thang đo Log10 sau khi xử lý qua hệ thống TFF. Trục x chỉ ra độ giảm thể tích 70%, 80%, hoặc 90% nhờ hệ thống này. "Đích" chỉ mức độ thu hồi tế bào *M. elsdenii* theo lý thuyết sau khi xử lý TFF. "Thể đặc" chỉ mức độ thu hồi tế bào *M. elsdenii* thực tế trong phần cô đặc, tức là thể tích tế bào được cô còn lại sau khi giảm thể tích như đã lưu ý.

FIG. 5 thể hiện tỷ lệ tổn thất tế bào sau khi đông lạnh tế bào ở -80°C hoặc trong nitơ lỏng (LiqN) và đông khô tế bào bằng cách sử dụng chu trình chậm (38 giờ ở 135 mTorr) hoặc nhanh (18,5 giờ ở 250 mTorr). Tế bào từ phần cô đặc của giống nuôi cấy sau khi giảm 70%, 80%, hoặc 90% thể tích bằng TFF có 8% maltodextrin/15% sữa tách béo (M/SM) hoặc 8% trehaloza/15% sữa tách béo (T/SM) dưới dạng chất bảo quản đông lạnh.

FIG. 6 thể hiện hiệu suất tế bào *M. elsdenii* NCIMB 41125 sau khi đông lạnh nhanh ban đầu (nitơ lỏng) hoặc đông lạnh chậm (-20 °C) sau đó đông khô (với sự có mặt của 15% maltodextrin và 0% hoặc 7,5% trehaloza).

FIG. 7 thể hiện mức độ tổn thất tế bào quan sát được với tế bào *M. elsdenii* NCIMB 41125 đông lạnh với hoặc không với 4% trehaloza hoặc 7,5% sữa tách béo ở -80°C hoặc trong nitơ lỏng (LiqN).

FIG. 8 thể hiện mức độ tổn thất tế bào quan sát được trên mẫu đông khô thu được từ phần cô đặc sau khi giảm 90% thể tích, được trộn với 8% trehaloza/15% sữa tách béo (T/SM) hoặc 8% maltodextrin/15% sữa tách béo (M/SM), đông lạnh ở -80°C hoặc trong nitơ lỏng (LiqN), và đông khô bằng chu trình nhanh và bảo quản ở nhiệt độ trong phòng hoặc 4°C trong điều kiện yếm khí trong không quá 24 tuần.

FIG. 9 thể hiện mức độ tổn thất tế bào quan sát được trên mẫu đông khô thu được từ phần cô đặc sau khi giảm thể tích 90%, được trộn với 8% trehaloza/15% sữa tách béo (T/SM) hoặc 8% maltodextrin/15% sữa tách béo (M/SM), đông lạnh ở -80°C hoặc trong nitơ lỏng (LiqN), và đông khô bằng chu trình nhanh và bảo quản ở nhiệt độ trong phòng

hoặc 4°C trong điều kiện yếm khí trong 24 tuần. Các cột không có chỉ số trên giống nhau là khác nhau về mặt thống kê, $P < 0,02$.

FIG. 10 thể hiện đường cong sinh trưởng được thực hiện trên sản phẩm đông khô hoặc sản phẩm đông khô đã tái hydrat hóa thu được từ phần cô đặc sau khi giảm thể 90% thể tích, được trộn với 8% trehaloza/15% sữa tách béo (T/SM) hoặc 8% maltodextrin/15% sữa tách béo (M/SM), đông lạnh trong nitơ lỏng (LiqN), và đông khô bằng chu trình nhanh sau 12, 16, 20 hoặc 24 tuần bảo quản trong điều kiện yếm khí ở 4 hoặc 25°C. Mật độ quang (OD) được thể hiện ở 600 nanomet (nm) như đo được từ 0 giờ đến 20 giờ. Đường màu vàng = không đông khô, đường màu đỏ = T/SM, đường màu xanh dương = M/SM, nét đứt = bảo quản ở 4°C, và nét liền = bảo quản ở 25°C.

FIG. 11 thể hiện *M. elsdenii* theo CFU trong một gam ("CFU/g") theo thang đo Log10 từ các lọ đông khô bảo quản ở 4°C trong không quá 11 tháng. Mỗi điểm dữ liệu tương ứng với hiệu suất trung bình của 3 lọ từ 2 lần chạy đông khô khác nhau (tổng số 6 lọ).

FIG. 12 thể hiện thể đặc *M. elsdenii* (CFU/đầu/ngày) trong sản phẩm đông khô được cung cấp hàng ngày dưới dạng chế phẩm rắc trộn bề mặt (tức là, chế phẩm điều trị bổ sung vào thức ăn cho động vật bằng cách trộn chế phẩm điều trị vào thức ăn hoặc đặt chế phẩm điều trị lên trên thức ăn). Tuần lấy mẫu được thể hiện trên trục x, hiệu quả lấy mẫu, $P < 0,0001$. Đường liền nằm ngang thể hiện thể đặc *M. elsdenii* đích (CFU/đầu/ngày) cần được phân phối hàng ngày.

FIG. 13 thể hiện thể đặc *M. elsdenii* trong thức ăn ngô nghiền với sản phẩm đông khô được đặt lên trên và để cho tiếp xúc với điều kiện môi trường trong 0 đến 4 giờ trong phòng thí nghiệm ở nhiệt độ trong phòng mà không cho tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời (trong nhà) hoặc ngoài trời ở nhiệt độ trung bình hàng ngày không quá 95 °F có tiếp xúc với ánh sáng mặt trời trực tiếp (ngoài trời). Tác dụng kết hợp của thời gian tiếp xúc và điều kiện bảo quản, $P = 0,0007$; Tác dụng của thời gian tiếp xúc, $P < 0,0001$; tác dụng của điều kiện bảo quản, $P < 0,0001$.

FIG. 14 thể hiện nồng độ nội độc tố (EU/mL) trong mẫu dịch dạ cỏ (đo được làm chỉ thị chỉ sự phân giải của vi khuẩn trong dạ cỏ) thu được 26 giờ sau khi cho ăn lần đầu

đối với mỗi nhóm: Nhóm đối chứng (không được cho dùng *M. elsdenii*), nhóm không đông khô (được cho dùng 50 mL giống nuôi cấy lỏng *M. elsdenii* lỏng chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*), nhóm tái hydrat hóa (được cho dùng giống nuôi cấy đông khô được tái hydrat hóa ngay trước khi dùng, chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*), và nhóm rắc trộn bề mặt (được cho dùng giống nuôi cấy đông khô đã tái hydrat hóa ngay trước khi dùng, chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*, và cũng được cho dùng sản phẩm *M. elsdenii* đông khô được kết hợp làm chế phẩm rắc trộn bề mặt hằng ngày chứa 10^8 CFU *M. elsdenii*). Hiệu quả của điều trị, $P = 0,3462$.

FIG. 15 thể hiện độ pH dạ cỏ đo được tại các thời điểm cách nhau 1 giờ đối với từng nhóm: Nhóm đối chứng (không được cho dùng *M. elsdenii*), nhóm không đông khô (được cho dùng 50 mL giống nuôi cấy lỏng *M. elsdenii* chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*), nhóm tái hydrat hóa (được cho dùng giống nuôi cấy đông khô được tái hydrat hóa ngay trước khi dùng, chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*), và nhóm rắc trộn bề mặt (được cho dùng giống nuôi cấy đông khô được tái hydrat hóa ngay trước khi dùng, chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*, và được cho dùng sản phẩm *M. elsdenii* đông khô được kết hợp làm chế phẩm rắc trộn bề mặt hằng ngày chứa 10^8 CFU *M. elsdenii*). Hiệu quả kết hợp của điều trị và ngày, $P < 0,001$, hiệu quả điều trị, $P < 0,001$, hiệu quả của ngày, $P < 0,001$. Sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM) = 0,041.

FIG. 16 thể hiện các thay đổi về mật độ quang ở 600 nm của môi trường lactat bán xác định được cấy dịch dạ cỏ đối với từng nhóm: nhóm đối chứng (không được cho dùng *M. elsdenii*), nhóm không đông khô (được cho dùng 50 mL giống nuôi cấy lỏng *M. elsdenii* chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*), nhóm tái hydrat hóa (được cho dùng giống nuôi cấy đông khô được tái hydrat hóa ngay trước khi dùng, chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*), và nhóm rắc trộn bề mặt (được cho dùng giống nuôi cấy đông khô được tái hydrat hóa ngay trước khi dùng, chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*, và còn được cho dùng sản phẩm *M. elsdenii* đông khô được kết hợp làm chế phẩm rắc trộn bề mặt hằng ngày chứa 10^8 CFU *M. elsdenii*). Hiệu quả kết hợp của điều trị và thời gian, $P < 0,02$; hiệu quả của điều trị, $P < 0,01$; hiệu quả của thời gian, $P < 0,01$. SEM = 0,04.

FIG. 17 thể hiện các thay đổi về nồng độ L-lactat (mM) của môi trường lactat bán xác định được cấy các vi sinh vật dạ cỏ hỗn hợp đối với từng nhóm: nhóm đối chứng (không được cho dùng *M. elsdenii*), nhóm không đông khô (được cho dùng 50 mL giống

nuôi cấy lỏng *M. elsdenii* chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*), nhóm tái hydrat hóa (được cho dùng giống nuôi cấy đông khô được tái hydrat hóa ngay trước khi dùng, chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*), và nhóm rắc trộn bề mặt (được cho dùng giống nuôi cấy đông khô được tái hydrat hóa ngay trước khi dùng, chứa 10^{10} CFU *M. elsdenii*, và còn được cho dùng sản phẩm *M. elsdenii* đông khô được kết hợp làm chế phẩm rắc trộn bề mặt hằng ngày chứa 10^8 CFU *M. elsdenii*). Các vạch^{a,b,c} với các chỉ số trên khác nhau là khác nhau về mặt thống kê, $P < 0,05$.

FIG. 18 thể hiện hoạt tính phytaza trong tế bào *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125. Trục x chỉ ra các mẫu tế bào thu được từ giống nuôi cấy tế bào *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 từ thời điểm bắt đầu nuôi cấy ("0" giờ) và tại các thời điểm cách nhau 2 giờ sau đó, tức là, ở 2, 4, 6, và 8 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. Hoạt tính phytaza được thể hiện trên trục y dưới dạng lượng phospho vô cơ được giải phóng từ các viên tế bào của mẫu tính theo micromol trên phút (" $\mu\text{mol P}$ được giải phóng/phút"). Hoạt tính phytaza trong tế bào được nuôi cấy trong môi trường chứa phosphat vô cơ (KH_2PO_4) được thể hiện bằng màu xám nhạt, trong khi đó hoạt tính phytaza trong tế bào được nuôi cấy trong môi trường chứa phytat được thể hiện bằng màu xám đậm.

FIG. 19 thể hiện tác dụng của *Megasphaera elsdenii* đến nồng độ *Salmonella* trong mẫu manh tràng từ gà hướng thịt 15 ngày tuổi. Trục x chỉ ra chế phẩm điều trị không chứa *Megasphaera elsdenii* ("đối chứng"), tự do tiếp cận các chai cho ăn chứa chất lỏng *Megasphaera elsdenii* tùy thích ("tùy thích"), *Megasphaera elsdenii* đông khô hằng ngày ("đông khô"), hoặc dùng qua đường miệng *Megasphaera elsdenii* lỏng vào ngày 0. Trục y chỉ ra nồng độ *Salmonella* theo đơn vị tạo khuẩn lạc trên mililit (CFU/mL) theo thang đo Log10 đối với các nhóm điều trị.

FIG. 20 thể hiện tần suất xuất hiện của *Salmonella* trong mẫu manh tràng của gà hướng thịt 15 ngày tuổi. Trục x thể hiện các nhóm điều trị. Trục y chỉ ra tỷ lệ phần trăm mẫu manh tràng dương tính với *Salmonella*.

FIG. 21 thể hiện tỷ lệ thức ăn so với mức tăng trọng (trục y) ở gà hướng thịt 18 ngày tuổi không được cho dùng *Megasphaera* ("đối chứng") hoặc được cho dùng

Megasphaera elsdenii đông khô ("đông khô"). Tỷ lệ thức ăn so với mức tăng trọng là tỷ lệ giữa tổng lượng thức ăn tiêu thụ so với tổng khối lượng đạt được.

FIG. 22 thể hiện độ pH của mẫu manh tràng từ ngựa không được cho dùng *Megasphaera elsdenii* ("đối chứng"), cho dùng thuốc nước dùng qua đường uống *Megasphaera elsdenii* qua đường miệng ("thuốc nước ") vào ngày 1 trong mỗi khoảng thời gian điều trị 7 ngày, hoặc cho dùng *Megasphaera elsdenii* đông khô ("đông khô").

FIG. 23 thể hiện sự sinh trưởng của chủng *M. elsdenii* (NCIMB 41125, ATCC 25940, NCIMB 702261, NCIMB 702262, và NCIMB 702410) trên môi trường bán xác định chứa 70% lactat và 30% glucoza.

FIG. 24 thể hiện sự sinh trưởng của chủng *M. elsdenii* (NCIMB 41125, ATCC 25940, NCIMB 702261, NCIMB 702262, và NCIMB 702410) trên môi trường bán xác định chứa 60% lactat và 40% glucoza.

FIG. 25 thể hiện sự sinh trưởng của chủng *M. elsdenii* (NCIMB 41125, ATCC 25940, NCIMB 702261, NCIMB 702262, và NCIMB 702410) trên môi trường bán xác định chứa 40% lactat và 60% glucoza.

FIG. 26 thể hiện độ ổn định của *M. elsdenii* đông khô được bao nang bằng phương pháp 2 và bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường hiếu khí.

FIG. 27 thể hiện độ ổn định của *M. elsdenii* đông khô được bao nang bằng phương pháp 3 và bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường hiếu khí.

FIG. 28 thể hiện nồng độ *M. elsdenii* NCIMB 41125 (Log10 CFU/túi) trong sản phẩm đông khô được bảo quản trong túi Mylar có (M.e. + Maltodextrin) hoặc không có maltodextrin (M.e.) ở 40 hoặc 75°F.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến tế bào *Megasphaera elsdenii*, phương pháp sản xuất tế bào *M. elsdenii*, chất phụ gia thực phẩm và chế phẩm chứa tế bào này, và việc sử dụng bao gồm sử dụng tế bào này cho động vật, bao gồm, ví dụ, để cải thiện hiệu suất sinh trưởng và/hoặc thể trạng. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào vi sinh vật, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men, và ví dụ, *Bifidobacterium*, như *B.*

breve, *Lactobacillus*, như *L. plantarum*, *Bifidobacterium*, như *B. animalis* subsp. *lactis*, *Pediococcus*, như *P. acidilactici*, *Lactobacillus*, như *L. casei*, *Bacillus*, như *B. subtilis*, *Saccharomyces*, như *S. boulardii* và *S. cerevisiae*, và phương pháp sản xuất tế bào vi sinh vật, chất phụ gia thực phẩm và chế phẩm chứa tế bào vi sinh vật, và việc sử dụng bao gồm sử dụng tế bào vi sinh vật này cho động vật, bao gồm, ví dụ, để cải thiện hiệu suất sinh trưởng và/hoặc thể trạng.

Tất cả các công bố, bằng sáng chế, và các tài liệu tham khảo khác được đề cập trong bản mô tả được kết hợp bằng cách tham chiếu ở trạng thái trọn vẹn của chúng cho tất cả các mục đích như khi từng công bố hoặc đơn sáng chế riêng lẻ được chỉ định cụ thể và riêng rẽ cần được kết hợp bằng cách tham chiếu. Ngoài ra, việc viện dẫn hoặc xác định tài liệu viện dẫn bất kỳ trong đơn này sẽ không được hiểu là việc công nhận tài liệu viện dẫn đó là tài liệu đối chứng đối với sáng chế.

Thuật ngữ

Trừ khi được chỉ định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Trong trường hợp có mâu thuẫn, định nghĩa theo sáng chế sẽ quyết định. Trừ khi ngữ cảnh yêu cầu, các thuật ngữ số ít sẽ bao gồm các thuật ngữ số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm các thuật ngữ số ít.

Trong phạm vi đề mục được sử dụng, các đề mục này không được hiểu là giới hạn cần thiết.

Như được sử dụng trong bản mô tả và trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít bao gồm các tham chiếu số nhiều trừ khi ngữ cảnh rõ ràng chỉ định khác. Ví dụ, thuật ngữ "hợp chất" hoặc "ít nhất một hợp chất" có thể bao gồm nhiều hợp chất, bao gồm hỗn hợp của chúng. Thuật ngữ "một", "một hoặc nhiều", và "ít nhất một" ví dụ, có thể được sử dụng thay đổi cho nhau trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "khoảng", khi được sử dụng để bỏ nghĩa cho lượng liên quan đến sáng chế, thuật ngữ này chỉ sự thay đổi về lượng tính bằng số mà có thể xảy ra, ví dụ, thông qua việc thử nghiệm và thao tác thông thường; thông qua sai sót không cố ý trong việc thử nghiệm và thao tác như vậy; thông qua các sai khác trong

sản xuất, nguồn, hoặc độ tinh khiết của các thành phần được sử dụng trong sáng chế; và các yếu tố tương tự. Bất kể khi không được hoặc được bỏ nghĩa bởi thuật ngữ "khoảng", các điểm yêu cầu bảo hộ bao gồm các giá trị tương đương của lượng được nêu. Theo một số phương án, thuật ngữ "khoảng" nghĩa là cộng hoặc trừ 10% của giá trị số được thông báo.

Trong toàn bộ sáng chế, các phương án khác nhau theo sáng chế có thể được trình bày ở dạng khoảng. Cần hiểu rằng phần mô tả ở dạng khoảng chỉ là để thuận tiện và ngắn gọn và không được hiểu là giới hạn cứng đối với phạm vi của sáng chế. Theo đó, phần mô tả về khoảng cần được xem là đã bộc lộ cụ thể tất cả các khoảng nhỏ có thể có cũng như các giá trị số riêng rẽ nằm trong khoảng này. Ví dụ, phần mô tả về khoảng, như từ 1 đến 6 cần được xem là đã bộc lộ cụ thể các khoảng nhỏ như từ 1 đến 2, từ 1 đến 3, từ 1 đến 4, từ 1 đến 5, từ 2 đến 3, từ 2 đến 4, từ 2 đến 5, từ 2 đến 6, từ 3 đến 4, từ 3 đến 5, từ 3 đến 6, v.v., cũng như các số riêng rẽ nằm trong khoảng này, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, và 6. Quy định này được áp dụng không phụ thuộc vào độ rộng của khoảng.

Các thuật ngữ "có chứa", "chứa", "gồm", "gồm có", "có", và các từ cùng gốc của chúng được dùng thay đổi cho nhau và nghĩa là "bao gồm nhưng không bị giới hạn ở". Cần hiểu rằng khi các khía cạnh được mô tả trong bản mô tả bằng thuật ngữ "chứa", các khía cạnh tương tự khác được mô tả theo thuật ngữ "bao gồm" và/hoặc "chủ yếu bao gồm" cũng được đưa ra.

Thuật ngữ "bao gồm" nghĩa là "gồm những không bị giới hạn ở".

Thuật ngữ "chủ yếu bao gồm" nghĩa là nguyên liệu cụ thể của chế phẩm, hoặc các bước cụ thể của phương pháp, và các nguyên liệu hoặc bước bổ sung mà không ảnh hưởng lớn đến các đặc tính cơ bản của nguyên liệu hoặc phương pháp.

Thuật ngữ "và/hoặc" khi được sử dụng trong bản mô tả được xem là mô tả cụ thể của từng đặc điểm hoặc thành phần trong số hai đặc điểm hoặc thành phần đã xác định cùng với hoặc không cùng với đặc điểm hoặc thành phần kia. Do đó, thuật ngữ "và/hoặc" như được sử dụng trong cụm từ như "A và/hoặc B" trong bản mô tả được dự định để bao gồm "A và B", "A hoặc B", "A" (độc lập), và "B" (độc lập). Tương tự, thuật ngữ "và/hoặc" như được sử dụng trong cụm từ như "A, B, và/hoặc C" được dự định để bao gồm từng khía

cạnh trong số các khía cạnh sau: A, B, và C; A, B, hoặc C; A hoặc C; A hoặc B; B hoặc C; A và C; A và B; B và C; A (độc lập); B (độc lập); và C (độc lập).

Thuật ngữ "nuôi cấy", và "việc nuôi cấy", như được sử dụng trong bản mô tả, nghĩa là ủ tế bào trong điều kiện *in vitro* cho phép tế bào sinh trưởng hoặc phân chia hoặc để duy trì tế bào trong trạng thái sống. Thuật ngữ "giống nuôi cấy" cũng có thể được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tế bào được ủ trong điều kiện *in vitro* (ví dụ, tế bào được ủ trong môi trường sinh trưởng lỏng).

Thuật ngữ "probiotic" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ một hoặc nhiều vi sinh vật sống (vi khuẩn và/hoặc nấm men) và có thể bao gồm hoặc không bao gồm các thành phần khác, mà khi được sử dụng với lượng vừa đủ có thể đem lại lợi ích về mặt thể trạng, tiêu hóa, và/hoặc năng suất cho động vật hoặc đối tượng.

Thuật ngữ "sản phẩm vi sinh ăn trực tiếp" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ sản phẩm chứa một hoặc nhiều vi sinh vật sống (vi khuẩn và/hoặc nấm men) và có thể bao gồm hoặc không bao gồm các thành phần khác, mà có thể được sử dụng cho động vật hoặc đối tượng trong hỗn hợp thức ăn, viên thuốc lớn, và/hoặc hoặc hồ nhão dùng đường miệng, và khi được sử dụng với lượng vừa đủ có thể đem lại lợi ích về mặt thể trạng cho động vật hoặc đối tượng.

Thuật ngữ "chất phụ gia thực phẩm" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ một hoặc nhiều thành phần, sản phẩm, hoặc chất (ví dụ, tế bào), được sử dụng riêng rẽ hoặc cùng nhau, trong dinh dưỡng (ví dụ, để cải thiện chất lượng thực phẩm (ví dụ, thức ăn cho động vật), để cải thiện năng suất và thể trạng cho động vật, và/hoặc để tăng cường khả năng tiêu hóa thực phẩm hoặc các nguyên liệu trong thực phẩm). Chất phụ gia thực phẩm có thể là, ví dụ, probiotic.

Thuật ngữ "môi trường sinh trưởng" và "môi trường nuôi cấy" như được sử dụng trong bản mô chỉ chế phẩm rắn (ví dụ, aga), bán rắn (ví dụ, aga), hoặc lỏng (ví dụ, canh thang) mà chứa các thành phần để hỗ trợ sự sinh trưởng của tế bào.

Thuật ngữ "thu hoạch" và "việc thu hoạch" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ việc thu gom tế bào từ giống nuôi cấy, ví dụ, thu gom tế bào trong môi trường sinh trưởng từ giống nuôi cấy, thu gom tế bào bằng cách loại bỏ lượng môi trường sinh trưởng khỏi tế

bào (ví dụ, bằng cách cô tể bào trong giống nuôi cấy lỏng hoặc tách tế bào khỏi môi trường sinh trưởng), hoặc ngừng việc nuôi cấy tế bào. Thuật ngữ này bao gồm thu gom hoặc loại bỏ thể tích chất lỏng chứa tế bào khỏi giống nuôi cấy lỏng, bao gồm thể tích trong đó tế bào đã được cô đặc.

Thuật ngữ "phân lập" như được sử dụng trong bản mô tả không nhất thiết phản ánh phạm vi trong đó thể phân lập được tinh chế, mà chỉ việc phân lập hoặc tách khỏi dạng tự nhiên hoặc môi trường tự nhiên. Thể phân lập có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vi sinh vật được phân lập, sinh khối được phân lập, hoặc giống nuôi cấy được phân lập.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ lượng mà đạt được kết quả mong muốn.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "lượng hữu hiệu điều trị" hoặc "lượng hữu hiệu về mặt lâm sàng" chỉ lượng, mà đạt được kết quả điều trị mong muốn, bao gồm, ví dụ, lượng được dùng riêng rẽ hoặc kết hợp với các thành phần khác. Kết quả điều trị có thể, ví dụ, làm giảm các triệu chứng, kéo dài sự sống, cải thiện khả năng vận động, và tương tự. Kết quả điều trị không cần thiết là "chữa trị".

Như được sử dụng trong bản mô tả, "tá dược" chỉ thành phần, hoặc hỗn hợp các thành phần, được dùng để tạo ra các đặc tính mong muốn cho chất phụ gia thực phẩm, thực phẩm, hoặc chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Tá dược theo sáng chế có thể được mô tả là tá dược "dược dụng" khi được bổ sung vào dược phẩm, nghĩa là tá dược là hợp chất, nguyên liệu, chế phẩm, muối, và/hoặc dạng liều mà, trong phạm vi đánh giá y tế hợp lý, thích hợp để tiếp xúc với mô của động vật (*tức là*, người và động vật không phải người) mà không gây ra độc tính, kích thích, đáp ứng dị ứng quá mức, hoặc các biến chứng nghiêm trọng khác trong khoảng thời gian tiếp xúc tương ứng với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý.

Thuật ngữ "điều trị", "việc điều trị" và "phép điều trị" chỉ cả việc điều trị và biện pháp dự phòng hoặc ngăn ngừa, trong đó mục đích là ngăn ngừa hoặc làm chậm (làm giảm) tình trạng sinh lý, bệnh, hoặc rối loạn không mong muốn, hoặc để thu được kết quả sinh lý (ví dụ, kết quả lâm sàng, y tế và/hoặc thú y) có lợi hoặc mong muốn. Đối với những mục đích của sáng chế, kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, làm thuyên giảm hoặc loại trừ các triệu chứng hoặc dấu hiệu đi kèm với tình trạng, bệnh,

hoặc rối loạn; giảm mức độ nghiêm trọng của tình trạng, bệnh, hoặc rối loạn; ổn định tình trạng, bệnh, hoặc rối loạn, (tức là, trong đó tình trạng, bệnh, hoặc rối loạn không xấu đi); làm chậm sự khởi phát hoặc tiến triển của tình trạng, bệnh, hoặc rối loạn; làm thuyên giảm tình trạng, bệnh, hoặc rối loạn; làm dịu (từng phần hoặc hoàn toàn và phát hiện được hoặc không phát hiện được) tình trạng, bệnh, hoặc rối loạn; hoặc tăng cường hoặc cải thiện tình trạng, bệnh, hoặc rối loạn. Việc điều trị bao gồm tạo ra đáp ứng đáng kể về mặt sinh lý mà không gây ra các tác dụng phụ quá mức. Việc điều trị cũng bao gồm kéo dài sự sống so với khả năng sống được dự nếu không được điều trị.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "ngăn ngừa" và "việc ngăn ngừa" chỉ việc làm chậm một phần hoặc hoàn toàn sự khởi phát của tình trạng nhiễm trùng, bệnh, rối loạn, và/hoặc tình trạng; làm chậm một phần hoặc hoàn toàn sự khởi phát của một hoặc nhiều dấu hiệu, triệu chứng, đặc tính, hoặc biểu hiện (*ví dụ*, dấu hiệu, triệu chứng, đặc tính, hoặc biểu hiện lâm sàng hoặc sinh lý) hoặc tình trạng nhiễm trùng, bệnh, rối loạn, và/hoặc tình trạng cụ thể; làm chậm một phần hoặc hoàn toàn sự tiến triển từ tình trạng nhiễm trùng, bệnh, rối loạn, và/hoặc tình trạng cụ thể; và/hoặc giảm nguy cơ phát triển bệnh lý đi kèm với tình trạng nhiễm trùng, bệnh, rối loạn, và/hoặc tình trạng bệnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "hiệu suất" chỉ lượng tế bào sống, hoặc sống được có trong thể tích cụ thể (*ví dụ*, đơn vị tạo khuẩn lạc trên mililit ("CFU/mL")) hoặc khối lượng cụ thể (*ví dụ*, CFU trên gam ("CFU/g")).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "sống được" chỉ sinh vật hoặc các sinh vật sống (*ví dụ*, tế bào vi sinh vật còn sống hoặc các tế bào vi sinh vật còn sống). "Khả năng sống" chỉ khả năng sống, cụ thể là trong các điều kiện nhất định.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "tinh chế", "được tinh chế", và "việc tinh chế" nghĩa là làm cho gần như tinh khiết hoặc không chứa các thành phần không mong muốn, tạp chất nguyên liệu, hỗn hợp hoặc dạng không hoàn chỉnh.

Thuật ngữ "sáng chế" và "bản mô tả" có thể được sử dụng thay đổi cho nhau khi mô tả hoặc được sử dụng, *ví dụ*, trong cụm từ "sáng chế này" hoặc "bản mô tả này".

Thuật ngữ "động vật" hoặc "đối tượng" chỉ sinh vật bất kỳ thuộc giới động vật và bao gồm, không bị giới hạn ở, động vật thủy sinh và động vật trên cạn như cá; cá thương

mại; cá cảnh; ấu trùng cá; loài hai mảnh vỏ; loài nhuyễn thể; loài giáp xác; loài có vỏ; tôm; ấu trùng tôm; tôm nước mặn; luân trùng; tôm ngâm nước mặn; loài ăn lọc; lưỡng cư; bò sát, động vật có vú; động vật không phải người; động vật nuôi trong nhà; động vật trang trại; động vật trong vườn thú; động vật thể thao; gia súc giống; động vật đua; động vật biểu diễn; động vật gia truyền; động vật hiếm hoặc có nguy cơ tuyệt chủng; động vật đồng hành; động vật cưng như chó, mèo, chuột lang, thỏ, chuột cống, chuột nhắt, hoặc ngựa; động vật linh trưởng như khỉ (ví dụ, khỉ cebus, khỉ vàng, khỉ xanh châu Phi, khỉ patas, khỉ cynomolgus, và khỉ Lesula), vượn người, đười ươi, khỉ đầu chó, vượn, và tinh tinh; động vật họ chó như chó và chó sói; động vật họ mèo như mèo, sư tử, và hổ; động vật họ ngựa như ngựa, ngựa pony, lừa, la, và ngựa vằn; thực phẩm động vật như bò, trâu, gia súc, lợn, gia cầm, và cừu; động vật móng guốc như nai và hươu cao cổ; động vật lông vũ (tức là, chim); gia cầm như gà, ngỗng, vịt, chim cút, gà tây, chim bồ câu, đà điểu sa mạc, đà điểu châu Phi, và chim khác bất kỳ được dùng làm thực phẩm hoặc động vật trang trại, bao gồm gà hướng thịt, gà sinh sản hướng thịt, và gà sinh sản hướng trứng; động vật gặm nhấm như chuột nhắt, chuột cống, chuột hamster và chuột lang; và các động vật tương tự. Thức ăn cho động vật bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, thức ăn cho động vật thủy sinh, thức ăn cho động vật nuôi trong nhà bao gồm thức ăn cho thú cưng, thức ăn cho động vật trong vườn thú, thức ăn cho động vật lao động, thức ăn gia súc, và tổ hợp của chúng. Thực phẩm bao gồm thức ăn cho động vật và thức ăn cho người.

Cần hiểu rằng các dấu hiệu nhất định của sáng chế, mà để cho rõ ràng được mô tả trong ngữ cảnh của các phương án riêng rẽ, cũng có thể được đưa ra kết hợp trong cùng một phương án duy nhất. Ngược lại, các dấu hiệu khác của sáng chế, mà để cho ngắn gọn được mô tả trong ngữ cảnh của cùng một phương án duy nhất, cũng có thể được đưa ra riêng rẽ hoặc theo cách kết hợp hẹp hơn thích hợp bất kỳ hoặc nếu thích hợp trong phương án được mô tả bất kỳ khác theo sáng chế. Các đặc điểm nhất định được mô tả trong ngữ cảnh của các phương án khác nhau không được xem là các đặc điểm cơ bản của các phương án đó, trừ khi phương án không thể vận hành được mà không có những yếu tố này.

Mặc dù các phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả trên thực tế có thể được sử dụng hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và vật liệu thích hợp được mô tả sau đây. Các vật liệu,

phương pháp và ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không được dự định để giới hạn. Các đặc điểm và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng qua phần mô tả chi tiết sau đây và qua các yêu cầu bảo hộ.

Megasphaera elsdenii

Tế bào *Megasphaera elsdenii* từ chủng bất kỳ hoặc tổ hợp các chủng bất kỳ có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả trong bản mô tả này.

Chủng hoặc các chủng *M. elsdenii* có thể được chọn từ bộ sưu tập giống nuôi cấy gốc (ví dụ, American Type Culture Collection ("ATCC®"), National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria ("NCIMB"), National Collection of Type Cultures ("NCTC"), bộ sưu tập giống nuôi cấy American Research Service ("ARC") (tức là, "NRRL"), bộ sưu tập giống nuôi cấy National Institute of Animal Health (NIAH)), hoặc có thể là chủng đã được phân lập từ nguồn tự nhiên (ví dụ, từ ống dạ dày-ruột của động vật nhai lại).

Ví dụ về các chủng *M. elsdenii* mà có thể được chọn từ bộ sưu tập giống nuôi cấy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các chủng được liệt kê bằng số nộp lưu trên Bảng 1. Các tên gọi khác của số nộp lưu cũng được chỉ ra.

Bảng 1. Ví dụ về các chủng *M. elsdenii* và nguồn của từng chủng.

Số nộp lưu	Tên gọi khác	Nguồn của chủng
ATCC® 25940	NCIMB 8927; BE2-2083	Dạ cỏ của cừu
ATCC® 17752	B159; NCIMB 702409; NCDO2409	N/A
ATCC® 17753	T81; NCIMB 702410; NCDO2410	N/A
NCIMB 702261	A17-2; A12-2; NCDO2261	Phân người trưởng thành
NCIMB 702262	S17-3; NCDO2262	Phân lợn con
NCIMB 702264	LC1	N/A
NCIMB 702331	LC1; NCDO2263; NCDO2264; NCDO2331;	N/A
NCIMB 41125		Dạ cỏ của bò sữa
NCIMB 41787		Dạ cỏ của bò sữa
NCIMB 41788		Dạ cỏ của bò sữa

NRRL 18624		Dạ cỏ của bò
NIAH 1102		N/A

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ chủng có số nộp lưu được chọn từ nhóm gồm: ATCC® 25940, ATCC® 17752, ATCC® 17753, NCIMB 702261, NCIMB 702262, NCIMB 702264, NCIMB 702331, NCIMB 702409, NCIMB 702410, NCIMB 41125, NCIMB 41787, NCIMB 41788, NRRL 18624, NIAH 1102, và tổ hợp của chúng, bao gồm các tên gọi khác bất kỳ trong bảng 1.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ chủng phân lập được từ động vật nhai lại (ví dụ, bò). Xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,550,139.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ chủng phân lập được từ động vật không nhai lại (ví dụ, người).

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ chủng được chọn về khả năng sử dụng lactat (ví dụ, chủng sử dụng lactat với sự có mặt của các đường), khả năng kháng kháng sinh mang ion, tốc độ sinh trưởng tương đối cao, khả năng tạo ra chủ yếu là axetat, khả năng tăng sinh ở các giá trị pH thấp hơn 5,0 và thấp tới 4,5, khả năng tạo ra các axit béo dễ bay hơi (VFA), hoạt tính phytaza, và tổ hợp của chúng. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,550,139.

Theo một số phương án, chủng được chọn về khả năng sử dụng lactat sẽ dùng lactat làm nguồn cacbon ưu tiên với sự có mặt của hydrat cacbon hòa tan (ví dụ, glucoza và/hoặc maltoza). Khả năng sử dụng lactat có thể được xác định, ví dụ, dựa vào khả năng sinh trưởng trong môi trường chứa lactat và không có các hydrat cacbon hòa tan so với môi trường cùng loại được bổ sung các hydrat cacbon hòa tan.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ chủng có tốc độ sinh trưởng cao so với các chủng khác. Tốc độ sinh trưởng của các chủng khác nhau có thể được xác định, ví dụ, bằng cách nuôi cấy tế bào trong môi trường lỏng và theo dõi sự gia tăng mật độ quang theo thời gian.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ chủng có khả năng tạo ra các VFA, mà có thể được xác định, ví dụ, bằng sắc ký khí. Theo một số phương án, VFA là axit béo 6 cacbon có khả năng ức chế sự sinh trưởng của *Salmonella* và/hoặc *Campylobacter*. Theo

một số phương án, VFA là axit caproic. Theo một số phương án, *Salmonella* là *Salmonella enterica* và/hoặc *Salmonella bongori*. Theo một số phương án, typ huyết thanh *Salmonella* là *Salmonella Typhimurium* và/hoặc *Entitritidis*. Theo một số phương án, *Campylobacter* là *Campylobacter jejuni* hoặc *Campylobacter coli*.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ chủng có hoạt tính phytaza.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ *Megasphaera elsdenii* chủng NCIMB 41125. Chủng *Megasphaera elsdenii* này có tốc độ sinh trưởng riêng cao (0,94 thế hệ/giờ), có khả năng sinh trưởng trong khoảng pH từ 4,5 đến 6,5 hoặc cao hơn, sử dụng D- và L-Lactat làm cơ chất ưu tiên, nhưng cũng có khả năng sử dụng glucoza và các hydratcacbon khác, và dung nạp được các thể mang ion.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ *Megasphaera elsdenii* chủng NCIMB 41787. Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ *Megasphaera elsdenii* chủng NCIMB 41788.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* là từ *Megasphaera elsdenii* chủng ATCC® 25940.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* thu được từ chủng được chọn từ bộ sưu tập giống nuôi cấy gốc hoặc phân lập được từ nguồn tự nhiên. Tế bào mà "thu được" từ chủng có thể là tự nhiên hoặc dẫn xuất nhân tạo như, ví dụ, thể phân lập phụ, thể đột biến, biến thể, hoặc chủng tái tổ hợp.

Tạo giống nuôi cấy chứa vi khuẩn yếm khí, vi khuẩn hiếu khí, và/hoặc tế bào nấm men

M. elsdenii là vi khuẩn yếm khí mà cần phải được nuôi cấy trong điều kiện yếm khí nghiêm ngặt để thu được hiệu suất và khả năng sống tối đa.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa một hoặc nhiều chủng tế bào *M. elsdenii*. Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa một chủng tế bào *M. elsdenii*. Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa một hoặc nhiều chủng tế bào *M. elsdenii* (tức là,

tế bào trong giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii*, ví dụ, một hoặc nhiều chủng tế bào *M. elsdenii*). Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa một chủng tế bào *M. elsdenii*.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào *Megasphaera* và môi trường sinh trưởng.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào vi khuẩn yếm khí và môi trường sinh trưởng. Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào *Bifidobacterium*, như *B. breve*, tế bào *Lactobacillus*, như *L. plantarum*, tế bào *Bifidobacterium*, như *B. animalis* subsp. *lactis*, tế bào *Pediococcus*, như *P. acidilactici*, tế bào *Lactobacillus*, như *L. casei* và môi trường sinh trưởng.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào vi khuẩn hiếu khí và môi trường sinh trưởng. Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào *Bacillus*, như *B. subtilis* và môi trường sinh trưởng.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào nấm men và môi trường sinh trưởng. Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào *Saccharomyces*, như *S. boulardii* và *S. cerevisiae*.

Nhiều thông số lên men khác nhau cho việc cấy, sinh trưởng, và thu hoạch tế bào vi sinh vật có thể được sử dụng, bao gồm lên men liên tục (tức là, nuôi cấy liên tục) hoặc lên men theo mẻ (tức là, nuôi cấy theo mẻ). Xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,550,139.

Môi trường sinh trưởng đối với các tế bào vi sinh vật có thể là rắn, bán rắn, hoặc lỏng. Môi trường có thể chứa các chất dinh dưỡng cung cấp các nguyên tố thiết yếu và các yếu tố đặc biệt mà tạo khả năng sinh trưởng. Nhiều môi trường vi sinh vật và các biến thể là đã biết trong lĩnh vực này. Môi trường có thể được bổ sung vào giống nuôi cấy ở thời điểm bất kỳ, bao gồm bắt đầu nuôi cấy, trong quá trình nuôi cấy, hoặc gián đoạn/liên tục.

Ví dụ về môi trường sinh trưởng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: (1) môi trường bán xác định, chứa pepton, 3 g/L; nấm men, 3 g/L; dung dịch vitamin, 2 mL/L; dung dịch chất khoáng, 25 mL/L; carmin chàm (0,5%), 1 g/L; 12,5% L-xystein, 2 g/L; 12,5% natri sulfua, 2 g/L; và có bổ sung Na-lactat (lactat bán xác định, SDL), glucoza (glucoza bán xác định, SDG), hoặc maltoza (maltoza bán xác định, SDM); (2) aga/canh thang Modified Reinforced Clostridial (khử trước), chứa pepton, 10 g/L; chất chiết thịt bò,

10 g/L; chất chiết nấm men, 3 g/L; dextroza 5 g/L; NaCl, 5 g/L; tinh bột hòa tan, 1 g/L; L-xystein HCl, 0,5 g/L; natri axetat, 3 g/L; và resazurin (0,025%), 4 mL/L; (3) Aga/canh thang trypticaza đậu nành có máu cừu đã loại fibrin; (4) môi trường bán xác định không chứa dịch dạ cỏ, mà chứa Na-lactat (70%), 10 g/l; Pepton, 2 g/l; KH_2PO_4 1 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,06 g/l; các vitamin (Pyridoxolhydroclorua, 4 mg/l; Pyridoxamin, 4 mg/l; Riboflavin, 4 mg/l; Thiaminiclорua, 4 mg/l; Nicotinamit, 4 mg/l; Ca-D-pantothenat, 4 mg/l; axit 4-aminobenzoic, 0,2 mg/l, Biotin, 0,2 mg/l, axit folic, 0,1 mg/l và xyanocobalamin, 0,02 mg/l); $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/l; Xystein, 0,25 g/l; Chất chống tạo bọt, 0,07 ml/l và Monensin, 10 mg/l; và được điều chế bằng cách bổ sung Na-lactat và dung dịch chất khoáng vào bình chứa và hấp khử trùng trong 60 phút; hòa tan pepton trong 300 ml H_2O cất và hấp khử trùng riêng; lọc khử trùng dung dịch vitamin và hai chất khử trùng; sau đó khử trùng, cấp khí bình chứa bằng khí yếm khí qua đêm; bổ sung các thành phần khác riêng rẽ sau khi làm mát; và điều chỉnh độ pH đến giá trị mong muốn bằng HCl 5N; và (5) môi trường lactat chứa dịch dạ cỏ đã ủ ("IRFL"), chứa 400 ml dịch dạ cỏ trong đã ủ từ cừu được cho ăn cỏ linh lăng, 371 ml nước cất, 2 g pepton, 15 g aga, 100 ml dung dịch natri-D, L-lactat 10% (khối lượng/thể tích), 100 ml dung dịch bromocresol tím 0,04% (khối lượng/thể tích), và 25 ml dung dịch chất khoáng chứa 40 g/l KH_2PO_4 ; 120 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 2,4 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, trong đó axit lactic (90% khối lượng/thể tích) được dùng để điều chỉnh độ pH đến 5,5 trước khi hấp khử trùng ở 121°C trong 25 phút, sau đó làm mát trong bể nước 50°C trong khi cấp khí bằng hỗn hợp khí yếm khí, tiếp theo là bổ sung hai mililit mỗi loại $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (12,5% khối lượng/thể tích) và xystein.HCl.H₂O (12,5% khối lượng/thể tích).

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa môi trường sinh trưởng bao gồm ít nhất một nguồn cacbon. Theo một số phương án, ít nhất một nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, tinh bột (ví dụ, tinh bột gelatin hóa và/hoặc tinh bột hòa tan), lactat (tức là, axit lactic), dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, manitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men và tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon. Theo một số phương án, ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, tinh bột (ví dụ, tinh bột gelatin hóa và/hoặc tinh bột hòa tan), lactat (tức là, axit lactic), dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, manitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men và tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, ít nhất hai nguồn cacbon chứa khoảng 1-99% nguồn cacbon thứ nhất (ví dụ, nguồn cacbon bất kỳ được mô tả trong bản mô tả) và khoảng 1-99% nguồn cacbon thứ hai (ví dụ, nguồn cacbon bất kỳ được mô tả trong bản mô tả mà khác với nguồn cacbon thứ nhất), trong đó 100% ít nhất hai nguồn cacbon chứa nguồn cacbon thứ nhất và nguồn cacbon thứ hai. Theo một số phương án, ít nhất hai nguồn cacbon chứa khoảng 50-60% nguồn cacbon thứ nhất và khoảng 40-50% nguồn cacbon thứ hai, khoảng 50-70% nguồn cacbon thứ nhất và khoảng 30-50% nguồn cacbon thứ hai, khoảng 50-80% nguồn cacbon thứ nhất và khoảng 20-50% nguồn cacbon thứ hai, hoặc khoảng 50-90% nguồn cacbon thứ nhất và khoảng 10-50% nguồn cacbon thứ hai. Theo các phương án khác, ít nhất hai nguồn cacbon chứa khoảng 65-75% nguồn cacbon thứ nhất và khoảng 25-35% nguồn cacbon thứ hai. Theo một số phương án, nguồn cacbon thứ nhất là lactat.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* được cho sinh trưởng ở khoảng 39 °C đến khoảng 40 °C, ở khoảng 35 °C, ở khoảng 36 °C, ở khoảng 37 °C, ở khoảng 38 °C, ở khoảng 39 °C, hoặc ở khoảng 40 °C.

Theo một số phương án, tế bào vi sinh vật được cho sinh trưởng ở khoảng 15°C đến khoảng 45°C, ở khoảng 20°C đến 40°C, 25°C đến 35 °C, 30°C đến 39°C. Theo một số phương án, tế bào vi sinh vật được cho sinh trưởng ở khoảng 30°C, khoảng 31°C, khoảng 32°C, khoảng 33°C, khoảng 34°C, khoảng 35°C, ở khoảng 36 °C, ở khoảng 37 °C, ở khoảng 38 °C, ở khoảng 39 °C, hoặc ở khoảng 40 °C.

Theo một số phương án, tế bào vi sinh vật được làm mát đến khoảng 18 °C đến khoảng 25 °C để bảo quản.

Theo một số phương án, độ pH của giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdonii* (ví dụ, trong quá trình nuôi cấy và/hoặc tại thời điểm thu hoạch) là nằm trong khoảng 4,5 đến khoảng 7,0, nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 6,5, nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 6,0, nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 5,5, nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 5,0, nằm trong khoảng từ khoảng 4,6 đến khoảng 6,9, nằm trong khoảng từ khoảng 4,7 đến khoảng 6,8, nằm trong khoảng từ khoảng 4,8 đến khoảng 6,7, nằm trong khoảng từ khoảng 4,9 đến khoảng 6,6, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,0, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 5,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,1 đến khoảng 6,9, nằm trong khoảng từ khoảng 5,2 đến khoảng 6,8, nằm trong khoảng từ khoảng 5,3 đến khoảng 6,7, nằm trong khoảng từ khoảng 5,4 đến khoảng 6,6, nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 7,0, nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,1 đến khoảng 6,4, nằm trong khoảng từ khoảng 5,2 đến khoảng 6,3, nằm trong khoảng từ khoảng 5,3 đến khoảng 6,2, nằm trong khoảng từ khoảng 5,4 đến khoảng 6,1, nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,0, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,1, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,2, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,3, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,4, nằm trong khoảng từ khoảng 5,1 đến khoảng 6,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,2 đến khoảng 6,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,3 đến khoảng 6,5, hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 5,4 đến khoảng 6,5.

Theo một số phương án, độ pH của giống nuôi cấy chứa các tế bào vi sinh vật (ví dụ, trong quá trình nuôi cấy và/hoặc tại thời điểm thu hoạch) là nằm trong khoảng 4,0 đến khoảng 9,0, nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 8,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 8,0, nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 7,5, nằm trong khoảng từ khoảng 6,0 đến khoảng 7,0.

Để nuôi cấy các tế bào vi sinh vật, các thiết bị lên men có kích thước và thiết kế khác nhau mà duy trì điều kiện yếm khí có thể được sử dụng. Thiết bị lên men có thể, ví dụ, lên men thể tích nuôi cấy đủ để sản xuất thương mại tế bào *M. elsdonii*. Theo một số phương án, thể tích nuôi cấy là khoảng 2 lit, khoảng 10 lit, khoảng 50 lit, khoảng 100 lit, khoảng 150 lit, khoảng 200 lit, khoảng 250 lit, khoảng 300 lit, khoảng 350 lit, khoảng 400

lit, khoảng 450 lit, khoảng 500 lit, khoảng 600 lit, khoảng 800 lit, khoảng 1,000 lit, khoảng 1200 lit, khoảng 1500 lit, khoảng 1800 lit, khoảng 2000 lit, khoảng 2200 lit, khoảng 2500 lit, khoảng 2750 lit, khoảng 3000 lit, khoảng 4000 lit, khoảng 5000 lit, khoảng 6000 lit, khoảng 7000 lit, khoảng 8000 lit, khoảng 9000 lit, khoảng 10000 lit, ít nhất khoảng 20000 lit, ít nhất khoảng 50000 lit, hoặc ít nhất khoảng 75000 lit. Theo một số phương án, thể tích lên men là khoảng 2 lit đến khoảng 75000 lit, khoảng 250 lit đến khoảng 750 lit, khoảng 300 lit đến khoảng 800 lit, khoảng 350 lit đến khoảng 850 lit, khoảng 400 lit đến khoảng 900 lit, khoảng 450 lit đến khoảng 950 lit, khoảng 500 lit đến khoảng 1000 lit, khoảng 750 lit đến khoảng 1250 lit, khoảng 1000 lit đến khoảng 2000 lit, khoảng 2000 lit đến khoảng 4000 lit, khoảng 4000 lit đến khoảng 8000 lit, khoảng 5000 lit đến khoảng 10000 lit, khoảng 50 lit đến khoảng 75000 lit, khoảng 50 lit đến khoảng 50000 lit, khoảng 50 lit đến khoảng 25000 lit, khoảng 50 lit đến khoảng 20000 lit, khoảng 50 lit đến khoảng 15000 lit, khoảng 50 lit đến khoảng 10000 lit, khoảng 100 lit đến khoảng 10000 lit, khoảng 100 lit đến khoảng 5000 lit, khoảng 100 lit đến khoảng 4000 lit, khoảng 100 lit đến khoảng 3000 lit, khoảng 100 lit đến khoảng 2900 lit, khoảng 100 lit đến khoảng 2850 lit, khoảng 100 lit đến khoảng 2800 lit, khoảng 100 lit đến khoảng 2750 lit, khoảng 2 lit, khoảng 10 lit, khoảng 50 lit, khoảng 100 lit, khoảng 200 lit, khoảng 500 lit, khoảng 1000 lit, khoảng 1500 lit, khoảng 10000 lit, khoảng 20000 lit, khoảng 50000 lit, hoặc khoảng 75000 lit.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii* còn chứa vi sinh vật khác (tức là, tế bào vi sinh vật không phải là tế bào *M. elsdenii*). Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii* và vi sinh vật khác mà yếm khí bắt buộc. Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii* và vi sinh vật khác được chọn từ nhóm gồm: *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Candida*, *Clostridium*, *Pediococcus*, *Aspergillus*, và *Saccharomyces*.

Tế bào vi khuẩn hiếu khí, tế bào vi khuẩn yếm khí, và tế bào nấm men đông khô

Theo một khía cạnh, sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào *M. elsdenii* đông khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera* đông khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào *Megasphaera* đông khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào *Megasphaera* đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào *Bifidobacterium* đông khô, như *B. breve*, tế bào *Lactobacillus* đông khô, như *L. plantarum*, tế bào *Bifidobacterium* đông khô, như *B. animalis* subsp. *lactis*, tế bào *Pediococcus* đông khô, như *P. acidilactici*, tế bào *Lactobacillus* đông khô, như *L. casei*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào *Bifidobacterium* đông khô, như *B. breve*, tế bào *Lactobacillus* đông khô, như *L. plantarum*, tế bào *Bifidobacterium* đông khô, như *B. animalis* subsp. *lactis*, tế bào *Pediococcus* đông khô, như *P. acidilactici*, tế bào *Lactobacillus* đông khô, như *L. casei*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào *Bifidobacterium* đông khô, như *B. breve*, tế bào *Lactobacillus* đông khô, như *L. plantarum*, tế bào *Bifidobacterium* đông khô, như *B. animalis* subsp. *lactis*, tế bào *Pediococcus* đông khô, như *P. acidilactici*, tế bào *Lactobacillus* đông khô, như *L. casei* được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn hiếu khí đông khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào *Bacillus* đông khô, như *B. subtilis*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào vi khuẩn hiếu khí đông khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào *Bacillus* đông khô, như *B. subtilis*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào vi khuẩn hiếu khí đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào *Bacillus* đông khô, như *B. subtilis* được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào nấm men đông khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp sản xuất tế bào *Saccharomyces* đông khô, như *S. boulardii* và *S. cerevisiae*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào nấm men đông khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào *Saccharomyces* đông khô, như *S. boulardii* và *S. cerevisiae*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào nấm men đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến tế bào *Saccharomyces* đông khô, như *S. boulardii* và *S. cerevisiae* được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp sản xuất tế bào *M. elsdenii* đông khô bao gồm các bước: tạo giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng; thu hoạch tế bào; đông lạnh tế bào; và đông khô tế bào, trong đó tế bào *M. elsdenii* đông khô được tạo ra. Theo một số phương án, phương pháp này được thực hiện theo thứ tự chuẩn bị giống nuôi cấy, sau đó thu hoạch tế bào (tức là, thu hoạch tế bào được nuôi cấy), sau đó

đông lạnh tế bào (*tức là*, đông lạnh tế bào đã thu hoạch được), và sau đó đông khô các tế bào (*tức là*, đông khô tế bào đông lạnh).

Theo một số phương án, phương pháp này được thực hiện trong điều kiện yếm khí. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm nước chuẩn bị giống nuôi cấy, thu hoạch tế bào, đông lạnh các tế bào, đông khô các tế bào, hoặc tổ hợp các bước này trong điều kiện yếm khí.

Phương pháp này có thể bao gồm phương pháp tạo giống nuôi cấy bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này. Giống nuôi cấy theo phương pháp này cũng có thể bao gồm đặc tính bất kỳ của giống nuôi cấy được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, tế bào trong giống nuôi cấy bao gồm tế bào *M. elsdenii*. Theo một số phương án, tế bào trong giống nuôi cấy bao gồm tế bào *M. elsdenii*.

Theo một số phương án, môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, lactat (*tức là*, axit lactic), dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, manitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, và tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước thu hoạch tế bào trong vòng 12 giờ sau khi giống nuôi cấy kết thúc pha sinh trưởng theo cấp số nhân của nó và trước khi giống nuôi cấy bắt đầu pha sinh trưởng ổn định của nó. Giống nuôi cấy có thể được làm mát để nhiệt độ trong phòng để ngừng sinh trưởng tại thời điểm thu hoạch.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa chất lỏng, và phương pháp bao gồm bước thu hoạch tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào *M. elsdenii* được cô đặc) với tỷ lệ phần trăm chất lỏng. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước thu hoạch tế bào với khoảng 1% đến khoảng 40%, khoảng 1% đến khoảng 35%, khoảng 1% đến khoảng 30%, khoảng 1% đến khoảng 25%, khoảng 1% đến khoảng 20%, khoảng 1% đến khoảng 15%, khoảng 1% đến khoảng 10%, khoảng 1% đến khoảng 5%, khoảng 10%, khoảng 9%, khoảng 8%, khoảng 7%, khoảng 6%, khoảng 5%, khoảng 4%, khoảng 3%, khoảng 2%, hoặc khoảng 1% chất lỏng. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm thu hoạch tế bào ít hơn khoảng 40%, ít hơn khoảng 35%, ít hơn khoảng 30%, ít hơn khoảng 25%, ít hơn

khoảng 20%, ít hơn khoảng 15%, ít hơn khoảng 10%, ít hơn khoảng 9%, ít hơn khoảng 8%, ít hơn khoảng 7%, ít hơn khoảng 6%, ít hơn khoảng 5%, ít hơn khoảng 4%, ít hơn khoảng 3%, ít hơn khoảng 2%, hoặc ít hơn khoảng 1% chất lỏng.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy chứa chất lỏng, và phương pháp bao gồm bước thu hoạch tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào *M. elsdenii* được cô đặc) bằng cách loại bỏ tỷ lệ phần trăm chất lỏng. Theo một số phương án, bước thu hoạch tế bào bao gồm việc loại bỏ khoảng 50% đến khoảng 100% chất lỏng, khoảng 55% đến khoảng 100%, khoảng 60% đến khoảng 100%, khoảng 65% đến khoảng 100%, khoảng 70% đến khoảng 100%, khoảng 75% đến khoảng 100%, khoảng 80% đến khoảng 100%, khoảng 85% đến khoảng 100%, khoảng 90% đến khoảng 100%, hoặc khoảng 95% đến khoảng 100% chất lỏng. Theo một số phương án, thu hoạch tế bào bao gồm việc loại bỏ ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 55%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 91%, ít nhất khoảng 92%, ít nhất khoảng 93%, ít nhất khoảng 94%, ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 96%, ít nhất khoảng 97%, ít nhất khoảng 98%, ít nhất khoảng 99%, hoặc ít nhất khoảng 100% chất lỏng.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm thu hoạch tế bào *M. elsdenii* bằng cách cô đặc tế bào. Theo một số phương án, bước thu hoạch tế bào bao gồm cô đặc tế bào bằng ít nhất một kỹ thuật được chọn từ nhóm gồm: ly tâm, lọc, thẩm tách, thẩm thấu ngược, và tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, kỹ thuật lọc bao gồm lọc bằng đất sét. Theo một số phương án, kỹ thuật lọc bao gồm lọc dòng tiếp tuyến, còn được gọi là lọc dòng ngang.

Theo một số phương án, độ pH của giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii* ở thời điểm thu hoạch nằm trong khoảng 4,5 đến khoảng 7,0, nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 6,5, nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 6,0, nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 5,5, nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 5,0, nằm trong khoảng từ khoảng 4,6 đến khoảng 6,9, nằm trong khoảng từ khoảng 4,7 đến khoảng 6,8, nằm trong khoảng từ khoảng 4,8 đến khoảng 6,7, nằm trong khoảng từ khoảng 4,9 đến khoảng 6,6, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,0, nằm trong khoảng

từ khoảng 5,0 đến khoảng 5,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,1 đến khoảng 6,9, nằm trong khoảng từ khoảng 5,2 đến khoảng 6,8, nằm trong khoảng từ khoảng 5,3 đến khoảng 6,7, nằm trong khoảng từ khoảng 5,4 đến khoảng 6,6, nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 7,0, nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,1 đến khoảng 6,4, nằm trong khoảng từ khoảng 5,2 đến khoảng 6,3, nằm trong khoảng từ khoảng 5,3 đến khoảng 6,2, nằm trong khoảng từ khoảng 5,4 đến khoảng 6,1, nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,0, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,1, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,2, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,3, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,4, nằm trong khoảng từ khoảng 5,1 đến khoảng 6,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,2 đến khoảng 6,5, nằm trong khoảng từ khoảng 5,3 đến khoảng 6,5, hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 5,4 đến khoảng 6,5.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm cấy vào môi trường sinh trưởng trong thiết bị lên men giống cấy chứa tế bào *M. elsdenii* để tạo ra giống nuôi cấy, và ủ giống nuôi cấy ở nhiệt độ từ khoảng 39°C đến khi độ pH của giống nuôi cấy là khoảng 6,0. Theo một số phương án, giống cấy chứa tế bào *M. elsdenii* trong giống nuôi cấy tế bào *M. elsdenii* trong bình hoặc một phần của nó. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm cấy vào môi trường sinh trưởng trong thiết bị lên men tỷ lệ giống cấy so với môi trường từ 1/50 đến 1/4000. Theo một số phương án, tỷ lệ giống cấy so với môi trường là 1/100.

Theo một số phương án, giống nuôi cấy còn chứa ít nhất một chất bảo quản đông lạnh. Theo một số phương án, ít nhất một chất bảo quản đông lạnh được chọn từ nhóm gồm: fructoza, glucoza, sucroza, bột sữa, chế phẩm dạng công thức dùng cho nhũ nhi, sữa tách béo, trehaloza, maltodextrin, betain, và tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, ít nhất một chất bảo quản đông lạnh có mặt với lượng từ khoảng 1% đến khoảng 50% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 1% đến khoảng 40% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 1% đến khoảng 30% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 1% đến khoảng 20% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 1% đến khoảng 10% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 1% đến khoảng 5% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 10% đến khoảng 20% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 15% đến khoảng 25% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 20% đến khoảng 30% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 30% đến khoảng 40% (khối lượng/thể tích) giống

nuôi cấy, khoảng 40% đến khoảng 50% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 60% đến khoảng 70% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy, khoảng 70% đến khoảng 80% (khối lượng/thể tích) giống nuôi cấy. Theo một số phương án, chất bảo quản đông lạnh được bổ sung bằng cách bổ sung chất bảo quản đông lạnh được nghiền bột trực tiếp vào tế bào *M. elsdenii* được cô đặc. Theo một số phương án, chất bảo quản đông lạnh được bổ sung bằng cách bổ sung dung dịch chất bảo quản đông lạnh trực tiếp vào tế bào *M. elsdenii* được cô đặc với tỷ lệ 1/1, với tỷ lệ 1/5, hoặc với tỷ lệ 1/10.

Theo một số phương án, việc đông lạnh các tế bào bao gồm đưa tế bào vào thiết bị đông lạnh hoặc cho tế bào tiếp xúc với đá khô, nitơ lỏng, hoặc kết hợp các phương pháp này. Việc đông lạnh các tế bào bao gồm đông lạnh các tế bào trong khi chúng nằm trong dụng cụ chứa. Cho tế bào tiếp xúc bao gồm cho vật chứa chứa tế bào tiếp xúc với môi trường để đông lạnh các tế bào. Môi trường để đông lạnh các tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, thiết bị đông lạnh, bể axeton-đá khô, nitơ lỏng, hoặc tổ hợp các môi trường này.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm đông lạnh các tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -20 °C đến khoảng -210 °C. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm đông lạnh các tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -20 °C đến khoảng -80 °C. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm đông lạnh các tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -80 °C đến khoảng -210 °C. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm đông lạnh các tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -20 °C đến khoảng -196 °C. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm đông lạnh các tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -80 °C đến khoảng -196 °C. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm đông lạnh các tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -20 °C. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm đông lạnh các tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -80 °C. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước đông lạnh các tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -196 °C. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm đông lạnh các tế bào bằng cách cho tế bào tiếp xúc với nitơ lỏng.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm đông lạnh các tế bào trong điều kiện yếm khí.

Theo một số phương án, việc đông lạnh tạo ra các viên tế bào đông lạnh. Ví dụ, việc đông lạnh có thể được thực hiện bằng thiết bị đông lạnh nhanh (ví dụ, Model 250-S01 Crygran, IFQ Inc.).

Theo một số phương án, đường kính của các viên đông lạnh là khoảng 0,001 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,01 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,1 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,2 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,3 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,4 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,5 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,6 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,7 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,8 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,9 đến khoảng 1,0 in-xơ, khoảng 0,001 đến khoảng 0,9 in-xơ, khoảng 0,01 đến khoảng 0,9 in-xơ, khoảng 0,1 đến khoảng 0,9 in-xơ, khoảng 0,2 đến khoảng 0,9 in-xơ, khoảng 0,3 đến khoảng 0,9 in-xơ, khoảng 0,4 đến khoảng 0,9 in-xơ, khoảng 0,5 đến khoảng 0,9 in-xơ, khoảng 0,6 đến khoảng 0,9 in-xơ, khoảng 0,7 đến khoảng 0,9 in-xơ, khoảng 0,8 đến khoảng 0,9 in-xơ, khoảng 0,001 đến khoảng 0,8 in-xơ, khoảng 0,01 đến khoảng 0,8 in-xơ, khoảng 0,1 đến khoảng 0,8 in-xơ, khoảng 0,2 đến khoảng 0,8 in-xơ, khoảng 0,3 đến khoảng 0,8 in-xơ, khoảng 0,4 đến khoảng 0,8 in-xơ, khoảng 0,5 đến khoảng 0,8 in-xơ, khoảng 0,6 đến khoảng 0,8 in-xơ, khoảng 0,7 đến khoảng 0,8 in-xơ, khoảng 0,001 đến khoảng 0,7 in-xơ, khoảng 0,01 đến khoảng 0,7 in-xơ, khoảng 0,1 đến khoảng 0,7 in-xơ, khoảng 0,2 đến khoảng 0,7 in-xơ, khoảng 0,3 đến khoảng 0,7 in-xơ, khoảng 0,4 đến khoảng 0,7 in-xơ, khoảng 0,5 đến khoảng 0,7 in-xơ, khoảng 0,6 đến khoảng 0,7 in-xơ, khoảng 0,001 đến khoảng 0,6 in-xơ, khoảng 0,01 đến khoảng 0,6 in-xơ, khoảng 0,1 đến khoảng 0,6 in-xơ, khoảng 0,2 đến khoảng 0,6 in-xơ, khoảng 0,3 đến khoảng 0,6 in-xơ, khoảng 0,4 đến khoảng 0,6 in-xơ, khoảng 0,5 đến khoảng 0,6 in-xơ, khoảng 0,001 đến khoảng 0,5 in-xơ, khoảng 0,01 đến khoảng 0,5 in-xơ, khoảng 0,05 đến khoảng 0,5 in-xơ, khoảng 0,1 đến khoảng 0,5 in-xơ, khoảng 0,15 đến khoảng 0,5 in-xơ, khoảng 0,2 đến khoảng 0,5 in-xơ, khoảng 0,3 đến khoảng 0,5 in-xơ, hoặc khoảng 0,4 đến khoảng 0,5 in-xơ.

Tế bào *M. elsdenii* đông lạnh có thể được bảo quản đông lạnh (ví dụ, dưới 0 °C) trước khi đông khô hoặc có thể được đông khô ngay. Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* đông lạnh được bảo quản ở nhiệt độ dưới khoảng 0 °C, dưới khoảng -10 °C, dưới khoảng -20 °C, dưới khoảng -50 °C, dưới khoảng -80°C, hoặc dưới khoảng -196 °C. Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* đông lạnh được bảo quản ở nhiệt độ từ khoảng -20

°C, khoảng -30 °C, khoảng -40 °C, khoảng -50 °C, khoảng -60 °C, khoảng -70 °C, khoảng -80 °C, khoảng -90 °C, khoảng -100 °C, khoảng -150 °C, khoảng -196 °C, hoặc khoảng -210 °C.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* đông lạnh được đông khô. Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* đông lạnh được đông khô. Việc đông khô bao gồm, ví dụ, loại bỏ chất lỏng khỏi tế bào đông lạnh.

Theo một số phương án, việc đông khô tế bào *M. elsdenii* bao gồm đưa tế bào đông lạnh vào thiết bị đông khô. Theo một số phương án, việc đông khô bao gồm đưa tế bào đông lạnh vào áp suất giảm, và làm ấm dần tế bào đến nhiệt độ trong phòng.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm đông khô các tế bào trong điều kiện yếm khí.

Theo một số phương án, *M. elsdenii* đông khô được sản xuất trên quy mô công nghiệp.

Theo một số phương án, khoảng 1×10^3 đến 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, khoảng 1×10^3 đến 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* sống được sau khi đông khô.

Theo một khía cạnh, phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô theo sáng chế bao gồm: (a) tạo giống nuôi cấy trong điều kiện yếm khí chứa tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, lactat (*tức là*, axit lactic), dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, manitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men và tổ hợp của chúng, (b) thu hoạch tế bào trong điều kiện yếm khí, (c) đông lạnh các tế bào, và (d) đông khô các tế bào, trong đó khoảng 1×10^3 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô được tạo ra.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô theo sáng chế bao gồm: (a) tạo giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng, (b) thu hoạch tế bào trong điều kiện yếm khí trong vòng 12 giờ sau khi giống

nuôi cấy kết thúc pha sinh trưởng theo cấp số nhân của nó và trước khi giống nuôi cấy bắt đầu pha sinh trưởng ổn định của nó, (c) đông lạnh các tế bào, và (d) đông khô các tế bào, trong đó tế bào *M. elsdenii* đông khô được tạo ra.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô theo sáng chế bao gồm bước: (a) tạo giống nuôi cấy chứa tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng, (b) thu hoạch tế bào, (c) đông lạnh tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -80 °C đến khoảng -210 °C trong vòng 5 giờ thu hoạch, và (d) đông khô các tế bào, trong đó tế bào *M. elsdenii* đông khô được tạo ra.

Theo một số phương án, lượng tế bào *M. elsdenii* đông khô được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả và/hoặc lượng tế bào *M. elsdenii* sống được sau khi đông khô là khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^{11} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^{10} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^9 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^8 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^7 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^6 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^5 CFU/g, khoảng 1×10^4 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^5 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^6 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^7 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^8 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^9 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^{10} CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^5 CFU/g, khoảng 1×10^4 CFU/g đến khoảng 1×10^6 CFU/g, khoảng 1×10^5 CFU/g đến khoảng 1×10^7 CFU/g, khoảng 1×10^6 CFU/g đến khoảng 1×10^8 CFU/g, khoảng 1×10^7 CFU/g đến khoảng 1×10^9 CFU/g, khoảng 1×10^8 CFU/g đến khoảng 1×10^{10} CFU/g, khoảng 1×10^9 CFU/g đến khoảng 1×10^{11} CFU/g, hoặc khoảng 1×10^{10} CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được trong khoảng 14 ngày đến khoảng 24 tháng ở khoảng -80 °C, khoảng -20 °C, khoảng 4 °C, khoảng 25 °C, hoặc tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được trong ít nhất khoảng 14 ngày, ít nhất khoảng 1 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 8 tháng, ít nhất khoảng 10 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 15 tháng, ít nhất

khoảng 18 tháng, hoặc ít nhất khoảng 24 tháng ở khoảng -80°C , khoảng -20°C , khoảng 4°C , khoảng 25°C , hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^{11} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/mL đến khoảng 1×10^{10} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^9 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^8 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^7 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^6 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^5 CFU/g, khoảng 1×10^4 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^5 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^6 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^7 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^8 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^9 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^{10} CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^5 CFU/g, khoảng 1×10^4 CFU/g đến khoảng 1×10^6 CFU/g, khoảng 1×10^5 CFU/g đến khoảng 1×10^7 CFU/g, khoảng 1×10^6 CFU/g đến khoảng 1×10^8 CFU/g, khoảng 1×10^7 CFU/g đến khoảng 1×10^9 CFU/g, khoảng 1×10^8 CFU/g đến khoảng 1×10^{10} CFU/g, khoảng 1×10^9 CFU/g đến khoảng 1×10^{11} CFU/g, or khoảng 1×10^{10} CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ từ khoảng -80°C , khoảng -20°C , khoảng 4°C , hoặc tổ hợp của chúng trong ít nhất khoảng 14 ngày, ít nhất khoảng 1 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 8 tháng, ít nhất khoảng 10 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 15 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, hoặc ít nhất khoảng 24 tháng.

Theo một số phương án, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^{11} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^{10} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^9 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^8 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^7 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^6 CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^5 CFU/g, khoảng 1×10^4 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^5 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^6 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^7 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^8 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^9 CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^{10} CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g, khoảng 1×10^3 CFU/g đến khoảng 1×10^5 CFU/g, khoảng 1×10^4 CFU/g đến khoảng $1 \times$

10^6 CFU/g, khoảng 1×10^5 CFU/g đến khoảng 1×10^7 CFU/g, khoảng 1×10^6 CFU/g đến khoảng 1×10^8 CFU/g, khoảng 1×10^7 CFU/g đến khoảng 1×10^9 CFU/g, khoảng 1×10^8 CFU/g đến khoảng 1×10^{10} CFU/g, khoảng 1×10^9 CFU/g đến khoảng 1×10^{11} CFU/g, hoặc khoảng 1×10^{10} CFU/g đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ từ khoảng 25 °C trong ít nhất khoảng 14 ngày, ít nhất khoảng 1 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 8 tháng, ít nhất khoảng 10 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 15 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, hoặc ít nhất khoảng 24 tháng.

Chất phụ gia thực phẩm, chế phẩm, và kit

Theo một khía cạnh, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *M. elsdenii* như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *M. elsdenii* đông khô như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *M. elsdenii* đông khô được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Megasphaera* như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Megasphaera* đông khô như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Megasphaera* đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào vi khuẩn yếm khí như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một khía cạnh khác, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Bifidobacterium*, như *B. breve*, tế bào *Lactobacillus*, như *L. plantarum*, tế bào *Bifidobacterium*, như *B. animalis* subsp. *lactis*, tế bào *Pediococcus*, như *P. acidilactici*, tế bào *Lactobacillus*, như *L. casei*.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm

chứa tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Bifidobacterium* đông khô, như *B. breve*, tế bào *Lactobacillus* đông khô, như *L. plantarum*, tế bào *Bifidobacterium* đông khô, như *B. animalis* subsp. *lactis*, tế bào *Pediococcus* đông khô, như *P. acidilactici*, tế bào *Lactobacillus* đông khô, như *L. casei*. Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Bifidobacterium* đông khô, như *B. breve*, tế bào *Lactobacillus* đông khô, như *L. plantarum*, tế bào *Bifidobacterium* đông khô, như *B. animalis* subsp. *lactis*, tế bào *Pediococcus* đông khô, như *P. acidilactici*, tế bào *Lactobacillus* đông khô, như *L. casei* được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào vi khuẩn hiếu khí như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một khía cạnh khác, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Bacillus*, như *B. subtilis*.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào vi khuẩn hiếu khí đông khô như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào vi khuẩn hiếu khí đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Bacillus* đông khô, như *B. subtilis*. Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Bacillus* đông khô, như *B. subtilis* được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào nấm men như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một khía cạnh khác, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Saccharomyces*, như *S. boulardii* và *S. cerevisiae*.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào nấm men đông khô như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào nấm men đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Saccharomyces* đông khô, như *S. boulardii* và *S. cerevisiae*. Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào *Saccharomyces* đông khô, như *S. boulardii* và *S. cerevisiae* được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chất rắn (*tức là*, "chất phụ gia thực phẩm dạng rắn") hoặc chất lỏng (*tức là*, "chất phụ gia thực phẩm dạng lỏng"). Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm là bán rắn hoặc gel (*tức là*, "chất phụ gia thực phẩm dạng bán rắn hoặc gel"). Chất phụ gia thực phẩm dạng gel có thể chứa chất hấp thụ oxy (*ví dụ*, axit ascorbic).

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm dạng rắn là bột (*ví dụ*, bột thời được), hạt cốm (*tức là*, viên cốm), hạt (*tức là*, hạt), viên, bánh, thể đặc tan trong nước, hồ nhão, viên thuốc lớn, viên nén, phân, thành phần của chúng, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm dạng lỏng là dung dịch (*ví dụ*, dung dịch nước, dung dịch hữu cơ, hoặc dung dịch nước-hữu cơ), huyền phù, nhũ tương, thuốc nước, chế phẩm dạng phun xịt, chế phẩm tiêm được, đồ uống (*ví dụ*, sản phẩm thay thế sữa), thành phần của chúng, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm dạng gel là gel hữu cơ (organogel). Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm dạng gel là gel dùng đường miệng (*tức là*, gel để dùng qua đường miệng).

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm để dùng làm chế phẩm rắc trộn bề mặt (*tức là*, để bổ sung lên bề mặt của thực phẩm hoặc trộn với thực phẩm (*ví dụ*, thức ăn cho động vật)). Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm là để sử dụng dưới dạng lỏng.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* đông khô như được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng dưới dạng chất phụ gia thực phẩm dạng lỏng bằng cách hydrate hóa lại, làm tan, hòa tan, và/hoặc tạo huyền phù tế bào đông khô trong chất lỏng.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa chất mang (*tức là*, một hoặc nhiều chất mang).

Ví dụ về các chất mang thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, nguyên liệu thực vật (*tức là*, toàn bộ thực vật hoặc bộ phận của thực vật (*ví dụ*, hạt, thân, lá, hoa, và/hoặc rễ, chẳng hạn), bao gồm thực vật hoặc bộ phận của thực vật khô hoặc đã qua chế biến), hạt khô (*ví dụ*, hạt sậy khô), cỏ linh lăng, bột ngô xay thô, bột quả cam quýt xay thô, bã lên men, vỏ hầu nghiền, đất sét attapulgit, cám mì, mật đường hòa tan, bột lõi ngô xay thô, cá thành phần rau ăn được, bột đậu nành rang đã bóc vỏ, thức ăn nghiền từ đậu nành, mycelis kháng sinh, vermiculit, mật đậu tương, nước sữa, maltodextrin, sucroza, dextroza, đá vôi (canxi cacbonat), vỏ trấu, giống nuôi cấy nấm men, tinh bột khô, natri silica aluminat, nước, dung dịch muối, rượu, silicon, sáp, thạch dầu mỏ, dầu thực vật, polyetylen glycol, propylen glycol, liposom, đường, gelatin, lactoza, amyloza, magie stearat, đá talc, chất hoạt động bề mặt, axit silixic, parafin nhớt, dầu nước hoa, axit béo monoglyxerit và diglyxerit, este petroethral của axit béo, hydroxymetyl-xenluloza, polyvinylpyrrolidon, và các chất tương tự, và tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm chứa tá dược (*tức là*, một hoặc nhiều tá dược) bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, xenluloza vi tinh thể; lactoza; natri xitrat; canxi cacbonat; canxi phosphat dibazơ và glyxin; chất gây rã như tinh bột, natri tinh bột glycolat, croscarmeloza natri và các silicat phức nhất định; chất kết dính hạt như polyvinylpyrrolidon, hydroxypropylmetyl-xenluloza (HPMC), hydroxypropylxenluloza (HPC), sucroza, gelatin, và acacia; chất tạo khối như maltodextrin; chất hấp thụ hơi ẩm như silic dioxit; chất hấp thụ oxy như axit ascorbic; và/hoặc chất làm trơn như magie stearat, axit stearic, glyxeryl behenat, và đá talc.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm là hạt mịn chứa: lõi chứa tế bào *M. elsdenii* và/hoặc chất phụ gia thực phẩm, và vỏ bao ngoài lõi. Theo một số phương án, vỏ là muối ngăn đã hydrat hóa. Lớp vỏ muối có thể cải thiện độ chịu nhiệt, cải thiện độ ổn định bảo quản, và bảo vệ chống lại các thành phần khác trong hạt mà mặt khác có thể có tác dụng bất lợi (*ví dụ*, đến độ ổn định) của tế bào *M. elsdenii* và/hoặc chất phụ gia thực phẩm.

Theo một số phương án, *M. elsdenii* đông khô được trộn với chế phẩm chất phụ gia khô bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chất sinh trưởng, enzym, đường, hydrat cacbon, chất chiết, và các thành phần vi lượng thúc đẩy sự sinh trưởng. Đường có thể bao gồm,

nhưng không bị giới hạn ở, lactoza, maltoza, dextroza, maltodextrin, glucoza, fructoza, manosa, tagatoza, sorboza, rafinoza, amyloza, tinh bột, và galactoza. Các đường có thể nằm trong khoảng từ 50 đến 95%, riêng rẽ hoặc kết hợp. Các chất chiết có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, nấm men hoặc chất hòa tan từ lên men bằng nấm men khô nằm trong khoảng từ 5 đến 50%. Các chất sinh trưởng có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trypticaza, nằm trong khoảng từ 5 đến 25%; natri lactat, nằm trong khoảng từ 5 đến 30%; và Tween 80, nằm trong khoảng từ 1 đến 5%. Các hydrat cacbon có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, manitol, sorbitol, adonitol và arabitol. Các hydrat cacbon có thể nằm trong khoảng từ 5 đến 50% riêng rẽ hoặc kết hợp. Các thành phần vi lượng có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, canxi cacbonat, nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5,0%; canxi clorua, nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5,0%; dikali phosphat, nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5,0%; canxi phosphat, nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5,0%; mangan proteinat, nằm trong khoảng từ 0,25-1,00%; và mangan, nằm trong khoảng từ 0,25 đến 1,00%.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm *M. elsdonii* được tạo ra bằng cách trộn (ví dụ, bằng thiết bị trộn) tế bào *M. elsdonii*, bao gồm giống nuôi cấy chứa tế bào và/hoặc tế bào đông khô, với thành phần bổ sung bất kỳ của chất phụ gia thực phẩm (ví dụ, chất mang và/hoặc tá dược). Theo một số phương án, các thành phần được trộn với để thu được hỗn hợp đồng nhất.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm là chất phụ gia thức ăn cho động vật rắc trộn bề mặt chứa tế bào *M. elsdonii* như được mô tả trong bản mô tả (ví dụ, tế bào đông khô) và chất mang. Theo một số phương án, chất mang được chọn từ nhóm gồm: nước sữa, maltodextrin, sucroza, dextroza, đá vôi (tức là, canxi cacbonat), vỏ trấu, giống nuôi cấy nấm men, tinh bột khô, và natri silica aluminat, sữa, nước, và tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm dùng cho động vật là thuốc nước, thuốc xịt, hoặc chế phẩm bổ sung của sản phẩm thay thế sữa chứa tế bào *M. elsdonii* như được mô tả trong bản mô tả (ví dụ, tế bào đông khô) và chất mang tan trong nước. Theo một số phương án, chất mang được chọn từ nhóm gồm: nước sữa, maltodextrin, sucroza, dextroza, tinh bột khô, natri silica aluminat, sữa, nước, và tổ hợp của chúng.

Theo một khía cạnh, sáng chế hướng đến thực phẩm (ví dụ, thức ăn cho động vật) chứa tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô như được mô tả trong bản mô tả, ví dụ, tế bào đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả) và/hoặc chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Sản phẩm thực phẩm có thể là thực phẩm bất kỳ để động vật tiêu dùng (tức là, động vật không phải người hoặc người), và bao gồm các chế phẩm dạng rắn và lỏng. Các thực phẩm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các thực phẩm thông thường; sản phẩm dạng lỏng, bao gồm nước, sữa, đồ uống, đồ uống nhằm mục đích điều trị bệnh, và đồ uống dinh dưỡng; thực phẩm chức năng; chất bổ sung; thực phẩm thuốc; các sản phẩm công thức dùng cho nhũ nhi (tức là, bao gồm nhũ nhi là người và không phải người), bao gồm sản phẩm công thức cho nhũ nhi sinh non; thực phẩm cho động vật mang thai hoặc cho con bú; thực phẩm cho động vật trưởng thành; và thực phẩm cho đối tượng cao tuổi. Theo một số phương án, thực phẩm bao gồm chất lỏng (ví dụ, đồ uống, ví dụ, nước, sữa, hoặc sản phẩm thay thế sữa) chứa chất phụ gia thực phẩm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến chế phẩm chứa tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) và/hoặc chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chế phẩm chứa tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) và/hoặc chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả còn được biến đổi hoặc xử lý về mặt hóa học hoặc vật lý dựa vào các yêu cầu của chế phẩm bằng các kỹ thuật đã biết bất kỳ.

Chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều tá dược. Theo một số phương án, tá dược có thể là, nhưng không bị giới hạn ở, chất kiềm, chất làm ổn định, chất chống oxy hóa, chất kết dính, chất làm phân tách, chất phủ, thành phần giai đoạn bên ngoài, thành phần giải phóng được kiểm soát, dung môi, chất hoạt động bề mặt, chất làm ẩm, chất đệm, chất điền đầy, chất làm mềm, hoặc tổ hợp của chúng. Tá dược ngoài các tá dược được nêu ở đây có thể bao gồm tá dược được liệt kê trong, mặc dù không giới hạn ở, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st ed. (2005). Bao gồm tá dược trong một phân loại cụ thể ở đây (ví dụ, "dung môi") được dự định để minh họa chứ không giới hạn vai trò của tá dược. Một tá dược cụ thể có thể nằm trong nhiều nhóm phân loại.

Theo một số phương án, chế phẩm là dược phẩm (ví dụ, để điều trị cho động vật không phải người hoặc người). Theo một số phương án, chế phẩm là thực phẩm thuốc (ví dụ, thực phẩm thú y). Thực phẩm thuốc bao gồm thực phẩm mà là chế phẩm được tiêu dùng hoặc được dùng bên ngoài dưới sự giám sát của bác sĩ (ví dụ, bác sĩ thú y) và đó là được dự định để quản lý chế độ ăn uống cụ thể của một tình trạng bệnh, trong đó các yêu cầu dinh dưỡng đặc biệt, dựa trên các nguyên tắc khoa học được công nhận, được thiết lập bằng đánh giá y tế. Theo một số phương án, dược phẩm chứa tá dược được dụng. Theo một số phương án, thuật ngữ "dược dụng" có nghĩa là được phê chuẩn bởi cơ quan quản lý của Liên bang hoặc chính phủ tiểu bang hoặc được liệt kê trong Dược điển Hoa Kỳ hoặc dược điển quốc tế thường được công nhận khác để sử dụng cho động vật, và cụ thể hơn là người.

Đối với việc dùng chế phẩm qua đường uống, tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) hoặc chất phụ gia thực phẩm có thể được kết hợp với tá dược đã được biết rõ trong lĩnh vực. Các chất mang này có thể, ví dụ, cho phép tế bào *M. elsdenii* hoặc chất phụ gia thực phẩm theo sáng chế được bào chế thành viên nén, viên nén, viên bao đường, viên nang, chất lỏng, gel, si rô, huyền phù đặc, hỗn dịch và các dạng tương tự, để đối tượng được điều trị đưa vào qua đường uống. Theo một số phương án, chế phẩm là viên nén, viên tròn, viên nén dài, hoặc viên nang. Các tá dược thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chất điền đầy như đường, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, lactoza, sucroza, manitol, và sorbitol; các chế phẩm xenluloza như, nhưng không bị giới hạn ở, tinh bột ngô, tinh bột mì, tinh bột gạo, tinh bột khoai tây, gelatin, gôm tragacanth, metyl xenluloza, hydroxypropylmetyl xenluloza, natri carboxymetyl xenluloza, và polyvinylpyrrolidon (PVP). Nếu muốn, chất làm rắn có thể được bổ sung, như, nhưng không bị giới hạn ở, polyvinylpyrrolidon được tạo liên kết ngang, aga, hoặc axit alginic hoặc muối của chúng như natri alginat. Các chế phẩm có thể được sử dụng qua đường uống bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, viên nang được làm từ gelatin, cũng như viên nang mềm, được bọc kín được làm từ gelatin và chất dẻo, như glyxerol hoặc sorbitol. Theo một số phương án, dạng liều lượng là dạng liều lượng dùng người ăn kiêng, trong đó dạng liều lượng không được tạo ra từ và không chứa thành phần bất kỳ có nguồn gốc động vật. Theo một số phương án, dạng liều lượng dùng cho đối tượng ăn kiêng là viên nang dùng cho đối tượng ăn kiêng.

Theo một khía cạnh, sáng chế hướng đến viên nang chứa tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) và/hoặc chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, viên nang là viên nang gelatin. Theo một số phương án, viên nang chứa tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả hoặc chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, viên nang có thể phân rã. Theo một số phương án, viên nang là viên nang gelatin có thể phân rã.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến chế phẩm chứa tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô được bao nang, trong đó bột đông khô được bao nang bằng cách phân tán bột đông khô trong dầu được làm nóng. Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến chế phẩm chứa tế bào *M. elsdenii* đông khô được bao nang, trong đó bột đông khô được bao nang bằng cách phân tán bột đông khô trong dầu được làm nóng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến bộ kit hoặc bao gói chứa tế bào *M. elsdenii*, chất phụ gia thực phẩm, thực phẩm, và/hoặc các chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Bộ kit hoặc bao gói có thể bao gồm các đơn vị chất phụ gia thực phẩm, thực phẩm, chế phẩm, hoặc tổ hợp của chúng (ví dụ, một hoặc nhiều đơn vị). Theo một số phương án, bộ kit chứa tế bào đông khô được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả, hoặc viên nang như được mô tả trong bản mô tả này.

Phương pháp dùng tế bào vi khuẩn yếm khí, tế bào vi khuẩn hiếu khí và/hoặc tế bào nấm men cho động vật

Theo một khía cạnh, sáng chế hướng đến phương pháp dùng tế bào *M. elsdenii* cho động vật.

Theo một khía cạnh, sáng chế hướng đến phương pháp dùng tế bào *Megasphaera* cho động vật.

Theo một khía cạnh, sáng chế hướng đến phương pháp dùng tế bào vi khuẩn yếm khí cho động vật. Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp dùng tế bào *Bifidobacterium*, như *B. breve*, tế bào *Lactobacillus*, như *L. plantarum*, tế bào

Bifidobacterium, như *B. animalis* subsp. *lactis*, tế bào *Pediococcus*, như *P. acidilactici*, tế bào *Lactobacillus*, như tế bào *L. casei* cho động vật.

Theo một khía cạnh, sáng chế hướng đến phương pháp dùng tế bào vi khuẩn hiếu khí cho động vật. Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp dùng tế bào *Bacillus*, như tế bào *B. subtilis* cho động vật.

Theo một khía cạnh, sáng chế hướng đến phương pháp dùng tế bào nấm men cho động vật. Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp dùng tế bào *Saccharomyces*, như *S. boulardii* và tế bào *S. cerevisiae* cho động vật.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm dùng cho động vật tế bào *M. elsdenii*, chất phụ gia thực phẩm, thực phẩm hoặc chế phẩm (ví dụ, viên nang) như được mô tả trong bản mô tả này.

Việc dùng có thể là đường dùng kỳ tuyền thích hợp, bao gồm, ví dụ, qua đường uống (tức là, chất lỏng hoặc chất rắn ăn được, liều thuốc nước đường uống, chất phụ gia thực phẩm, thực phẩm, chế phẩm, hoặc viên nang), bằng cách xịt lên cơ thể (tức là, bằng cách phun sương), và/hoặc tiêm.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc dùng chất rắn, chất lỏng, hoặc gel chứa tế bào *M. elsdenii*.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc dùng chất phụ gia thực phẩm dạng rắn chứa tế bào. Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm dạng rắn là bột (ví dụ, bột chảy được), viên cốm (tức là, viên cốm), hạt (tức là, hạt), viên, bánh, thể đặc tan trong nước, hồ nhão, viên thuốc lớn, viên nén, bụi, thành phần của chúng, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc dùng chất phụ gia thực phẩm dạng lỏng chứa tế bào. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc dùng tế bào ở dạng lỏng. Theo một số phương án, chất lỏng là dung dịch (ví dụ, dung dịch nước, hữu cơ, hoặc nước vô cơ), huyền phù, nhũ tương, liều thuốc nước, xịt, tiêm được, đồ uống (ví dụ, sản phẩm thay thế sữa), thành phần của chúng, hoặc tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, chất lỏng được dùng qua đường uống hoặc bằng cách phun chất lỏng này lên động vật.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc kết hợp tế bào *M. elsdenii* hoặc chất phụ gia thực phẩm chứa tế bào với chất phụ gia thực phẩm khác dùng cho động vật để tạo ra sản phẩm bổ sung hoặc hỗn hợp trộn trước để bổ sung vào thức ăn cho động vật. Theo một số phương án, chất phụ gia thực phẩm khác chứa tế bào ngoài *M. elsdenii*.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) có thể được bổ sung vào chất phụ gia thực phẩm dưới dạng chất lỏng (ví dụ, trong *canh thang* hoặc dạng tương đương canh trường, bao gồm, ví dụ, tế bào đông khô được tái hydrat hóa), hồ nhão tế bào được hoàn nguyên, hoặc dạng tế bào được đông khô (ví dụ, đông khô). Vi sinh vật, bao gồm *M. elsdenii* đông khô cũng có thể được bao nang trước khi bổ sung vào chất phụ gia thực phẩm. Dạng liều lượng (ví dụ liều thuốc nước có thể tích định trước hoặc viên nang) cũng có thể được tạo ra và, nếu muốn, vi sinh vật có thể được bổ sung trực tiếp vào thức ăn cho động vật, như bằng cách phun rắc canh trường lỏng và/hoặc tế bào đông khô trên thức ăn hoặc trộn vào trong thức ăn.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc tái hydrat hóa chất phụ gia thực phẩm dạng rắn (ví dụ, bột, viên cốm, hạt, viên, bánh, tế bào đông khô, hoặc tổ hợp của chúng) để tạo ra chất lỏng trước khi dùng.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc đưa tế bào *M. elsdenii* vào thức ăn cho động vật qua hệ thống phân phối mà tái hydrat chất phụ gia thực phẩm dạng rắn hoặc tế bào đông khô, bao gồm trên cơ sở hàng loạt. Ví dụ, bột đông khô có thể được đưa vào phễu polyvinyl vào trong hệ thống phun nước, mà pha loãng bột rồi phun lên thức ăn được trộn.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc đưa tế bào *M. elsdenii* vào thức ăn cho động vật bằng cách sử dụng thiết bị đo thể tích với thùng lưu trữ. Ví dụ, tế bào đông khô (ví dụ, bột chứa tế bào) có thể được bảo quản trong thùng lưu trữ và được xả vào trong nước hoặc bồn nước ngay trước khi phun lên thức ăn cho động vật.

Theo một khía cạnh, sáng chế hướng đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh hoặc rối loạn đi kèm với việc sản xuất axit lactic trong ống dạ dày-ruột của động vật, bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) như được mô tả trong bản mô tả, tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất

bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả, hoặc chế phẩm (ví dụ, viên nang) như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là chứng nhiễm toan. Theo một số phương án, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là chứng nhiễm toan dạ cỏ. Theo một số phương án, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh hô hấp. Theo một số phương án, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh viêm móng ngựa. Theo một số phương án, tình trạng bệnh hoặc rối loạn là bệnh lây nhiễm. Theo một số phương án, bệnh lây nhiễm là nhiễm *Salmonella* hoặc *Campylobacter*. Theo một số phương án, *Salmonella* là *Salmonella enterica* và/hoặc *Salmonella bongori*. Theo một số phương án, kiểu huyết thanh *Salmonella* là *Salmonella Typhimurium* và/hoặc *Entiritidis*. Theo một số phương án, *Campylobacter* là *Campylobacter jejuni* hoặc *Campylobacter coli*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm sự sinh trưởng của vi sinh vật cơ hội trong ống dạ dày-ruột của động vật, bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) như được mô tả trong bản mô tả, tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả, hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, vi sinh vật cơ hội là mầm bệnh. Theo một số phương án, vi sinh vật cơ hội là *Salmonella* or *Campylobacter*. Theo một số phương án, *Salmonella* là *Salmonella enterica* và/hoặc *Salmonella bongori*. Theo một số phương án, kiểu huyết thanh *Salmonella* là *Salmonella Typhimurium* và/hoặc *Entiritidis*. Theo một số phương án, *Campylobacter* là *Campylobacter jejuni* hoặc *Campylobacter coli*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp cải thiện độ sinh khả dụng của phospho có nguồn gốc thực vật trong chế độ ăn của động vật, bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) như được mô tả trong bản mô tả, tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả, hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii*

có hoạt tính phytaza. Theo một số phương án, phương pháp làm giảm chất thải hữu cơ trong môi trường từ việc dùng chế độ ăn cho động vật không có tế bào *M. elsdenii*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp cải thiện hiệu suất sinh trưởng ở động vật, bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) như được mô tả trong bản mô tả, tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả, hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, hiệu suất sinh trưởng được cải thiện ở động vật là cải thiện về: mức hấp thu thức ăn, mức tăng cân trung bình hàng ngày, chỉ số chuyển hóa thức ăn, mức tăng thân thịt, mức sản xuất sữa ở động vật sản xuất sữa, mức sản xuất trứng ở gia cầm, mức khoáng hóa xương, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng đến phương pháp axit hóa ống dạ dày-ruột dưới của động vật, bao gồm việc dùng cho động vật một lượng hữu hiệu của tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) như được mô tả trong bản mô tả, tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả, hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, ống dạ dày-ruột dưới là manh tràng của động vật gia cầm.

Theo một số phương án, tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) như được mô tả trong bản mô tả, tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả, hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả được dùng trước khi, đồng thời với, hoặc sau khi cho động vật ăn thức ăn.

Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc trộn tế bào *M. elsdenii* đông khô như được mô tả trong bản mô tả, tế bào đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, hoặc chất phụ gia thực phẩm dạng rắn như được mô tả trong bản mô tả với chất lỏng trước khi dùng.

Theo một số phương án, chất lỏng được dùng qua đường uống (ví dụ, liều thuốc nước dùng qua đường uống) hoặc bằng cách phun (ví dụ, phun sương) chất lỏng lên cơ thể động vật.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm một lần dùng tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) như được mô tả trong bản mô tả, tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả, hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc dùng hàng ngày tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) như được mô tả trong bản mô tả, tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả, hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, việc dùng ít nhất là một lần mỗi ngày, ít nhất là hai lần mỗi ngày, ít nhất ba lần mỗi ngày, hoặc nhiều hơn ba lần mỗi ngày. Theo một số phương án, việc dùng là tùy thích (ví dụ, tự dùng bằng cách uống chất lỏng sẵn có hoặc ăn thực phẩm chứa tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô), tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm, hoặc chế phẩm).

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm nhiều hơn một lần dùng trong một ngày tế bào *M. elsdenii* (ví dụ, tế bào đông khô) như được mô tả trong bản mô tả, tế bào *M. elsdenii* đông khô được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong bản mô tả, chất phụ gia thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả, hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, việc dùng là hai, ba, bốn, năm, sáu, hoặc nhiều hơn sáu lần dùng trong một ngày. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm nhiều hơn một lần dùng trong một ngày sau một hoặc nhiều ngày không dùng. Theo một số phương án, một hoặc nhiều ngày không dùng là một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu ngày, một tuần, hai tuần, ba tuần, hoặc bốn tuần, một tháng, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, năm tháng, hoặc sáu tháng không dùng.

Theo một số phương án, động vật là động vật nhai lại. Theo một số phương án, động vật nhai lại có thể là, nhưng không bị giới hạn ở, gia súc, trâu, cừu, dê, nai, tuần lộc, nai sừng tấm Bắc Mỹ, hươu cao cổ, bò tây tạng, và nai sừng tấm. Theo một số phương án, động vật nhai lại được chọn từ nhóm gồm: gia súc, trâu, cừu, dê, nai, và tuần lộc.

Theo một số phương án, động vật là động vật không nhai lại. Theo một số phương án, động vật không nhai lại can be, nhưng không bị giới hạn ở, ngựa, gia cầm, lợn, chó, và mèo. Theo một số phương án, động vật không nhai lại được chọn từ nhóm gồm: ngựa, gia cầm, và lợn.

Theo một số phương án, động vật là động vật trong vườn thú.

Theo một số phương án, động vật là động vật gia cầm. Theo một số phương án, động vật gia cầm là loài lông vũ (tức là, chim) mà được sử dụng làm động vật thực phẩm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, gà, ngỗng, vịt, chim cút, gà tây, chim bồ câu, đà điểu sa mạc, hoặc đà điểu châu Phi. Theo một số phương án, động vật gia cầm được chọn từ nhóm gồm: gà, ngỗng, vịt, chim cút, gà tây, hoặc chim bồ câu. Theo một số phương án, động vật gia cầm được chọn từ nhóm gồm: gà hướng thịt, gà sinh sản hướng thịt, và gà sinh sản hướng trứng. Theo một số phương án, động vật gia cầm là gà.

Theo một số phương án, động vật là ngựa. Theo một số phương án, ngựa là ngựa, ngựa pony, lừa, hoặc la.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phần ví dụ dưới đây mà cùng với phần mô tả nêu trên minh họa một số phương án của sáng chế theo cách không nhằm mục đích giới hạn.

Ví dụ 1: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên năng suất của giống nuôi cấy lỏng *M. elsdonii*

Nhiệt độ bảo quản là 4 °C, 20 °C, và 39 °C, được thử nghiệm để đánh giá khả năng sống của tế bào trong giống nuôi cấy lỏng *M. elsdonii* NCIMB 41125 (Lactipro®) sau 0, 7, 14, 21, và 28 ngày. Các kết quả cho thấy rằng việc bảo quản sản phẩm ở 4 °C đã cải thiện một cách đáng kể ($P < 0,001$) khả năng sống của giống nuôi cấy so với việc bảo quản ở 20 °C hoặc 39 °C, không liên quan đến ngày lấy mẫu. Sau 28 ngày, sản phẩm bảo quản ở 4 °C có $3,98 \times 10^6$ đơn vị tạo khuẩn lạc trên mỗi mililit (CFU/mL) so với $1,26 \times 10^6$ và $6,3 \times 10^5$ CFU/mL đối với sản phẩm bảo quản ở 20 °C hoặc 39 °C, tương ứng ($P < 0,01$; **FIG. 1**). Vì thế, kết quả này thể hiện rằng nhiệt độ bảo quản giảm làm cải thiện khả năng sống của giống nuôi cấy lỏng *M. elsdonii* NCIMB 41125.

Dữ liệu bổ sung từ một nghiên cứu riêng đã thể hiện rằng *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 thu được ở dạng giống nuôi cấy lỏng (Lactipro advance®) giảm sau 0, 7, 14, 21, và 28 ngày bảo quản ở nhiệt độ trong phòng (**FIG. 2**).

Ví dụ 2: Sử dụng lọc dòng tiếp tuyến để cô giống nuôi cấy *M. elsdenii*

Lọc dòng tiếp tuyến (TFF) được nghiên cứu là phương pháp để cô thể tích lớn giống nuôi cấy ở công suất cao.

Hệ thống TFF quy mô thử nghiệm (xem **FIG. 3**) được tích hợp vào dây chuyền sản xuất *M. elsdenii* và được thử nghiệm ở các quy trình sản xuất hàng loạt 500 Lit (L) để đánh giá hệ thống quy mô thử nghiệm ở mức giảm thể tích là 70%, 80%, và 90%. Môđun TFF với một màng RC 100 kDa (chiều cao kênh 0,875 mm) được sử dụng. Ba quy trình sản xuất hàng loạt được thực hiện cho mỗi mức giảm trong tổng số chín lần chạy. Các mẫu được thu thập đối với mỗi lần chạy và được phân tích độ pH, mật độ quang (OD), sự có mặt hoặc vắng mặt chất gây nhiễm hiếu khí, nồng độ mol, profin axit béo dễ bay hơi, nồng độ *M. elsdenii*, và đặc điểm sinh trưởng. Các mẫu được thu thập từ chín giống nuôi cấy *M. elsdenii* ("không đông khô") trước khi bắt đầu lọc, từ phần thấm qua ("thấm"), mà là thể tích được loại bỏ bởi hệ thống, và từ phần cô đặc ("lưu lại"), là thể tích giống nuôi cấy *M. elsdenii* được cô chứa tế bào còn lại sau khi giảm thể tích.

Các mẫu phần thấm qua được thu thập từ lúc bắt đầu, giữa, và kết thúc quá trình cô có các chỉ số đọc OD thống nhất ở các mức giảm thể tích, đều dưới 0,045 (dữ liệu không được thể hiện). Lượng *M. elsdenii* được thu hồi trong phần thấm qua tăng trong quá trình cô ($P = 0,0006$), nhưng vẫn không đáng kể (nhỏ hơn 3×10^4 CFU/mL) so với lượng tế bào được thu thập trong phần cô đặc ($< 0,002\%$). Mức giảm thể tích không có tác dụng đối với nồng độ *M. elsdenii* được thu hồi trong nước thấm ($P > 0,9$; **bảng 2**).

Bảng 2. Năng suất *M. elsdenii* trung bình các mẫu được thu thập trong chín quy trình sản xuất hàng loạt được thực hiện để đánh giá hệ thống TFF quy mô thử nghiệm ở mức giảm thể tích 70%, 80%, và 90%

Các mẫu	CFU/mL, Log10			Sai số chuẩn	Hiệu ứng Trt, Giá trị P-
	70%	80%	90%		
Phần thấm qua	1,19	1,07	1,12	0,40	0,958
Phần cô đặc	8,99	9,04	9,25	0,03	<0,0001

Năng suất *M. elsdenii* trong phần cô đặc không khác biệt trong các túi được thu thập từ lúc bắt đầu, giữ, và kết thúc mỗi quá trình đóng túi ($P = 0,6088$; dữ liệu không được thể hiện). Năng suất trong phần cô đặc bị ảnh hưởng bởi mức giảm thể tích ($P < 0,0001$; bảng 2 và FIG. 4). Phần cô đặc ở mức giảm thể tích 90% có năng suất cao hơn phần cô đặc ở mức giảm thể tích 70% và 80% ($P < 0,0001$). Nhưng, phần cô đặc ở mức 70% và 80% không khác biệt với nhau ($P > 0,09$).

Quy trình lọc không ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của tế bào *M. elsdenii* khi được chủng ngược vào môi trường SDL-20 (Bảng 3). Độ dốc của pha tăng trưởng theo cấp số nhân không bị ảnh hưởng bởi mức giảm thể tích ($P > 0,3$), nhưng bị ảnh hưởng bởi loại mẫu: "Phần cô đặc" đối với "Không đông khô" ($P < 0,001$). Giai đoạn tiềm phát bị ảnh hưởng bởi cả mức giảm thể tích và loại mẫu ($P < 0,001$). Giai đoạn tiềm phát đối với phần cô đặc giảm khi mức giảm thể tích tăng, mà đại diện cho nồng độ tế bào cao hơn.

Bảng 3. So sánh độ dốc và giai đoạn tiềm phát giữa *M. elsdenii* ban đầu (trước khi lọc = không đông khô) và phần cô đặc (sau khi lọc) được thu thập trong quá trình thực hiện TFF giảm thể tích

	Loại mẫu						Tác động, Giá trị P		
	Không đông khô			Phần cô đặc			Loại mẫu	Mức giảm thể tích	Tương tác
	70%	80%	90%	70%	80%	90%			
Độ dốc	0,39	0,36	0,37	0,44	0,42	0,43	<0,001	0,329	0,979
Giai đoạn tiềm phát, giờ	1,42 ^a	1,10 ^b	1,07 ^b	0,32 ^c	0,29 ^c	0,24 ^c	0,001	<0,001	<0,001

Ví dụ 3: Các thông số đông lạnh và đông khô đối với *M. elsdenii*

A. Đông lạnh và đông khô phần cô đặc

Phần cô đặc thu được qua TFF được sử dụng để thử nghiệm quy trình đông lạnh, bao gồm chất bảo quản đông lạnh, và các thông số quy trình đông khô khác nhau.

Phần cô đặc được chuyển sang chai huyết thanh được loại khí vô trùng và tiệt trùng được trộn với các chế phẩm bảo quản đông lạnh khác nhau (khối lượng/thể tích): không có chất bảo quản đông lạnh (Ctrl), sữa tách béo (SM), trehaloza (T), và betain. Các phần cô đặc được trộn với chất bảo quản đông lạnh thích hợp được lấy mẫu để xác định nồng độ *M. elsdenii* được đông khô trước (tức là, số lượng sống sót). Các hỗn hợp được chuyển sang lọ 10 mL (4 mL/lọ) và được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng hoặc đông lạnh chậm ở -80 °C qua đêm. Các lọ được chuyển sang thiết bị đông khô để được đông khô bằng cách sử dụng chu trình chậm hoặc nhanh. Khi việc đông khô hoàn thành, mức sống sót của vi khuẩn được xác định bằng cách huyền phù lại sản phẩm được đông khô trong buồng yếm khí với chất pha loãng yếm khí, cho phép nó tái hydrat trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó dàn mỏng lên trên aga SDL20.

Mức tổn thất tế bào được tính bằng cách trừ nồng độ *M. elsdenii* được thu hồi sau khi đông khô từ nồng độ ban đầu của *M. elsdenii* được đo trong phần cô đặc tương ứng được trộn với chất bảo quản đông lạnh hoặc không. Phần mềm SAS® được sử dụng để tính dữ liệu tổn thất tế bào bằng cách phân tích sự tương tác giữa mức giảm thể tích (70%, 80%, hoặc 90%), chu trình đông khô (chậm so với nhanh), phương pháp đông lạnh (-80 °C so với Nitơ lỏng), chất bảo quản đông lạnh (không có, Betain, Trehaloza, Sữa tách béo, Maltodextrin, Trehaloza/Sữa tách béo (T/SM), và Maltodextrin/Sữa tách béo (M/SM)).

Mức độ tổn thất tế bào quan sát được trong xử lý đối chứng (không chất bảo quản đông lạnh) không liên quan đến các tiêu chuẩn khác là 5 Log (CFU/mL) hoặc cao hơn. Tương tự, mức độ tổn thất tế bào quan sát được trong việc xử lý bằng betain không liên quan đến các tiêu chuẩn khác là 3,96 Log CFU/mL hoặc cao hơn. Giới hạn tổn thất tế bào chấp nhận được được thiết lập ở 1,6 log CFU/mL. Phần cô đặc được trộn với T/SM hoặc M/SM đều dưới ngưỡng không liên quan đến chu trình đông khô hoặc phương pháp đông

lạnh được sử dụng ngoại trừ T/SM đông lạnh ở -80°C và đông khô bằng cách sử dụng chu trình chậm hoặc nhanh (FIG. 5).

B. Ảnh hưởng của điều kiện đông khô với việc bảo quản

Megasphaera elsdenii NCIMB 41125 được cô 10x bằng thiết bị lọc, và thử nghiệm đông khô được thực hiện để kiểm tra các đặc điểm khác nhau: đông lạnh ban đầu nhanh hoặc chậm (nitơ lỏng đối với -20°C), có hoặc không có trehaloza (0%, 4%, 7,5%, và 10%), và chu trình đông khô chậm hoặc nhanh (38 giờ ở 2×10^{-6} Torr đối với 16,5 giờ ở 135×10^{-6} Torr). Tất cả quá trình đông khô được thử nghiệm thu được sản phẩm có thể giữ được khả năng sống thích hợp để bắt đầu sinh trưởng giống nuôi cấy sau khi tái hydrat, thậm chí sau khi bảo quản kéo dài từ 4 đến 12 tháng ở nhiệt độ trong phòng. Tuy nhiên, sự khác biệt về khả năng sống của vi khuẩn quan sát được phụ thuộc vào đặc điểm đông khô được sử dụng (FIG. 6). Đông khô chậm, kết hợp 7,5% trehaloza, và các bước đông khô nhẹ nhàng giữ được hoạt độ nước cuối cùng trên 0,04 đi kèm với mức sống sót của *Megasphaera elsdenii* cao hơn.

C. Ảnh hưởng của chất bảo quản đông lạnh lên khả năng sống của M. elsdenii đông khô

Các chế phẩm cô tế bào *M. elsdenii* NCIMB 41125 ly tâm được huyền phù lại trong sữa công thức dùng cho nhũ nhi trước khi đông khô, dẫn đến chỉ giảm 1 log về khả năng sống của tế bào khi tế bào sau đó được tái hydrat hóa. Việc bổ sung 4% trehaloza và 7,5% sữa tách béo vào chất cô *M. elsdenii* được thử nghiệm trước khi đông lạnh chậm ở -80°C hoặc đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng để xác định mức tổn thất tế bào gặp phải trong quá trình đông lạnh ban đầu. Như được thể hiện trên FIG. 7, việc đông lạnh nhanh với 4% trehaloza hoặc 7,5% sữa tách béo đạt được mức thu hồi tế bào sống cao hơn (giảm 0,79 log về số lượng tế bào sống). Sản phẩm không bổ sung các chất bảo quản đông lạnh, không liên quan đến việc đông lạnh kỹ thuật được sử dụng, tổn thất từ 2,34 đến 1,95 log CFU/mL *Megasphaera elsdenii*.

Ví dụ 4: Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản lên năng suất và độ ổn định của *M. elsdenii* đông khô

Để xác định sự ảnh hưởng của quy trình đông khô và điều kiện bảo quản lên đặc điểm sinh trưởng và thời hạn sử dụng của *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, phần cô đặc thu được từ mức giảm thể tích 90% được trộn với 8% trehaloza/15% sữa tách béo (T/SM) hoặc 8% maltodextrin/15% sữa tách béo (M/SM), đông lạnh ở -80°C hoặc trong nitơ lỏng (LiqN), và đông khô bằng chu trình nhanh. Các mẫu phần cô đặc sau đó được thử nghiệm về đặc điểm sinh trưởng của vi khuẩn và khả năng sống của tế bào trong khi bảo quản ở 4°C hoặc 25°C trong các điều kiện hiếu khí hoặc yếm khí trong 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, và 24 tuần bằng cách sử dụng phân tích đường cong sinh trưởng và kỹ thuật nuôi cấy trải. Tóm lại, các sản phẩm đã được bảo quản được lấy mẫu, được pha loãng theo chuỗi, và được trải mỏng trên đĩa aga SDL. Ngoài ra, môi trường sinh trưởng (SDL) được chủng (1:100) sản phẩm đông khô được tái hydrat hóa và mật độ quang (OD, 600 nm) được đọc cho đến khi giống nuôi cấy đạt đến giai đoạn ổn định. Thử nghiệm được lặp lại vào 3 ngày khác nhau và tất cả các xử lý được thực hiện ba lần giống nhau. Các mẫu đông khô tái hydrat hóa được pha loãng để thực hiện được cong sinh trưởng do nếu không pha loãng, độ hấp thụ vượt quá giới hạn do sự có mặt của sữa tách béo. Để hỗ trợ việc so sánh đường cong sinh trưởng, việc pha loãng mẫu được thực hiện trên các mẫu không đông khô được sử dụng làm đối chứng.

Kết quả: Các mẫu được đông khô và bảo quản ở nhiệt độ trong phòng hoặc 4°C trong các điều kiện hiếu khí hoặc yếm khí trong 6 tháng. Các mẫu được bảo quản trong các điều kiện hiếu khí không liên quan đến cách xử lý bị phân rã nhanh chóng với mức tổn thất tế bào bổ sung so với mẫu yếm khí tương đương nằm trong khoảng từ 0,4 đến 3,2 Log chỉ sau 2 tuần bảo quản. Dựa trên các kết quả này và tăng cường tính rõ ràng của số liệu, chỉ mức độ tổn thất tế bào quan sát được trong sản phẩm đông khô được bảo quản yếm khí được trình bày trên **FIG. 8**. Trong khi bảo quản trong điều kiện yếm khí, các mẫu bảo quản ở nhiệt độ trong phòng phân hủy nhanh hơn mẫu tương đương của chúng được bảo quản ở 4°C , ngoại trừ các mẫu T/SM được đông lạnh trong nitơ lỏng. Các mẫu T/SM được đông lạnh trong nitơ lỏng và bảo quản ở nhiệt độ trong phòng sau khi đông khô không bị tổn thất tế bào đáng kể hơn mẫu tương đương của chúng được bảo quản ở 4°C trong khoảng thời

gian bảo quản 16 tuần ($P > 0,1$). Tuy nhiên, sự khác biệt giữa các mẫu trở nên đáng kể khi nhiệt độ bảo quản trong khoảng từ nhiệt độ trong phòng đến 4°C sau 20 tuần bảo quản ($P = 0,0002$), với sự khác biệt 0,84 log sau 20 tuần và sự khác biệt 0,89 log sau 24 tuần bảo quản. Tất cả các mẫu M/SM phân hủy nhanh hơn mẫu tương đương T/SM của chúng. Sau 24 tuần bảo quản (FIG. 9), mức tổn thất tế bào của các mẫu T/SM được đông lạnh trong nitơ lỏng và bảo quản ở 4°C trong điều kiện yếm khí là thấp hơn một cách đáng kể so với các cách xử lý khác ($P < 0,02$). Các mẫu T/SM được đông lạnh trong nitơ lỏng và bảo quản ở 4°C trong điều kiện yếm khí có mức tổn thất là 2,16 log so với nồng độ *M. elsdenii* quan sát được trước khi đông khô, với mức tổn thất 0,82 log sau khoảng thời gian bảo quản 24 tuần. Vào mỗi ngày lấy mẫu, thử nghiệm đường cong sinh trưởng được thực hiện để so sánh đặc điểm sinh trưởng của sản phẩm đông khô của sản phẩm không đông khô. FIG. 10 thể hiện đường cong sinh trưởng được thực hiện trên các mẫu đông lạnh trong nitơ lỏng, đông khô với chu trình nhanh (18,5 giờ ở 250 mTorr), và được bảo quản yếm khí ở 4°C hoặc nhiệt độ trong phòng. Các mẫu không đông khô được sử dụng cho mỗi đường cong sinh trưởng là “mới” (không nhiều hơn 2 ngày tuổi). Sản phẩm đông khô được bảo quản ở 4°C có giai đoạn tiềm phát ngắn hơn sản phẩm đông khô được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng, mà phù hợp với sự khác biệt về nồng độ *M. elsdenii* quan sát được trong các mẫu này (bảng 4). Sau 16 tuần bảo quản các mẫu T/SM không liên quan đến nhiệt độ bảo quản có giai đoạn tiềm phát ngắn hơn các mẫu M/SM.

Bảng 4. Giai đoạn tiềm phát quan sát được trên mẫu không đông khô hoặc đông khô được tái hydrat hóa thu được từ phần cô đặc có mức giảm thể tích 90%, được trộn với 8% trehaloza/15% sữa tách béo (T/SM) hoặc 8% maltodextrin/15% sữa tách béo (M/SM), đông lạnh trong nitơ lỏng (LiqN), và đông khô bằng chu trình nhanh sau 12, 16, 20 hoặc 24 tuần bảo quản trong điều kiện yếm khí ở 4 hoặc 25°C

	Giai đoạn tiềm phát (giờ) sau X tuần bảo quản					
	12	16	20	24	Trung bình	Độ lệch chuẩn
Lactipro	2,50	2,75	3,75	1,75	2,69	0,72
M/SM được bảo quản ở 25°C	8,50	9,00	10,00	11,75	9,81	1,24
T/SM được bảo quản ở 25°C	6,50	6,75	7,25	8,00	7,13	0,57
M/SM được bảo quản ở 4°C	5,75	8,25	8,00	8,75	7,69	1,15
T/SM được bảo quản ở 4°C	4,25	5,25	5,00	4,75	4,81	0,37

Độ dốc của mẫu không đông khô và xử lý MSM bảo quản ở 25°C trong 12 tuần và xử lý MSM bảo quản ở 20°C trong 16 tuần là thấp bất thường (**bảng 5**). Sau 20 và 24 tuần bảo quản, độ dốc của pha tăng trưởng theo cấp số nhân của các mẫu đông khô không khác biệt về số học với đối chứng không đông khô.

Bảng 5. Độ dốc của pha tăng trưởng theo cấp số nhân quan sát được trên mẫu không đông khô hoặc đông khô tái hydrat hóa thu được từ phần cô đặc có mức giảm thể tích 90%, được trộn với 8% trehaloza/15% sữa tách béo (T/SM) hoặc 8% maltodextrin/15% sữa tách béo (M/SM), đông lạnh trong nitơ lỏng (LiqN), và đông khô bằng chu trình nhanh sau 12, 16, 20 hoặc 24 tuần bảo quản trong điều kiện yếm khí ở 4 hoặc 25°C

	Độ dốc của pha cấp số nhân sau X tuần bảo quản					
	12	16	20	24	Trung bình	Độ lệch chuẩn
Lactipro	0,22	0,31	0,34	0,31	0,30	0,04
M/SM được bảo quản ở 25°C	0,24	0,18	0,33	0,29	0,26	0,05
T/SM được bảo quản ở 25°C	0,31	0,30	0,34	0,32	0,32	0,02
M/SM được bảo quản ở 4°C	0,30	0,33	0,30	0,30	0,31	0,01
T/SM được bảo quản ở 4°C	0,32	0,31	0,33	0,32	0,32	0,01

Ví dụ 5: Ảnh hưởng và độ an toàn của *M. elsdenii* đông khô ở gia súc

A. Hiệu quả và thời hạn sử dụng sản phẩm đông khô.

Lọ được sử dụng trong thử nghiệm này là giống nuôi cấy *M. elsdenii* tái hydrat hóa trước (để xử lý tái hydrat hóa và rắc trộn lên bề mặt) được chuẩn bị 56 ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm và được bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C trong khi chờ sử dụng. Mỗi lọ chứa dạng tương đương của 5 mL sản phẩm đông khô. Lọ được đông khô trong 6 quy trình đông khô khác nhau. Đối với mỗi quy trình, 3 lọ được tái hydrat hóa sau khi đông khô và 3 lọ bổ sung được tái hydrat hóa vào ngày thử nghiệm để xác định nồng độ *M. elsdenii* trong mỗi lọ (**bảng 6**). Động vật từ nhóm sử dụng sản phẩm tái hydrat hóa và rắc trộn bề mặt

được nhận hàm lượng trong lọ ở dạng thuốc nước, tương đương với $1,84 \times 10^{10}$ CFU *M. elsdenii*.

Bảng 6 Nồng độ *M. elsdenii* sau khi đông khô và vào ngày thử nghiệm sau 56 ngày bảo quản ở 4°C

Chu trình đông khô-Lọ	CFU mỗi lọ	
	Sau đông khô	Vào ngày thử nghiệm
Chu trình#1	2,37E+10	1,70E+10
Chu trình# 2	2,37E+10	1,97E+10
Chu trình#3	3,31E+10	1,86E+10
Chu trình#4	3,41E+10	1,81E+10
Chu trình#5	1,98E+10	1,57E+10
Chu trình#6	2,34E+10	2,14E+10
Trung bình	2,63E+10	1,84E+10

Sau khi bắt đầu thử nghiệm, các lọ bổ sung từ lần chạy #5 và #6 được giữ ở 4°C và 3 lọ từ mỗi lần chạy trong số các lần chạy này được tái hydrat hóa từng tháng (**FIG. 11**).

Nồng độ *M. elsdenii* trong lọ được thay đổi từ $4,96 \times 10^{10}$ CFU/g đến $4,17 \times 10^{10}$ CFU/g trong 11 tháng bảo quản ở 4°C, chỉ thất thoát 0,07 log.

Sản phẩm được sử dụng trong thử nghiệm này là giống nuôi cấy *M. elsdenii* rắc trộn bề mặt hàng ngày (chế phẩm điều trị rắc trộn bề mặt) được chuẩn bị khoảng 30 ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm và được bảo quản trong tủ lạnh trong túi polyfoil. Sản phẩm rắc trộn bề mặt được đông khô trong 6 quy trình đông khô khác nhau, được bao gói trong 15 túi polyfoil riêng rẽ (1 túi/ngày khi ăn), được rửa bằng nitơ, bịt kín, và bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng. Đối với mỗi quy trình đông khô, 3 túi được tái hydrat hóa sau khi đông khô. Nồng độ *M. elsdenii* trung bình là 4×10^{10} CFU/túi. Ba túi nữa được tái hydrat hóa tại lúc bắt đầu mỗi tuần và được sử dụng để xác định nồng độ *M. elsdenii* được cung cấp cho động vật hàng ngày bằng cách bổ sung dung dịch tế bào *M. elsdenii* tái hydrat hóa, cho phép tế bào để yên trong 40 phút, pha loãng tế bào, và dàn mỏng tế bào (**FIG. 12**). Phân tích thống kê đã chỉ ra việc tăng nồng độ tế bào theo thời gian. Tất cả các sản phẩm được chuẩn bị 30 ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm, và sản phẩm được sử dụng dưới dạng chế phẩm rắc trộn bề mặt khoảng 80 ngày tuổi tại thời điểm kết thúc thử nghiệm. Động vật được nhận trung bình $2,19 \times 10^8$ CFU *M. elsdenii* hàng ngày ($2,45 \times 10^{10}$ CFU/gói).

B. Thử nghiệm trên gia súc

Nghé thiên (n = 462; thể trọng ban đầu 900 lbs) được chặn bởi khối lượng và được chia ngẫu nhiên vào một trong bốn nhóm điều trị, bao gồm: Nhóm đối chứng không nhận *Megasphaera elsdenii* (17 bãi rào kín; 7 đầu/bãi rào kín); Nhóm không đông khô nhận 50 mL sản phẩm *M. elsdenii* chứa 2×10^8 CFU/mL (10^{10} CFU *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125) trước (16 bãi rào kín; 7 đầu/bãi rào kín); Nhóm tái hydrat hóa nhận giống nuôi cấy đông khô được tái hydrat hóa ngay trước khi dùng (10^{10} CFU *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125) trước (16 bãi rào kín; 7 đầu/bãi rào kín); và Nhóm rắc trộn bề mặt nhận giống nuôi cấy đông khô được tái hydrat hóa ngay trước khi dùng (10^{10} CFU *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125) trước và sản phẩm được đông khô được kết hợp vào chế độ ăn dưới dạng rắc trộn bề mặt hàng ngày trong thời gian thử nghiệm (10^8 CFU *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 hàng ngày; 17 bãi rào kín; 7 đầu/bãi rào kín). Các nhóm nghé thiên được nhận các sản phẩm không đông khô, tái hydrat hóa, và rắc trộn bề mặt được đặt vào chương trình tăng cường 10 ngày sau khi nhận liệu thuốc nước *Megasphaera elsdenii* trước đó, trong khi đó nhóm đối chứng được đặt vào chương trình 21 ngày tăng cường. Dịch dạ cỏ được chiết bằng cách đâm thủng dạ cỏ bằng một dùi chọc và ống thông để cho phép thoát khí 26 giờ sau khi khẩu phần đầu tiên được cho ăn. Các mẫu dịch dạ cỏ được phân tích độ pH, nồng độ axit béo dễ bay hơi, mức nội độc tố, và khả năng sử dụng axit lactic trong xét nghiệm biến mất trong ống nghiệm. Đối với xét nghiệm biến mất lactat trong ống nghiệm, 10 ống 10mL chứa môi trường lactat bán xác định được chủng bằng 0,1 mL dịch dạ cỏ. Mật độ quang được đo hai lần mỗi 6 giờ trong khoảng thời gian 24 giờ để đánh giá khả năng sinh trưởng với axit lactic làm cơ chất chủ yếu. Các ống được đặt trong tủ đông ngay lập tức sau đó mật độ quang quan sát được để sau đó xác định nồng độ. Một con nghé thiên cho mỗi bãi rào kín được lắp với thiết bị tiêm liều lớn tần số vô tuyến, liên tục để phát hiện độ pH trong thời gian nghiên cứu 56 ngày. Nghé thiên được cân vào ngày 0, 28, và 56 để xác định mức tăng cân trung bình hàng ngày, lượng hấp thu chất khô, và hiệu quả thức ăn.

Để đánh giá *M. elsdenii* sống được động vật ăn vào, sản phẩm đông khô được rắc lên trên ngô nghiền tiệt trùng trong chảo nhôm và thu thập các mẫu sau 0, 1, 2, và 4 giờ tiếp xúc với không khí môi trường trong phòng thí nghiệm hoặc bên ngoài dưới mặt trời.

Thử nghiệm được lặp lại 4 lần trong thời gian các tháng 7 và 8 năm 2016 (FIG. 13). Phân tích thống kê cho thấy rằng sự tương tác giữa thời gian tiếp xúc và điều kiện bảo quản ($P = 0,0007$), ảnh hưởng của thời gian tiếp xúc ($P < 0,0001$), và ảnh hưởng của điều kiện bảo quản ($P < 0,0001$). Nồng độ *M. elsdenii* trong sản phẩm đông khô được trộn với ngô nghiền và được tiếp xúc với không khí trong phòng thí nghiệm giảm về số lượng trong thời gian tiếp xúc 4 giờ nhưng không khác biệt một cách đáng kể với nồng độ ban đầu. Nồng độ *M. elsdenii* trong các mẫu được tiếp xúc với điều kiện bên ngoài giảm nhanh hơn nhiều. Sau 1 giờ tiếp xúc, chỉ 6,4% *M. elsdenii* ban đầu được thu hồi. Nồng độ *M. elsdenii* trong các mẫu được tiếp xúc với điều kiện bên ngoài khác biệt một cách đáng kể với nồng độ ban đầu và mẫu tương đương của chúng được giữ ở nhiệt độ trong phòng sau 2 và 4 giờ tiếp xúc. Nồng độ *M. elsdenii* trong các mẫu này rất khác nhau giữa thử nghiệm này với thử nghiệm khác, như thể hiện bởi độ lệch chuẩn lớn. Điều này có thể là do sự khác biệt giữa điều kiện bên ngoài (nhiệt và độ ẩm), mà còn bởi sự khác biệt giữa các sản phẩm đông khô được sử dụng có thể chịu được nhiệt và độ ẩm tốt hay kém. Trong quá trình nghiên cứu ở động vật, sản phẩm đông khô được trộn với ngô nghiền ngay trước khi cho ăn và sau đó ngay lập tức được rắc lên thức ăn và được đặt lên giá. Động vật vội vàng ăn ngô nghiền và sau đó sản phẩm đông khô có thể ăn vào ít hơn 1 giờ sau khi trộn. Giả sử rằng sản phẩm được ăn trong vòng một giờ, động vật nên được nhận khoảng $1,4 \times 10^7$ CFU/đầu/ngày tế bào sống (6,4 % nồng độ trung bình trong sản phẩm rắc trộn bề mặt $2,2 \times 10^8$ CFU/đầu/ngày).

Việc tăng cường cho ghé thiên bằng *M. elsdenii* dẫn đến thể trọng tương đương 28 ngày ($P = 0,53$; bảng 7), mức tăng cân trung bình hàng ngày ($P = 0,71$), và hiệu quả thức ăn ($P = 0,69$). Việc điều trị bằng chế phẩm rắc trộn bề mặt có lượng hấp thu chất khô cao hơn đối chứng ($P = 0,05$). Hiệu suất vỗ béo trong 56 ngày cho ăn đầu tiên tạo ra kết quả tương tự trong số các việc điều trị ($P > 0,10$). Với đối chứng nhận khoảng tăng tốc 21 ngày liên tiếp, việc tương tự giữa các nhóm điều trị này chỉ ra rằng chương trình tăng tốc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bất kỳ trong số ba dạng điều trị *M. elsdenii* mà không gây ảnh hưởng bất lợi cho thể trạng gia súc hoặc hiệu suất vỗ béo.

Độ pH dịch dạ cỏ (được chiết 26 giờ sau khi cho ăn khẩu phần ăn đầu tiên) là tương tự giữa các nhóm điều trị ($P > 0,10$; Bảng 8). có sự khác biệt về tổng nồng độ VFA với

nhóm điều trị bằng chế phẩm rắc trộn bề mặt là cao hơn một cách đáng kể so với các nhóm điều trị khác ($P < 0,01$). Nhóm điều trị bằng chế phẩm rắc trộn bề mặt có nồng độ axetat cao hơn nhóm điều trị bằng chế phẩm tái hydrat hóa ($P = 0,02$). Mặc dù có một sự khác biệt đáng kể về nồng độ axetat, tỷ lệ axetat:propionat là tương tự giữa các nhóm điều trị ($P = 0,96$). Các VFA khác tương tự giữa các nhóm điều trị ($P > 0,18$).

Nồng độ nội độc tố trong dịch dạ cỏ (được chiết 26 giờ sau khi cho ăn khẩu phần ăn đầu tiên) là tương tự giữa các nhóm điều trị ($P = 0,3462$; **FIG. 14**). Mức nội độc tố được xác định làm chỉ số ly giải vi khuẩn trong dạ cỏ. Động vật bị chứng nhiễm toan được thông báo có mức nội độc tố lớn hơn 150000 EU/mL. Mức nội độc tố được đo trong thử nghiệm này đều dưới ngưỡng không liên quan đến việc điều trị.

Một con nghé thiện trong mỗi bãi rào kín trong số 32 bãi rào kín được trang bị đầu dò pH dạ cỏ bên trong (8 Nghé thiện/nhóm điều trị) mà được thông báo chỉ số pH dạ cỏ hàng giờ trong quá trình thử nghiệm 56 ngày (**FIG. 15**). Chỉ số pH dạ cỏ trung bình của mỗi nhóm điều trị được thông báo mỗi khoảng thời gian 1 giờ trên **FIG. 15**. Tương tác nhóm điều trị theo ngày ($P < 0,01$) được phát hiện đối với độ pH dạ cỏ. Cũng có sự ảnh hưởng của nhóm ($P < 0,01$) và ngày cho ăn ($P < 0,01$) lên độ pH dạ cỏ. Việc tăng cường được thúc đẩy của các nhóm điều trị bằng *M. elsdenii* không làm cho độ pH dạ cỏ trung bình giảm thành tình trạng chứng nhiễm toan lâm sàng. Khi ngày cho ăn tăng, nhóm điều trị bằng chế phẩm được đông khô (tái hydrat hóa và rắc trộn bề mặt) giữ được độ pH dạ cỏ cao hơn so với nhóm đối chứng và nhóm điều trị bằng chế phẩm không đông khô.

Bảng 7. Năng suất vỗ béo

Mục	Đối chứng	Không đông khô	Tái hydrat hóa	Rắc trộn bề mặt	SEM	Giá trị P
Thể trọng ban đầu, lb	902	898	900	900	12,2	0,69
Ngày 1-28						
Mức tăng cân trung bình hàng ngày, lb	5,59	5,49	5,32	5,38	0,18	0,71
Lượng hấp thu chất khô, lb ¹	21,94 ^a	21,53 ^{a,b}	21,30 ^{a,b}	20,66 ^b	0,39	0,05
Tăng trọng/thức ăn	0,2559	0,2596	0,2489	0,2594	0,007	0,69
Ngày 28 thể trọng, lb	1059	1053	1050	1051	13,1	0,53
Ngày 1-56						
Mức tăng cân trung bình hàng ngày, lb	4,71	4,74	4,67	4,61	0,10	0,81

Lượng hấp thu chất khô, lb	22,84	23,22	22,75	23,05	0,35	0,64
Tăng trọng/thức ăn	0,2076	0,2047	0,2061	0,2006	0,006	0,76
Ngày 56 thể trọng, lb	1178	1177	1175	1171	12,7	0,75

¹ Các giá trị trung bình ở mỗi dòng không có ký tự chỉ số trên giống nhau là khác nhau, $P < 0,05$

Bảng 8. Đặc điểm của dịch dạ cỏ 26 giờ sau khi ăn các khẩu phần ăn đầu tiên

Mục	Đối chứng	Không đông khô	Tái hydrat hóa	Rắc trộn bề mặt	SEM	Giá trị P
pH	6,21	6,03	6,13	6,00	0,13	0,33
Axit béo dễ bay hơi, mM ¹						
Total	86,3 ^a	88,1 ^a	81,1 ^a	93,5 ^b	3,97	<0,01
Axetat	54,1 ^{a,b}	54,9 ^{a,b}	50,8 ^a	58,4 ^b	2,40	0,02
Propionat	20,4	21,2	19,6	22,6	1,47	0,18
Butyrat	10,3	10,6	9,4	10,8	0,73	0,44
Isobutytrat	0,24	0,15	0,09	0,21	0,08	0,20
Valerat	0,58	0,67	0,64	0,64	0,10	0,93
Isovalerat	0,67	0,61	0,50	0,66	0,11	0,23
Caproat	0,00	0,05	0,00	0,02	0,02	0,28
Axetat: Propionat	2,74	2,67	2,68	2,72	0,11	0,96

¹ Các giá trị trung bình ở mỗi dòng không có chỉ số trên giống nhau là khác nhau, $P < 0,01$

Các giá trị mật độ quang quan sát được trong mỗi khoảng thời gian 6 giờ trong khoảng thời gian 24 giờ để xác định đường cong sinh trưởng của hỗn hợp vi sinh vật dạ cỏ được chủng vào môi trường lactat bán xác định, các dữ liệu này được trình bày trên **FIG. 16**. Có sự tương tác giữa việc điều trị và thời gian phát hiện ($P < 0,02$). Sự ảnh hưởng cụ thể của việc điều trị ($P < 0,01$) và thời gian ($P < 0,01$) cũng được phát hiện. Không có sự khác biệt giữa các nhóm điều trị được phát hiện cho đến giờ thứ 12, khi chế phẩm đông khô được tái hydrat hóa cao hơn đông khô hàng ngày ($P < 0,02$) và đối chứng ($P = 0,007$). Vào giờ thứ 24, Không có sự khác biệt giữa các nhóm điều trị *M. elsdenii* ($P > 0,10$), nhưng nhóm đối chứng có mức sinh trưởng vi sinh vật ít hơn một cách đáng kể so với toàn bộ các nhóm điều trị *M. elsdenii* ($P < 0,01$).

FIG. 17 minh họa sự biến mất của L-lactat trong môi trường lactat bán xác định được chủng bằng hỗn hợp vi sinh vật dạ cỏ và được ủ trong 0, 6, 12, 18, hoặc 24 giờ. Sự tương tác giữa việc điều trị và thời gian được phát hiện ($P = 0,007$) cùng với sự ảnh hưởng của việc điều trị ($P = 0,01$) và thời gian ủ ($P < 0,0001$). Chế phẩm điều trị Không đông khô chứa L-lactat ít hơn các chế phẩm điều trị khác lúc giờ 0 ($P = 0,04$). Nồng độ của L-lactat tương tự giữa các phương pháp điều trị trong các thời điểm 6, 12, và 18 giờ ($P > 0,10$). Tương tự với kết quả về mật độ quang được đề cập ở trên, vi sinh vật dạ cỏ từ nghi

thiến đối chứng sử dụng lactat ít hơn ($P < 0,003$) nhóm điều trị *M. elsdenii* được thu thập lúc 24 giờ ủ trong khi không có sự khác biệt giữa các nhóm điều trị *M. elsdenii* ($P > 0,10$). Các dữ liệu này chứng tỏ rằng vi sinh vật dạ cỏ từ nghé thiến được điều trị bằng *M. elsdenii* sinh trưởng hiệu quả hơn trong môi trường lactat bán xác định so với vi sinh vật từ nghé thiến đối chứng, đề xuất khả năng sử dụng axit lactic lớn hơn trong nhóm phương pháp điều trị này. Hơn nữa, các nhóm điều trị này là tương tự về khả năng sử dụng axit L-lactic.

Nồng độ VFA được xác định ở các mẫu được sử dụng cho các thử nghiệm mật độ quang và sự biến mất của lactat và được trình bày trong **Bảng 9**. Có mối tương quan giữa việc điều trị và thời gian phát hiện được tổng nồng độ VFA ($P = 0,002$), axetat ($P = 0,0002$), Isobutytrat ($P = 0,04$), Butytrat ($P < 0,0001$), Isovalerat ($P = 0,0007$), và Valerat ($P < 0,0001$), cũng đối với tỷ lệ axetat: propionat ($P = 0,02$). Ảnh hưởng của thời gian được phát hiện đối với tổng VFA và tất cả các VFA riêng rẽ ($P < 0,0001$). Sự khác biệt giữa các nhóm điều trị được phát hiện với Isobutytrat ($P = 0,02$), Butytrat ($P = 0,0004$), và Valerat ($P = 0,001$). Nồng độ Isobutytrat thấp hơn ở giờ 18 đối với các nhóm điều trị không đông khô và rắc trộn bề mặt (tương ứng $P < 0,005$ và $P < 0,004$) khi so sánh với nhóm đối chứng và tái hydrat hóa. Vào thời điểm 24 giờ rắc trộn bề mặt có Isobutytrat ($P = 0,002$) ít hơn các nhóm điều trị không đông khô và tái hydrat hóa nhưng tương tự với đối chứng ($P > 0,10$). Nồng độ Butytrat của các mẫu tái hydrat hóa cao hơn mẫu rắc trộn bề mặt ($P = 0,02$) sau 18 giờ nuôi cấy. Nhóm đối chứng tạo ra Butytrat trong 24 giờ ít hơn nhóm điều trị *M. elsdenii* ($P < 0,0001$). Sự khác biệt về Butytrat cũng được phát hiện trong các nhóm điều trị *Megasphaera* tại thời điểm này với các mẫu không đông khô chứa nồng độ cao hơn nhóm Tái hydrat hóa ($P = 0,01$). Giờ thứ 18 đã tiết lộ nồng độ Valerat thấp hơn đối với nhóm Tái hydrat hóa khi được so sánh với các nhóm điều trị khác ($P = 0,01$). Quan sát tương tự đối với nồng độ Valerat và Butytrat tại 24 giờ nuôi cấy. Các nhóm đối chứng chứa Valerat ít hơn tất cả các nhóm điều trị *M. elsdenii* ($P < 0,0001$), trong khi nồng độ ở các mẫu không đông khô cao hơn mẫu Tái hydrat hóa ($P = 0,03$). Không phát hiện có ảnh hưởng đáng kể của việc điều trị đối với các VFA khác ($P > 0,05$). Nồng độ Isocaproat, Caproat, và heptanoat được xác định là không đáng kể. Sự tương tác giữ điều trị x thời gian ($P = 0,02$) được phát hiện với tỷ lệ axetat: Propionat cũng như sự ảnh hưởng của thời gian ($P > 0,0001$), nhưng tương tự giữa các nhóm điều trị ($P = 0,57$).

**Bảng 9. Sự thay đổi profin VFA của môi trường lactat bán xác định
được chủng bằng hỗn hợp vi sinh vật dạ cỏ**

Mục	Điều trị				SEM	Giá trị P		
	Đối chứng	Không đông khô	Tái hydrat hóa	Rắc trộn bề mặt		Trt	Giờ	Trt x Giờ
Tổng VFA, mM						0,36	<0,0001	0,002
0 giờ ¹	3,61	3,35	3,52	3,55	5,16			
6 giờ ¹	6,41	7,17	7,79	6,62	5,16			
12 giờ ²	7,64	8,58	17,27	7,80	5,16			
18 giờ ³	63,01	49,48	56,45	53,73	5,16			
24 giờ ⁴	46,23	78,35	67,22	74,77	5,16			
Axetat, mM						0,98	<0,0001	0,0002
0 giờ ¹	3,07	3,02	3,07	2,92	2,15			
6 giờ ^{1,2}	4,92	5,56	5,78	5,13	2,15			
12 giờ ²	5,77	6,31	9,17	6,27	2,15			
18 giờ ³	33,47	21,96	22,75	23,97	2,15			
24 giờ ⁴	17,25	25,43	22,82	26,05	2,15			
Propionat, mM						0,24	<0,0001	0,08
0 giờ ¹	0,01	0	0	0	2,44			
6 giờ ^{1,2}	1,21	1,29	1,69	1,21	2,44			
12 giờ ²	1,69	2,00	6,45	1,47	2,44			
18 giờ ³	23,29	20,84	23,53	24,00	2,44			
24 giờ ⁴	20,85	33,61	28,77	32,58	2,44			
Isobutytrat, mM						0,02	<0,0001	0,04
0 giờ ¹	0,03	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	0,03			
6 giờ ¹	0,01	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	0,03			
12 giờ ¹	Không đáng kể	Không đáng kể	0,02	0,00	0,03			
18 giờ ²	0,14 ^a	0,01 ^b	0,15 ^a	0,01 ^b	0,03			
24 giờ ³	0,15 ^{a,b}	0,22 ^a	0,22 ^a	0,08 ^b	0,03			
Butytrat, mM						0,0004	<0,0001	<0,0001
0 giờ ¹	0,08	0,06	0,08	0,09	0,52			
6 giờ ¹	0,15	0,20	0,19	0,16	0,52			
12 giờ ¹	0,18	0,25	0,90	0,16	0,52			
18 giờ ²	2,71 ^{a,b}	3,24 ^{a,b}	4,36 ^a	2,75 ^b	0,52			
24 giờ ³	3,46 ^a	8,80 ^b	7,06 ^c	7,46 ^{b,c}	0,52			
Isovalerat, mM						0,9	<0,0001	0,0007
0 giờ ¹	0,07	0,01	0,01	0,03	0,10			
6 giờ ¹	0,03	0,01	0,02	0,03	0,10			
12 giờ ¹	Không đáng kể	Không đáng kể	0,11	Không đáng kể	0,10			
18 giờ ²	0,52	0,29	0,75	0,26	0,10			
24 giờ ³	0,72	1,24	1,06	0,93	0,10			
Valerat, mM						0,001	<0,0001	<0,0001
0 giờ ¹	0,14	0,10	0,16	0,17	0,54			
6 giờ ¹	0,05	0,07	0,08	0,06	0,54			
12 giờ ¹	Không đáng kể	0,03	0,63	Không đáng kể	0,54			
18 giờ ²	2,63 ^a	2,91 ^a	4,63 ^b	2,53 ^a	0,54			
24 giờ ³	3,75 ^a	8,12 ^b	7,23 ^c	7,56 ^{b,c}	0,54			

Isocaproat, mM						0,26	<0,0001	,09
0 giờ ¹	0,10	0,07	0,09	0,12	0,02			
12 giờ ³	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	0,02			
18 giờ ⁴	0,25	0,20	0,21	0,20	0,02			
24 giờ ⁵	0,03	0,01	Không đáng kể	0,01	0,02			
Caproat, mM						0,07	<0,0001	0,003
0 giờ	0,09	0,09	0,11	0,14	0,02			
6 giờ	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	0,02			
12 giờ	Không đáng kể	0,02	Không đáng kể	Không đáng kể	0,02			
18 giờ	Không đáng kể	0,14	0,08	Không đáng kể	0,02			
24 giờ	0,02	0,11	0,07	0,10	0,02			
Heptanoat, mM						0,09	<0,0001	0,01
0 giờ	0,02	0,06	0,00	0,02	0,01			
6 giờ	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể				
12 giờ	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể				
18 giờ	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể				
24 giờ	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể				
A:P						0,57	<0,0001	0,02
0 giờ ¹	0,06	Không đáng kể	Không đáng kể	Không đáng kể	0,18			
6 giờ ^{1,2}	4,01	4,44	4,24	4,00	0,18			
12 giờ ²	3,98	4,60	4,17	4,60	0,18			
18 giờ ³	2,14	1,91	1,77	1,91	0,18			
24 giờ ⁴	1,12	0,82	0,91	0,91	0,18			

^{1,2,3,4} Các thời điểm không có các chỉ số trên giống nhau là khác nhau, $P < 0,01$

^{a,b,c} Giá trị trung bình trong mỗi hàng không có các chỉ số trên giống nhau là khác nhau, $P < 0,05$

Ví dụ 6: Hoạt tính phytaza của *Megasphaera elsdenii*

Hoạt tính phytaza *in vitro* của tế bào *M. elsdenii* được đánh giá.

Tế bào *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 được nuôi cấy trong điều kiện yếm khí như được mô tả trong bản mô tả trong môi trường lactat bán xác định chứa phosphat vô cơ (KH_2PO_4) hoặc phytat làm nguồn phospho. Tại các khoảng thời gian 2 giờ từ lúc bắt đầu nuôi cấy (0 giờ) đến 8 giờ, 1 mililit (mL) các mẫu được lấy từ giống nuôi cấy và được ly tâm để tạo ra các viên tế bào. Hoạt tính phytaza trong các viên tế bào sau đó được xác định bằng cách sử dụng phương pháp molybdat xanh da trời. Xem Yanke *et al.*, Microbiol. 144: 1565-1573 (1998). Nói ngắn gọn, phosphat vô cơ được giải phóng bằng cách phân cắt enzyme trong vòng 30 phút ở 37 °C ở độ pH=5,0 và được định lượng bằng

quang phổ ở 700 nanomet (nm) và được so sánh với đường cong chuẩn. Hoạt tính phytaza được xác định là lượng phospho vô cơ được giải phóng từ viên tế bào trong mỗi phút trong điều kiện thử nghiệm.

FIG. 18 thể hiện rằng sự sinh trưởng của tế bào *Megasphaera elsdenii* khi có mặt hoặc vắng mặt phytat dẫn đến hoạt tính phytaza có ý nghĩa, khẳng định rằng: (1) tế bào *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 sản xuất phytaza, (2) việc sản xuất phytaza không bị ức chế bởi sự có mặt của phospho trong môi trường, và (3) việc sản xuất phytaza bởi *Megasphaera elsdenii* có vẻ tốt hơn khi có mặt phytat trong môi trường.

Ví dụ 7: Ảnh hưởng của *Megasphaera elsdenii* lên nồng độ và tỷ lệ xuất hiện *Salmonella*

Gà giống hướng thịt (n=384) được ngẫu nhiên chia thành bốn nhóm điều trị: 1) nhóm đối chứng không nhận *Megasphaera*, 2) nhóm tùy thích có thể tùy thích ăn từ chai cung cấp thức ăn *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 dạng lỏng, 3) nhóm đông khô nhận hàng ngày *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 đông khô trong thức ăn của chúng, và 4) nhóm chế phẩm dùng qua đường uống nhận *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 dạng lỏng vào ngày 0.

Mỗi nhóm trong bốn nhóm điều trị được đại diện bởi 16 lồng chứa 6 con gà mỗi lồng. Cân nặng của gà, mức tiêu thụ thức ăn, và mức chuyển hóa thức ăn được ghi nhận trong khoảng thời gian thử nghiệm 15 ngày. Sau khoảng thời gian cho ăn 15 ngày, 2 con mỗi lồng được chọn ngẫu nhiên, bị giết, và manh tràng được lấy để xác định sự xuất hiện của *Salmonella*. Ngắn gọn, manh tràng được lấy, được đặt trong túi Ziploc, và được bảo quản trên nước đá. Manh tràng sau đó được rửa bằng etanol 70% và được mát xa bằng tay để lấy các thành phần. Một mililit thành phần lấy được được pha loãng theo chuỗi trong dung dịch nước muối đậm phosphat (PBS) và được cấy trên aga brilliant green (BGA). Các đĩa BGA được nuôi cấy 24 giờ ở 37°C. Khuẩn lạc *Salmonella* giả định (khuẩn lạc màu hồng) được đếm để xác định là *Salmonella* bằng cách sử dụng thử nghiệm latex Oxoid *Salmonella* FT0203 (Oxoid-Thermo Scientific, Hampshire, UK). Ngoài ra, một mililit mẫu thành phần manh tràng được bổ sung vào 9 mL Rappaport-Vassiliadis (RV) để làm giàu chọn lọc. Nếu không phát hiện thấy sự sinh trưởng *Salmonella* trên đĩa BGA, sản phẩm làm giàu RV được cấy trên đĩa BGA, được ủ trong 24 h ở 37 °C, và để đánh giá sự có mặt

của *Salmonella*. Các mẫu không có sự sinh trưởng bằng cấy trực tiếp, nhưng có sự sinh trưởng tích cực với sự làm giàu RV được gán một số tùy ý là 9 (1 dưới giới hạn phát hiện lý thuyết) và các mẫu không có sự sinh trưởng trong cả cấy trực tiếp lẫn làm giàu RV được gán là 0.

Các kết quả này chỉ ra rằng gà nhận vật liệu đông khô có nồng độ *Salmonella* trong manh tràng thấp hơn về số đơn vị tạo khuẩn lạc trên mỗi mililit (CFU/mL) với sự khác biệt là -1 Log so với nhóm đối chứng. Xem **FIG. 19**. Tỷ lệ xuất hiện *Salmonella* trong các mẫu nhóm đông khô cũng giảm khoảng 13% so với nhóm đối chứng. Xem **FIG. 20**.

Ví dụ 8: Ảnh hưởng của *Megasphaera elsdenii* lên hiệu suất sinh trưởng và đặc điểm manh tràng của gà hướng thịt

A. Thiết kế thử nghiệm và các nhóm điều trị

24 mẫu giống nhau của ba nhóm điều trị trong một thiết kế khối hoàn toàn ngẫu nhiên sử dụng con trống ngày tuổi được thực hiện bằng cách sử dụng 500 gà con hướng thịt Cobb 1 ngày tuổi lúc bắt đầu điều trị (Cobb-Vantress ở Siloam Springs, Arkansas). Chế phẩm điều trị là *M. elsdenii* chủng NCIMB 41125 (MS-Biotec, Wamego, Kansas) được dùng bằng cách chế phẩm dùng qua đường uống hoặc sương khí dung được đưa lên bề mặt cơ thể của gà, và đối chứng (không có *M. elsdenii*). Gà được nhốt trong 72 bãi rào kín, với mỗi bãi rào chứa 35 con lúc bắt đầu thử nghiệm (tổng 2520 con).

Trước khi dùng *M. elsdenii*, túi nhôm 5 L chứa giống nuôi cấy mới được lắc mạnh để đồng nhất các thành phần bên trong. Ống Tygon được sử dụng để kết nối thiết bị định liều được thao tác bằng tay với túi. Các vật chứa thiết bị định lượng đã được điền đầy nhiều lần và được phân phối vài lần để đuổi bớt không khí. Các thành phần được coi là không chứa không khí môi trường khi giống nuôi cấy, mà chứa chỉ thị oxy, giữ được màu sắc bình thường của nó.

Gà con được phân các nhóm gồm 35 con, và cân nặng của mỗi nhóm đã được ghi lại. Các nhóm gà được xử lý theo khối, với chế phẩm điều trị được phân chia ngẫu nhiên trong mỗi khối.

24 bãi rào kín (35 gà/bãi rào; tổng 840 con) được dùng theo liều dưới dạng chế phẩm dùng qua đường uống 0,2 mL giống nuôi cấy mới chứa $1,97 \times 10^9$ CFU/mL *M. elsdenii*

chủng NCIMB 41125 sử dụng xylanh tự điền đầy Scorex Classic 173.05005 (Ecublens, Switzerland). Các kỹ thuật viên giữ gà bằng cách sử dụng ngón tay cái và ngón trỏ để giữ mỏ mở trong khi thành phần bên trong ống tiêm được xả trực tiếp vào khoang miệng gà.

24 bãi rào kín (35 gà/bãi rào; tổng 840 con) được dùng theo liều bằng cách phun sương tạo khí dung bao gồm giống nuôi cấy mới chứa $1,97 \times 10^9$ CFU/mL *M. elsdenii* chủng NCIMB 41125 được cung cấp bằng thiết bị làm ướt nước dùng khí nén được lắp đầu chóp phun sương. Gà được đặt vào bồn nhựa (50 cm x 35 cm x 40 cm) và giống nuôi cấy được đưa lên các bề mặt cơ thể của chúng dưới dạng sương mù với thể tích là 60 mL cho mỗi bãi rào (~1,7 mL/gà).

24 bãi rào kín (35 gà/bãi rào; tổng 840 con) không được tiếp xúc với *M. elsdenii* và dùng làm đối chứng. Để ngăn ngừa nhiễm chéo cho các gà đã được điều trị, gà đối chứng chỉ được xử lý bởi những người được chỉ định không tiếp xúc với gà được điều trị và được đặt vào vật mang được thiết kế để cân được chuyển sang bãi rào kín. Trong một trường hợp, do lỗi kỹ thuật gà bị đếm sai và bãi rào 51 đã nhận được 33 con thay vì 35 con.

B. Cho ăn và cho uống nước

Nước sạch được cung cấp tùy thích qua các chai (6 chai/bãi rào) được treo từ đường cung cấp nước. Chiều cao chai được điều chỉnh trong suốt quá trình thử nghiệm để phù hợp với sự sinh trưởng của gà. **Bảng 10**, dưới đây, thể hiện khẩu phần ăn được sử dụng trong thử nghiệm. Tất cả các khẩu phần ăn được cho ăn trong thiết bị cung cấp thức ăn dùng trọng lực được treo ở giữa bãi rào. Thức ăn được bổ sung khi cần để đảm bảo có thể ăn tùy thích trong suốt quá trình thử nghiệm. 5 kg khẩu phần ăn lúc bắt đầu được đặt vào thiết bị cung cấp thức ăn dùng trọng lực trước khi đưa gà vào bãi rào kín.

Bảng 10. Thành phần của khẩu phần ăn

Thành phần	Chế độ ăn ở các giai đoạn ⁺		
	Khởi động	Tăng trưởng	Hoàn thiện
Ngô nghiền	55,26	59,74	65,06
Bột đậu nành bỏ vỏ	37,15	32,60	27,90
Dầu đậu nành	3,10	3,35	3,10
Đá vôi nghiền	1,45	1,40	1,25
Muối	0,37	0,37	0,37
Biofos, 21%	1,7	1,6	1,4
Natri bicarbonat	0,22	0,19	0,17

Hỗn hợp dinh dưỡng trộn trước dùng cho gia cầm VTM premix	0,25	0,25	0,25
L-lysin hydroclorua	0,33	0,30	0,17
L-Metionin	0,13	0,15	0,28
L-Threonin	0,04	0,05	0,07

⁺Các khẩu phần ăn được tạo viên qua lỗ khuôn 3-mm, được làm lạnh, vỡ vụn, và cho vào bao giấy để bảo quản cho đến khi cho ăn.

Khẩu phần ăn lúc bắt đầu được lấy ra khỏi bãi rào kín vào ngày 16 của quá trình thử nghiệm. Thức ăn còn lại được cân, được lấy từ mỗi thiết bị cung cấp thức ăn, và được đặt vào các thùng được đánh số tương ứng với số bãi rào. Thiết bị cung cấp thức ăn được đổ đầy bằng chế độ ăn giai đoạn tăng trưởng. Quy trình này được lặp lại vào ngày 30 của quá trình thử nghiệm, thời gian hay thể chế độ ăn giai đoạn tăng trưởng bằng chế độ ăn giai đoạn hoàn thiện. Vào ngày 36 thử nghiệm kết thúc, và chế độ ăn giai đoạn hoàn thiện còn được cân và được ghi đối với mỗi bãi rào.

Tổng mức tiêu thụ thức ăn mỗi bãi rào cho mỗi giai đoạn (khởi động, tăng trưởng, và hoàn thiện) được tính là: Thức ăn bổ sung– thức ăn thu hồi

Mức hấp thu cho mỗi gà trong mỗi ngày được tính là: Tổng thức ăn tiêu thụ ÷ [đầu đếm trong bãi rào hàng ngày x tổng số ngày cho ăn]

C. Cân nặng của gà

Khối lượng của gà trong từng bãi rào được ghi lại tại thời điểm cuối mỗi khoảng thời gian cho ăn (khởi động, tăng trưởng, và hoàn thiện). Tại thời điểm kết thúc giai đoạn khởi động (ngày 16) tất cả gà trong mỗi bãi rào được đặt vào một cái bồn (50 cm x 35 cm x 40 cm) và được cân. Cân nặng của bồn được trừ từ tổng cân nặng để xác định cân nặng của gà trong bãi rào. Tại thời điểm kết thúc giai đoạn tăng trưởng (ngày 30) tất cả gà trong mỗi bãi rào được đặt vào hai bồn có khối lượng bằng nhau (kích thước mỗi bồn là 103 cm x 55 cm x 41 cm), được cân, và các khối lượng được cộng lại với nhau. Cân nặng của mỗi bồn (được lấy trước khi những gà được đặt vào chúng) được trừ từ tổng cân nặng để xác định cân nặng của gà trong bãi rào. Tại thời điểm kết thúc giai đoạn hoàn thiện (ngày 36) tất cả gà trong mỗi bãi rào được đặt vào hai bồn có khối lượng bằng nhau (kích thước mỗi bồn là 103 cm x 55 cm x 41 cm) và được cân. Thời gian này, lớp cặn bẩn được cân trừ đi với các bồn tại chỗ. Cân nặng của gà trong mỗi bồn sau đó được cộng để xác định khối

lượng của tổng bãi rào. Lớp cặn bẩn được cân trừ bì lại giữa các bãi rào kín để tính sự tích tụ phân. Ở mỗi giai đoạn cân, việc xác định số đầu được thực hiện khi gà được đặt vào bồn.

D. Quy trình lấy mẫu

Mỗi tuần (ngày 7, 14, 21, 28 và 35), 1 đến 3 con gà được chọn ngẫu nhiên từ mỗi bãi rào và bị giết bằng cách làm trật khớp cổ. Thành phần trong manh tràng (0,5 g) được thu thập và được trộn với nước được khử ion (2 mL) trong lọ nhấp nháy HDPE 20 mL (Fisher Sci.; 03-337-23B) sử dụng máy trộn xoáy nhanh. Dụng cụ đo độ pH cầm tay (dụng cụ đo độ pH cầm tay 3 sao Thermo Scientific Orion, Waltham, MA) được sử dụng để xác định độ pH. Bốn phần của các thành phần trong manh tràng đã được thêm vào 1 phần dung dịch axit metaphosphoric 25% khối lượng/thể tích và được làm đồng nhất bằng cách sử dụng máy trộn xoáy nhanh. Mẫu sau đó được chuyển vào 2 ống vi ly tâm trong các phần phân ước 1mL và được đông lạnh ở -18°C để đợi phân tích các axit béo dễ bay hơi (VFA).

Vào ngày 7 và 21, các thành phần trong manh tràng được chia thành 2 phần phân ước. Một phần phân ước được sử dụng để phân tích VFA và được chuẩn bị như đã giải thích ở trên. Phần cô đặc (0,5 g) được đặt trực tiếp vào một lọ nhấp nháy HDPE 20-mL riêng (Fisher Sci.; 03-337-23B) và được đông lạnh (-80°C) để định lượng số lượng vi khuẩn sử dụng PCR định lượng, thời gian thực.

E. Phân tích độ pH và các axit béo dễ bay hơi trong manh tràng

Các mẫu manh tràng được pha loãng và axit hóa từ trước được rửa đông, được làm đồng nhất bằng cách sử dụng thiết bị trộn xoáy và được ly tâm ở tốc độ $24 \times g$ trong 18 phút. Dịch nổi được chuyển sang lọ sắc ký khí. Các axit béo dễ bay hơi được xác định bằng cách sử dụng sắc ký khí Agilent 7890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) được lắp cột mao quản DB-WAX (độ dày màng 30 m x 0,53 mm x 0,5 mm; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) và máy dò ion hoá ngọn lửa. Heli được sử dụng làm khí mang ở lưu lượng 22 cm/giây, với mức bơm chia $1\mu\text{L}$ và dòng chảy phân chia 50:1. Nhiệt độ lò ban đầu là 80°C và nhiệt độ tăng ở mức $10^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến 220°C . Nhiệt độ đầu vào và máy dò là 250°C . Axit béo dễ bay hơi được định lượng bằng cách so sánh với các tiêu chuẩn đã biết (Supelco Volatile Fatty Acid Standard Mix; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) chứa axetat, Propionat, Isobutytrat, Butytrat, Isovalerat, Valerat, Isocaproat, Caproat và Heptanoat.

F. *Xác định khối lượng thân thịt*

Gà bị giết lúc 5 tuần tuổi để xác định khối lượng thân thịt. Thức ăn bị thu lại khoảng 4 h trước khi giết. 5 con kích thước trung bình đã được chọn từ mỗi bãi rào và đặt vào hộp bắt để vận chuyển đến khu vực xử lý. 5 gà được cân theo bãi rào để xác định khối lượng khi sống ngay trước khi giết bằng cách gây choáng và cắt tiết. Gà được lấy máu trong 2 phút sau đó được đặt vào trong thiết bị nhúng nước nóng kiểu quay ở 63°C trong khoảng 30 giây. Gà được chuyển sang thiết bị vật lông cơ học kiểu trống quay trong 30 giây để loại bỏ lông. Chân, đầu và cẳng đã được loại bỏ và thân thịt được mổ xẻ thông qua một vết mổ xung quanh lỗ huyết. Thân thịt sau đó được cân theo bãi rào để xác định năng suất thân thịt nóng.

G. *Phân tích thống kê*

Dữ liệu được phân tích sử dụng quy trình kết hợp của phần mềm SAS® phiên bản 9.4. Mô hình bao gồm tác động cố định là nhóm điều trị, tác động ngẫu nhiên là khối, và bãi rào là đơn vị thử nghiệm. Giá trị có ý nghĩa khi $P < 0,05$. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình bình phương tối thiểu được xác định bằng cách sử dụng tùy chọn PDiff của phần mềm SAS®.

H. *Kết quả*

Gà hướng thịt đã chứng tỏ mức hấp thu thức ăn, hiệu quả thức ăn, và mức tăng cân trung bình hàng ngày tương tự giữa các nhóm điều trị. Khối lượng và tỷ lệ chết của gà cũng không bị ảnh hưởng bởi điều trị. Tuy nhiên, năng suất của nhóm được tưới nhỏ hơn gà được nhận *M. elsdenii* ở dạng chế phẩm dùng qua đường uống so với gà đối chứng hoặc gà được nhận *M. elsdenii* ở dạng sương mù.

Độ pH manh tràng nhỏ hơn ở gà được nhận *M. elsdenii* bằng phun sương hoặc đường uống, so với gà đối chứng ($P < 0,01$; **Bảng 11**).

Bảng 11. Ảnh hưởng của *Megasphaera elsdenii* lên độ pH manh tràng và nồng độ VFA

Mục*	Ngày	Đối chứng ¹	Phun Sương ²	Uống ³	SEM	Giá trị P	
						Điều trị [†]	Tương phản ^{††}
Độ pH	7	6,87 ^{A a}	6,85 ^{A ac}	6,81 ^{A a}	0,103	T, D	0,01
	14	6,67 ^{A b}	6,25 ^{B b}	6,11 ^{B b}			
	21	6,15 ^{A a}	6,12 ^{A b}	6,25 ^{A b}			
	28	6,83 ^{A ab}	6,81 ^{A a}	6,67 ^{A ac}			
	35	7,26 ^{A c}	7,10 ^{A c}	7,15 ^{A d}			
Axetat	7	53,53 ^{A a}	58,66 ^{A a}	58,42 ^{A a}	3,604	D, I	0,91
	14	61,79 ^{A a}	66,20 ^{AB a}	74,00 ^{B b}			
	21	61,48 ^{A b}	47,66 ^{B b}	46,4 ^{B c}			
	28	40,42 ^{A bc}	38,83 ^{A b}	42,36 ^{A cd}			
	35	39,13 ^{A bc}	41,83 ^{A b}	36,22 ^{A d}			
Propionat	7	1,82 ^{A a}	1,48 ^{A a}	1,52 ^{A a}	0,608	, I	0,51
	14	2,35 ^{A ab}	2,10 ^{A a}	2,69 ^{A ab}			
	21	6,36 ^{A c}	4,01 ^{B b}	3,63 ^{B bc}			
	28	3,73 ^{A bd}	4,08 ^{A b}	4,21 ^{A c}			
	35	4,58 ^{A d}	5,88 ^{A c}	5,96 ^{A d}			
Axetat:Propionat	7	31,96 ^{A a}	41,33 ^{B a}	42,03 ^{B a}	2,168	T, D, I	0,003
	14	29,80 ^{A a}	40,44 ^{B a}	33,69 ^{A b}			
	21	12,36 ^{A c}	13,62 ^{A bcd}	13,57 ^{A c}			
	28	13,25 ^{A c}	12,96 ^{A cd}	14,30 ^{A c}			
	35	9,81 ^{A c}	8,33 ^{A d}	7,80 ^{A d}			
Butyrat	7	5,60 ^{A a}	5,54 ^{A a}	5,73 ^{A a}	1,094	D, I	0,73
	14	9,45 ^{A b}	10,95 ^{AB b}	13,40 ^{B b}			
	21	17,79 ^{A c}	11,77 ^{B b}	13,45 ^{B b}			
	28	6,67 ^{A ab}	7,02 ^{A ac}	7,35 ^{A ac}			
	35	8,15 ^{A b}	9,70 ^{A ab}	8,40 ^{A ac}			
Isobutytrat	7	0,39 ^{A a}	0,36 ^{A a}	0,34 ^{A a}	0,055	D	0,04
	14	0,37 ^{A a}	0,35 ^{A a}	0,45 ^{A a}			
	21	0,38 ^{A a}	0,17 ^{B b}	0,15 ^{B b}			
	28	0,05 ^{A b}	0,00 ^{A c}	0,00 ^{A b}			
	35	0,37 ^{A a}	0,37 ^{A ad}	0,34 ^{A a}			
Valerat	7	0,29 ^{A a}	0,31 ^{A a}	0,29 ^{A a}	0,078	D	0,89
	14	0,68 ^{A bc}	0,71 ^{A b}	0,90 ^{B b}			
	21	1,13 ^{A c}	0,91 ^{B b}	0,96 ^{AB b}			
	28	0,32 ^{A ac}	0,28 ^{A c}	0,34 ^{A a}			
	35	0,63 ^{A b}	0,79 ^{A b}	0,68 ^{A c}			
Isovalerat	7	0,317 ^{A a}	0,292 ^{A a}	0,314 ^{A a}	0,0592	D	0,96
	14	0,375 ^{A a}	0,357 ^{A ab}	0,505 ^{A b}			
	21	0,419 ^{A a}	0,396 ^{AB b}	0,257 ^{AB a}			
	28	0,038 ^{A b}	0,040 ^{A c}	0,050 ^{A c}			
	35	0,325 ^{A a}	0,396 ^{A ab}	0,355 ^{A ab}			

Caproat	7	0,150 ^{A a}	0,168 ^{A a}	0,144 ^{A a}	0,0208	T, D, I	0,13
	14	0,150 ^{A a}	0,161 ^{A a}	0,292 ^{B b}			
	21	0,000 ^{A bc}	0,000 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
	28	0,000 ^{A c}	0,000 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
	35	0,000 ^{A c}	0,000 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
Isocaproat	7	0,125 ^{A a}	0,116 ^{A a}	0,142 ^{A a}	0,0148	D	0,79
	14	0,085 ^{A b}	0,101 ^{A a}	0,078 ^{A b}			
	21	0,000 ^{A c}	0,001 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
	28	0,000 ^{A c}	0,001 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
	35	0,000 ^{A c}	0,001 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
Heptanoat	7	0,177 ^{A a}	0,186 ^{A a}	0,146 ^A	0,0239	D	0,88
	14	0,104 ^{A b}	0,082 ^{B b}	0,103 ^{AB}			
	21	0,000 ^{A c}	0,002 ^{A c}	0,003 ^A			
	28	0,000 ^{A c}	0,001 ^{A c}	0,003 ^A			
	35	0,000 ^{A c}	0,001 ^{A c}	0,053 ^A			
Tổng VFA	7	62,40 ^{A a}	67,10 ^{A a}	67,01 ^{A a}	4,806	D, I	0,79
	14	75,34 ^{A b}	81,00 ^{AB b}	92,39 ^{B b}			
	21	87,57 ^{A b}	64,90 ^{B a}	64,82 ^{B ad}			
	28	51,23 ^{A a}	50,25 ^{A c}	54,29 ^{A ac}			
	35	53,18 ^{A a}	58,98 ^{A c}	51,97 ^{A d}			

* Nồng độ VFA được thông báo dưới dạng mM

¹ Gà đối chứng không tiếp xúc với *M. elsdenii*

² Gà được nhận *M. elsdenii* dưới dạng phun sương được đưa lên bề mặt cơ thể của chúng ở tốc độ ~1,7 ml/gà

³ Gà được nhận 0,2 ml *M. elsdenii* dưới dạng chế phẩm dùng qua đường uống

[†] T = Ảnh hưởng của việc điều trị; D = Ảnh hưởng của ngày lấy mẫu; I = Tương tác giữa việc điều trị và ngày lấy mẫu; $P < 0,05$

^{††} Tương phản '*M. elsdenii* với Đối chứng'

^{A, B} Các giá trị trung bình ở mỗi dòng không có chỉ số trên giống nhau là khác nhau ở $P < 0,05$

^{a, b} Các giá trị trung bình ở mỗi cột không có chỉ số trên giống nhau là khác nhau ở $P < 0,05$

Độ pH manh tràng trung bình của các nhóm đối chứng, điều trị bằng phun sương tạo khí dung, và chế phẩm dùng qua đường uống là 6,76, 6,63, và 6,60, tương ứng. Tương tác giữa việc điều trị theo ngày được phát hiện đối với axetat ($P < 0,01$), propionat ($P = 0,03$), butyrat ($P < 0,01$), tỷ lệ axetat: propionat ($P = 0,01$; tỷ lệ A: P), caproat ($P = 0,002$) và tổng nồng độ VFA ($P < 0,01$) trong manh tràng (Bảng 4.). Axetat tăng từ ngày 7 đến 14, đạt đỉnh vào ngày 14. Các thành phần trong manh tràng của gà được nhận *M. elsdenii* dưới dạng chế phẩm dùng qua đường uống chứa nồng độ axetat, butyrat, và caproat lớn hơn các nồng độ này ở gà đối chứng vào ngày 14 ($P < 0,01$). Khoảng ngày 21, nồng độ axetat giảm ở tất cả các nhóm điều trị; tuy nhiên, nồng độ axetat trong manh tràng lớn hơn ở gà đối chứng khi được so với gà được điều trị bằng sương tạo khí dung hoặc chế phẩm

dùng qua đường uống ($P < 0,01$). Nồng độ propionat và butyrat trong thành phần manh tràng của gà đối chứng cũng lớn hơn nồng độ ở gà được điều trị bằng *M. elsdenii* vào ngày 21 ($P < 0,01$). Nồng độ propionat đạt đỉnh vào ngày 21 ở tất cả các nhóm điều trị và vẫn tăng cho đến khi ngày 35, nhưng chúng không khác nhau giữa các nhóm điều trị từ ngày 28 đến ngày 35 ($P > 0,05$). Tỷ lệ A: P trong thành phần manh tràng của gà được điều trị bằng *M. elsdenii* cao hơn so với đối chứng vào ngày 7 ($P < 0,01$), với tỷ lệ A:P là 31,96, 41,33 và 42,03 đối với đối chứng, sương tạo khí dung và dùng qua đường uống, tương ứng. Vào ngày 14 tỷ lệ A: P manh tràng của gà được điều trị bằng sương tạo khí dung chứa *M. elsdenii* (40,44 mM) lớn hơn tỷ lệ của gà đối chứng (29,80 mM) hoặc của gà nhận chế phẩm dùng qua đường uống chứa *M. elsdenii* (33,69; $P < 0,03$). Tỷ lệ A: P manh tràng không khác biệt giữa các nhóm điều trị vào ngày 21 đến 35 ($P > 0,05$). Nồng độ isobutyrat, valerat, isovalerat, isocaproat và heptanoat trong thành phần manh tràng không bị ảnh hưởng bởi việc điều trị ($P > 0,10$). Tổng nồng độ VFA manh tràng trong gà dùng chế phẩm dùng qua đường uống lớn hơn so với gà đối chứng vào ngày 14 ($P < 0,001$). Tuy nhiên, tổng nồng độ VFA ($P < 0,05$) trong thành phần manh tràng của gà được nhận *M. elsdenii* ở dạng sương tạo khí dung hoặc chế phẩm dùng qua đường uống (64,90 mM và 64,82 mM, tương ứng) nhỏ hơn của nhóm đối chứng (87,57 mM) vào ngày 21. Tổng nồng độ VFA manh tràng là tương tự giữa các nhóm điều trị đối với các ngày 7, 28, và 35 ($P > 0,30$).

Ví dụ 9: Ảnh hưởng của *Megasphaera elsdenii* lên hiệu suất sinh trưởng của gà hướng thịt

A. Thiết kế thử nghiệm và các nhóm điều trị - Nghiên cứu 1

18 mẫu lặp lại của sáu nhóm điều trị, được chặn bởi dãy chuồng nuôi gà nhốt và bằng các bậc được thực hiện bằng cách sử dụng 500 gà con hướng thịt Cobb (Cobb-Vantress ở Siloam Springs, Arkansas) được một ngày tuổi lúc bắt đầu điều trị. Các nhóm điều trị là đối chứng (không có probiotic), Lactipro Advance® (giống nuôi cấy lỏng không đông lạnh của *Megasphaera elsdenii* chủng NCIMB 41125, MS Biotec, Wamego, Kansas) được dùng dưới dạng chế phẩm dùng qua đường uống, giống nuôi cấy *Megasphaera elsdenii* chủng KS 249 được dùng dưới dạng chế phẩm dùng qua đường uống, *Megasphaera elsdenii* chủng ATCC® 25940 được dùng dưới dạng chế phẩm dùng qua đường uống, Lactipro Advance® (giống nuôi cấy lỏng không đông khô của *Megasphaera elsdenii* chủng NCIMB 41125 MS Biotec, Wamego, Kansas) được dùng cho bề mặt cơ thể

của gà dưới dạng sol khí, và *Megasphaera elsdenii* đông khô chủng NCIMB 41125 (MS Biotec, Wamego, Kansas). Gà được nhốt trong 108 bãi rào kín, và mỗi bãi rào chứa 8 gà tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm (tổng 1152 gà).

Gà được chia vào các nhóm gồm 8 con, và cân nặng của mỗi nhóm được ghi lại. Các nhóm gà được xử lý dưới dạng các khối, và các nhóm điều trị thử nghiệm được ngẫu nhiên chia vào bãi rào kín trong từng khối.

18 bãi rào kín (8 gà/bãi rào; tổng 144 gà) được dùng theo liệu qua đường uống (nhồi) 0,2 mL Lactipro *Advance*® chứa $1,97 \times 10^9$ CFU/mL giống nuôi cấy lỏng không đông khô chứa *Megasphaera elsdenii* chủng NCIMB 41125. 18 bãi rào kín (8 gà/bãi rào; tổng 144 gà) được dùng theo liệu qua đường uống (đưa qua ống vào dạ dày) 0,2 mL giống nuôi cấy mới chứa *Megasphaera elsdenii* chủng KS 249 với nồng độ không biết. Nỗ lực đánh giá CFU/mL đối với chủng này không thành công. 18 bãi rào kín (8 gà/bãi rào; tổng 144) được dùng theo liệu qua đường uống (đưa qua ống vào dạ dày) 0,2 mL giống nuôi cấy mới chứa $1,06 \times 10^9$ CFU/mL *Megasphaera elsdenii* chủng ATCC® 25940. Gà được dùng theo liệu tất cả các chế phẩm điều trị qua đường uống được giữ trong lòng bàn tay của một kỹ thuật viên, mỏ được mở bằng ngón tay cái và ngón trỏ, và giống nuôi cấy được xả trực tiếp vào khoang miệng bằng cách sử dụng pipet lặp lại quy chiếu Eppendorf® (Hamburg, Germany).

18 bãi rào kín (8 gà/bãi rào; tổng 144 gà) được phun sương 15 mL mỗi bãi rào Lactipro *Advance*® chứa $1,97 \times 10^9$ CFU/mL *Megasphaera elsdenii* chủng NCIMB 41125 (~1,88 mL/gà). Gà được đặt trong bồn nhựa (dài 50 cm x rộng 35 cm, x sâu 40 cm), và giống nuôi cấy được đưa lên bề mặt cơ thể của dưới dạng phun sương sử dụng thiết bị phun tưới khí nén được lắp đầu phun sương. Các con gà đã được phun sương được xử lý bởi nhân viên được chỉ định và được đặt trong vật mang để cân, ứng dụng và chuyển sang bãi rào kín để giảm thiểu sự nhiễm chéo.

18 bãi rào kín (8 gà/bãi rào; tổng 144 gà) được nhận chế phẩm rắc trộn bề mặt (hỗn hợp của khẩu phần ăn và *Megasphaera elsdenii* đông khô) chứa $1,18 \times 10^7$ CFU/g *Megasphaera elsdenii* chủng NCIMB 41125 với tỷ lệ một phần tư muỗng cà phê cho mỗi

con gà. Chế phẩm điều trị được thêm trực tiếp vào máng cung cấp thức ăn mỗi ngày lúc 1300 h bắt đầu vào ngày 10 của quá trình thử nghiệm.

18 bãi rào kín còn lại (8 gà/bãi rào; tổng 144 gà) được dùng làm đối chứng và không tiếp xúc với sản phẩm probiotic. Gà đối chứng được xử lý bởi các nhân viên được chỉ định và được đặt trong các vật mang được chỉ định để cân và chuyển bãi rào kín để giảm thiểu việc nhiễm chéo bởi các gà được điều trị.

B. Thiết kế thử nghiệm và các chế phẩm điều trị - Nghiên cứu 2

18 mẫu giống nhau của hai nhóm điều trị, được nhốt bởi dây chuồng nuôi gà nhốt và bằng các bậc được thực hiện bằng cách sử dụng 500 gà con hướng thịt Cobb ngày tuổi (Cobb-Vantress ở Siloam Springs, Arkansas). Các nhóm điều trị là đối chứng (không probiotic) hoặc *Megasphaera elsdenii* chủng NCIMB 41125 đông khô (MS Biotec, Wamego, Kansas). Gà được nhốt trong 108 bãi rào kín, và mỗi bãi rào chứa 8 gà khi bắt đầu thử nghiệm (tổng 1152 gà).

Gà được chia vào các nhóm gồm 8 con, và khối lượng của mỗi nhóm được ghi lại. Gà được xử lý theo khối, và các nhóm điều trị thử nghiệm được phân chia ngẫu nhiên vào bãi rào kín trong từng khối. 18 bãi rào kín (8 gà/bãi rào; tổng 144 con) được nhận chế phẩm rắc trộn bề mặt (hỗn hợp của khẩu phần ăn và *Megasphaera elsdenii* đông khô) chứa $1,18 \times 10^7$ CFU/g *Megasphaera elsdenii* chủng NCIMB 41125 với tỷ lệ một phần tư muỗng cà phê cho mỗi con gà. Các chế phẩm điều trị đã được thêm trực tiếp vào máng cung cấp thức ăn mỗi ngày lúc 1300 giờ bắt đầu vào ngày 10 của quá trình thử nghiệm.

18 bãi rào kín còn lại (8 gà/bãi rào; tổng 144 gà) được dùng làm đối chứng, và không tiếp xúc với sản phẩm probiotic. Gà đối chứng được xử lý bởi các nhân viên được chỉ định và được đặt trong các vật mang được chỉ định để cân và chuyển sang bãi rào kín để giảm thiểu sự nhiễm chéo bởi các gà đã được xử lý.

C. Cho ăn và Cho uống nước – Các nghiên cứu 1 và 2

Nước sạch có sẵn tùy thích. Trước khi đặt gà vào bãi rào kín, 9,5 kg chế độ ăn giai đoạn khởi động thông thường (**Bảng 12**) được đặt vào máng cung cấp thức ăn dọc theo mỗi bãi rào.

Bảng 12. Thành phần của khẩu phần ăn thử nghiệm⁺

Thành phần	
Ngô nghiền	55,26
Bột đậu nành (47% CP)	37,15
Dầu đậu nành	3,10
Đá vôi nghiền	1,45
Biofos 21%	1,70
Muối	0,37
Natri bicacbonat	0,22
Hỗn hợp vitamin cho gia cầm	0,25
L-lysin hydroclorua	0,33
L-Metionin	0,13
L-Threonin	0,04
⁺ Khẩu phần ăn được tạo viên qua lỗ khuôn 3mm, được làm lạnh, và nghiền vỡ	

Thức ăn được bổ sung khi cần để đảm bảo ăn tùy thích trong suốt quá trình nghiên cứu. Khi kết thúc (ngày 18) thử nghiệm, thức ăn chưa được tiêu thụ được lấy ra khỏi mỗi máng, được cân, và được ghi lại. Tổng thức ăn được tiêu thụ theo bãi rào được tính là sự chênh lệch giữa lượng được thêm vào và lượng thu hồi từ máng. Mức hấp thu thức ăn hàng ngày cho mỗi gà được tính là: Tổng lượng thức ăn tiêu thụ ÷ [số đầu hàng ngày trong bãi rào x tổng số ngày ăn]

D. Khối lượng của gà - Các nghiên cứu 1 và 2

Tại thời điểm kết thúc nghiên cứu, tất cả gà trong bãi rào được đặt vào bồn (dài 50 cm x rộng 35 cm, x sâu 40 cm) và được cân. Khối lượng của bồn được cân trước khi cho gà vào và được trừ cho tổng cân nặng để xác định cân nặng của gà trong bãi rào. Xác định số lượng đầu cũng được thực hiện ở thời điểm này.

E. Phân tích thống kê - Các nghiên cứu 1 và 2

Dữ liệu được phân tích sử dụng quy trình hỗn hợp của SAS® phần mềm 9.4. Mô hình bao gồm tác động cố định là việc điều trị, tác động ngẫu nhiên là khối, và bãi rào là đơn vị thử nghiệm. Mức có ý nghĩa khi $P < 0,05$. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình bình phương tối thiểu được xác định bằng cách sử dụng tùy biến PDiff của phần mềm SAS®.

F. Kết quả - Các nghiên cứu 1 và 2

Đối với 1, gà hướng thịt ở tất cả các nhóm điều trị thể hiện mức hấp thu thức ăn hàng ngày, mức tăng cân trung bình hàng ngày, mức tăng cân:thức ăn, và tỷ lệ chết tương tự.

Tuy nhiên, như được thể hiện trên **Bảng 13**, nghiên cứu 2 đã thể hiện rằng mức tăng cân trung bình hàng ngày ($P = 0,02$) và mức tăng cân:thức ăn ($P = 0,04$) đều lớn hơn ở gà được nhận *Megasphaera elsdenii* đông khô khi so sánh với gà đối chứng. Xem **FIG. 21**, thể hiện tỷ lệ thức ăn:mức tăng cân. Mức hấp thu thức ăn và tỷ lệ chết không khác biệt giữa các nhóm điều trị.

Bảng 13. Ảnh hưởng của *Megasphaera elsdenii* lên năng suất của gà hướng thịt (Nghiên cứu 2)

Mục	Đối chứng ⁺	Đông khô [‡]	SEM ²	Giá trị $P^{††}$
Số, bãi rào	18	18	-	-
ADG ¹ , g	27,6 ^a	29,0 ^b	0,43	0,02
Hấp thu thức ăn, g/ngày	36,2	36,5	0,54	0,70
Tăng trọng:thức ăn	0,76 ^a	0,80 ^b	0,01	0,04
Tỷ lệ chết, %	2,08	0,69	0,93	0,31

¹ Tăng trọng hàng ngày trung

² Sai số chuẩn của giá trị trung

+ Điều trị đối chứng, không có probiotic

[‡] *Megasphaera elsdenii* đông khô được dùng hàng ngày ở dạng chế phẩm rắc trộn bề mặt

^{††} Giá trị P- cho kiểm định F toàn bộ mẫu

^{a, b} Giá trị trung bình trong mỗi dòng có các chỉ số trên khác nhau là khác nhau ở $P < 0,05$

Ví dụ 10: Ảnh hưởng của *Megasphaera elsdenii* lên quá trình lên men trong manh tràng ngựa

A. Thiết kế thử nghiệm và các nhóm điều trị

8 góc chân của ngựa, 4 ngựa cái và 4 ngựa đực (thể trọng trung bình = 540 kg; SEM = 75 kg), trước đó được lắp ống hút canula manh tràng (Beard et al., JAS 89(8): 2425-2429 (2011)), được sử dụng theo kiểu bố trí ô vuông la tinh không đầy đủ 3 x 3 (nhóm điều trị x ngựa) được lặp lại qua 3 khoảng thời gian điều trị. Mỗi giai đoạn điều trị được cách bởi khoảng thời gian ngưng thuốc 28 ngày. Các nhóm điều trị là (1) đối chứng âm (không *M. elsdenii*; đối chứng), (2) 50 mL giống nuôi cấy mới chứa $1,97 \times 10^9$ CFU/mL *M. elsdenii* chủng NCIMB 41125 (Lactipro Advance®, MS Biotec, Wamego, Kansas) được dùng dưới

dạng liều thuốc nước qua đường uống (Thuốc nước), và (3) 0,40 g giống nuôi cấy đông khô chứa $7,02 \times 10^8$ CFU/mL *M. elsdenii* chủng NCIMB 41125 (MS Biotec, Wamego, Kansas) được dùng qua 2 chế phẩm điều trị chứa mật đường (Đông khô). Ngựa được phân chia ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị (**Bảng 14**).

Bảng 14. Phân bổ điều trị

Ngựa ID	Giai đoạn 1 TRT	Giai đoạn 2 TRT	Giai đoạn 3 TRT
0	Đông khô ³	Đối chứng ¹	Thuốc nước ²
1	Đối chứng	Thuốc nước	Đông khô
2	Thuốc nước	Đông khô	Đối chứng
3	Đối chứng	Thuốc nước	Đông khô
4	Thuốc nước	Đối chứng	Đông khô
6	Thuốc nước	Đông khô	Đối chứng
7	Đông khô	Thuốc nước	Đối chứng
10	Đông khô	Đối chứng	Thuốc nước

¹ Đối chứng – không được điều trị bằng *M. elsdenii*

² Liều thuốc nước – ngựa được nhận 50 mL *M. elsdenii* dưới dạng chế phẩm dùng qua đường uống ($1,97 \times 10^9$ CFU/mL) khi bắt đầu mỗi giai đoạn điều trị

³ Đông khô – ngựa được nhận *M. elsdenii* hàng ngày dưới dạng bột đông khô trung bình $7,02 \times 10^8$ CFU/mL trong 2 chế phẩm điều trị chứa mật đường

Ngựa được nhốt trong các chuồng riêng rẽ (3,05 x 3,66 m) trong nhà kho và được trải dăm thông. Ngựa được phân chia ngẫu nhiên vào các chuồng khác nhau cho mỗi giai đoạn điều trị bởi có thể có bất kỳ sự thay đổi về mức thông gió hoặc nhiệt độ dựa trên vị trí trong chuồng. Ngựa được đi bộ hàng ngày để luyện tập trong quá trình thử nghiệm.

Ngựa được nhận liều thuốc nước qua đường uống được dùng theo liều ngay trước khi cho ăn vào ngày 1 của mỗi giai đoạn điều trị với 50 mL giống nuôi cấy mới chứa $1,97 \times 10^9$ CFU/mL *M. elsdenii* chủng NCIMB 41125 sử dụng một thiết bị định liều thao tác bằng tay (thiết bị phun tự động khả biến 60 mL, MKIII, NJ Phillips, NSW, Australia). Trước khi dùng giống nuôi cấy probiotic, túi giống nuôi cấy mới 5 L được lắc mạnh để đồng nhất hóa các thành phần. Một thiết bị định liều thao tác bằng tay được gắn vào túi bằng cách sử dụng ống Tygon và vật chứa được điền đầy. Khoảng 100 đến 200 mL giống nuôi cấy được xả vào vật chứa rác để đảm bảo ống và thiết bị không có oxy.

Ngựa trong nhóm điều trị probiotic đông khô được nhận 2 chế phẩm điều trị chứa ngô và mật đường bao gồm sản phẩm đông khô trước khi ăn sáng mỗi ngày. *M. elsdenii* chủng NCIMB 41125 được đông khô từ trước khi nghiên cứu và được bao gói trong gói nhỏ bịt kín chân không chứa khoảng 0,40 g vi khuẩn đông khô với trung bình $7,02 \times 10^8$

CFU/mL *M. elsdenii*. Một mẫu được dàn mỏng mỗi ngày để đảm bảo khả năng sống của vi khuẩn thống nhất trong mỗi giai đoạn thử nghiệm. Nếu ngựa từ chối điều trị, sản phẩm đông khô được dùng bằng tay dưới dạng viên thuốc lớn.

Các con ngựa còn lại không tiếp xúc với probiotic trong suốt giai đoạn trong đó chúng dùng làm đối chứng.

B. Cho ăn và cho uống nước

Trong khoảng thời gian điều trị, ngựa được cho ăn hai lần mỗi ngày bằng cỏ khô và thể cô chia đều giữa hai lần cho ăn. Mỗi ngựa được cho ăn 1% thể trọng của nó khi được cho ăn cỏ yến mạch mỗi ngày (**Bảng 15**).

Bảng 15. Phân tích dinh dưỡng chế độ ăn

Thành phần trên cơ sở chất khô (DM), %	Cỏ yến mạch 1 ^a	Cỏ yến mạch 2 ^b	Chất cô ^c
DM	90,5	92	87,9
Protein thô (CP)	8,2	8,4	14,5
Chất xơ xử lý bằng chất tẩy axit (ADF)	39,2	42,2	8,1
Chất xơ xử lý bằng chất tẩy trung tính và amylaza (aNDF)	63,9	68,9	15,8
Mỡ thô	2,5	2,1	--
Tinh bột	1,6	0,8	--
Tro	7,27	6,93	--
Năng lượng tiêu hoá (DE) Mcal/kg	2,05	0,87	1,6
Canxi	0,38	0,3	,87
Phospho	0,15	0,22	,74
Magie	0,17	0,16	,17
Kali	1,50	1,74	,88

^a Cho ăn ở tỷ lệ 1% thể trọng khi ăn/ngày trong thời gian điều trị

^b Cho ăn *tùy thích* trong khi ngừng điều trị

^c Chi ăn với lượng tăng dần là 0,2% thể trọng khi ăn/ngày đến tối đa 1% thể trọng khi ăn trong thời gian điều trị

Mỗi ngựa được tăng cường 1% thể trọng của nó chất cô được tạo kết cấu (phân tích trong **Bảng 15**, ở trên, chế phẩm trong **Bảng 16**, dưới đây) ở tỷ lệ 0,2% thể trọng của nó mỗi ngày từ ngày 1 đến ngày 5 và sau đó duy trì ở 1% BW AF về hạt trong ngày 5 đến ngày 7. Tất cả các con ngựa từ chối được cân và được ghi lại. Các chuồng được trang bị hệ thống cấp nước tự động để cấp nước sạch, tùy thích. Hệ thống cấp nước được làm sạch và được kiểm tra chức năng thích hợp nhiều lần mỗi ngày.

Bảng 16. Thành phần của chất cô thử nghiệm^a

Thành phần, % trong chế	Mức bao gồm
Ngô	20,00
Yến mạch	61,67
Mật đường	10,00
Bột đậu nành, 48%	5,22
Đá vôi	1,25%
Muối	0,50%
Mono Canxi	1,02%
Vit A 30,000	0,01%
Vit D 30,000	0,00%
Vit E 20,000	0,25%
Cu Sulfat	0,01%
Zn Oxit	0,01%
Na Selenit	0,06%

^aĐược ăn trong quá trình điều trị với lượng tăng dần từ 0,2% thể trọng khi ăn/ngày đến tối đa 1% thể trọng khi ăn

Trong thời gian ngừng sử dụng chế phẩm điều trị ngựa được nhốt trong một lô khô và được duy trì chế độ ăn cỏ yến mạch khô tùy thích (Bảng **). Ngựa được cân tại thời điểm kết thúc mỗi giai đoạn ngừng điều trị để đảm bảo tính toán chính xác lượng thức ăn được cung cấp trong suốt thời gian điều trị.

C. Quy trình lấy mẫu

Các mẫu manh tràng được thu thập qua ống canula manh tràng mỗi 4 giờ trong mỗi khoảng thời gian điều trị 7 ngày. Ngựa được cho ăn lúc 10:00 giờ và 22:00 giờ mỗi ngày và các mẫu được thu thập lúc 4, 8 và 12 giờ sau khi ăn trước lần ăn sau đó. Vào ngày 0 của mỗi giai đoạn điều trị, các mẫu được thu thập trước khi dùng theo liều hoặc cho ăn để thiết lập các giá trị độ pH, VFA và quần thể *M. elsdenii* cơ bản trong ruột cuối.

Các mẫu được thu thập bằng việc loại bỏ nắp ống canula và lấy thành phần manh tràng khi chúng chảy ra khỏi ống canula. Dịch manh tràng được lọc qua bốn lớp vải mỏng, và sau đó được đặt vào cốc đựng mẫu 100 ml. Nếu một mẫu thích hợp không được thu thập bằng dòng trọng lực, một máy bơm cầm tay đã được sử dụng để chiết thành phần manh

tràng. Lúc 10:00 giờ vào các ngày 0, 1, 3 và 7, các mẫu manh tràng bổ sung được thu thập để phân tích PCR. Trong giai đoạn điều trị thứ nhất, các mẫu được thu thập chưa được lọc trong các lọ nắp nháy HDPE 20mL (Fischer Sci.; 03-337-23B). Các mẫu chưa được lọc này có thách thức trong việc tách mẫu để chiết xuất ADN, vì thế trong hai giai đoạn điều trị còn lại, dịch manh tràng đã lọc được thu thập trong các ống ly tâm hình nón Falcon 50mL (Corning Inc. 352070; Corning, NY) và được đông lạnh ngay ở -80°C để đợi phân tích PCR. Kỹ thuật viên thay găng tay giữa mỗi con ngựa.

D. Phân tích độ pH và axit béo dễ bay hơi của manh tràng

Độ pH của dịch manh tràng đã lọc được xác định ngay sau khi thu thập bằng cách sử dụng dụng đo độ pH cầm tay (Thermo Scientific Orion dụng đo độ pH cầm tay 3 sao, Waltham, MA; Accumet probe). Sau khi độ pH được ghi, mẫu được chuyển với phần phân ước 1 mL vào trong 2 ống vi ly tâm và được trộn với 0,25 mL axit meta-phosphoric 25% để khử protein. Các mẫu được đông lạnh ở nhiệt độ -18°C trong ít nhất 24 giờ trước khi phân tích VFA.

Các mẫu manh tràng được axit hóa và đông lạnh được rã đông và được làm đồng nhất bằng cách sử dụng thiết bị trộn xoáy và được ly tâm ở $24 \times g$ trong 18 phút. Sau đó dịch nổi được chuyển sang lọ sắc ký khí. Các axit béo dễ bay hơi được xác định bằng cách sử dụng sắc ký khí Agilent 7890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) được lắp cột mao quản DB-WAX (độ dày màng 10 mm x 0,10 mm x 0,1 mm; Agilent and J&W columns, Santa Clara, CA) và bộ phát hiện ion hóa ngọn lửa. Hydro được sử dụng làm khí mang ở lưu lượng 46 cm/giây, với bơm phân tách 1 μL và dòng phân tách 50:1. Nhiệt độ lò ban đầu là 70°C và nhiệt độ được tăng lên $15^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến 130°C , sau đó tăng theo tốc độ $60^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến 220°C và được giữ trong 2 phút. Nhiệt độ đầu vào và đầu dò tương ứng là 260°C và 300°C . Axit béo dễ bay hơi được định lượng bằng cách so sánh với các chất chuẩn đã biết (Supelco Volatile Fatty Acid Standard Mix; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) bao gồm axetat, Propionat, Isobutytrat, Butytrat, Isovalerat, Valerat, Isocaproat, Caproat và Heptanoat.

E. Phân tích thống kê

Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng quy trình Glimmix của phần mềm SAS® phiên bản 9.4. Mô hình bao gồm tác động cố định là điều trị và tác động ngẫu nhiên là ngựa, tương tác giai đoạn và điều trị theo giai đoạn. Ngựa được dùng làm đơn vị thử nghiệm. Ảnh hưởng của việc điều trị với số giờ trong ngày là không đáng kể đối với thông số bất kỳ và vì thế được loại trừ khỏi mô hình. Việc có ý nghĩa khi $P < 0,05$, và xu hướng được xem xét là $0,05 < P < 0,10$. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình bình phương tối thiểu được xác định bằng cách sử dụng tùy biến PDiff của phần mềm SAS®.

F. Kết quả

Độ pH manh tràng có xu hướng lớn hơn ở ngựa được điều trị bằng *M. elsdenii* so với đối chứng do việc kết hợp các hạt trong chế độ ăn tăng. Xem **FIG. 22**. Độ pH manh tràng của ngựa được dùng *M. elsdenii* dưới dạng liều thuốc nước dùng qua đường uống là cao hơn đối chứng vào ngày 5 (tương ứng là 7,00 và 7,19; $P = 0,09$), ngày thứ nhất trong đó toàn bộ ngũ cốc được cho ăn. Vào ngày 7, ngựa nhận *M. elsdenii* dưới dạng chế phẩm đông khô có xu hướng có độ pH manh tràng (7,19) lớn hơn đối chứng (6,99; $P = 0,09$).

Bảng 17 Thể hiện profin VFA của các nhóm điều trị.

Bảng 17. Ảnh hưởng của *M. elsdenii* lên profin VFA manh tràng ngựa

Mục*	Ngày	Đối chứng ¹	Thuốc nước ²	Đông khô ³	SEM	Giá trị P	
						Điều trị ^r	Ngược lại ^{rr}
Axetat	0	47,02 ^{A, a}	43,03 ^{A, ab}	45,73 ^{A, a}	5,928	D	0,55
	5	43,72 ^{A, a}	40,88 ^{A, b}	40,08 ^{A, a}			
	6	39,41 ^{A, b}	38,53 ^{A, ab}	35,54 ^{A, b}			
	7	38,36 ^{A, b}	36,63 ^{A, a}	36,39 ^{A, b}			
Propionat	0	14,86 ^{A, a}	14,12 ^{A, acd}	15,81 ^{A, abc}	3,078	D	0,54
	5	19,22 ^{A, ab}	18,80 ^{A, bc}	18,25 ^{A, b}			
	6	17,84 ^{A, abc}	17,67 ^{A, c}	15,08 ^{A, c}			
	7	16,78 ^{A, c}	15,24 ^{A, d}	14,54 ^{A, c}			
Axetat: Propionat	0	3,50 ^{A, a}	3,36 ^{A, a}	3,47 ^{A, a}	0,252	D	0,55
	5	2,37 ^{A, b}	2,32 ^{A, b}	2,32 ^{A, b}			
	6	2,33 ^{A, b}	2,29 ^{A, b}	2,46 ^{A, b}			
	7	2,41 ^{A, b}	2,60 ^{A, c}	2,83 ^{B, c}			
Butyrat	0	5,10 ^{A, a}	4,26 ^{A, ab}	4,58 ^{A, ab}	0,900	D	0,45
	5	4,70 ^{A, a}	4,18 ^{A, a}	4,22 ^{A, b}			

	6	4,15 ^{A, a}	3,67 ^{A, ab}	3,81 ^{A, ab}			
	7	3,53 ^{A, b}	3,36 ^{A, b}	3,57 ^{A, a}			
Isobutytrat	0	-0,01 ^{A, a}	-0,01 ^{AB, ab}	0,12 ^{B, a}	0,051	I	0,25
	5	0,01 ^{A, a}	0,02 ^{A, b}	0,07 ^{A, a}			
	6	0,00 ^{A, a}	0,05 ^{A, ab}	0,03 ^{A, b}			
	7	0,00 ^{A, a}	0,05 ^{A, a}	0,04 ^{A, b}			
Valerat	0	0,16 ^{A, a}	0,04 ^{A, a}	0,10 ^{A, ab}	0,096	I	0,31
	5	0,14 ^{A, a}	0,05 ^{B, a}	0,08 ^{A, b}			
	6	0,12 ^{A, a}	0,07 ^{A, a}	0,13 ^{A, ab}			
	7	0,04 ^{A, b}	0,07 ^{A, a}	0,15 ^{B, a}			
Caproat	0	0,000	0,000	0,007	0,0120	--	0,57
	5	0,000	0,000	0,000			
	6	0,000	0,000	0,007			
	7	0,000	0,000	0,015			
Tổng VFA	0	67,14 ^{A, ab}	61,46 ^{A, ab}	66,44 ^{A, a}	9,487	D	0,54
	5	67,82 ^{A, b}	63,97 ^{A, b}	62,73 ^{A, a}			
	6	61,53 ^{A, a}	60,06 ^{A, ab}	54,60 ^{A, b}			
	7	58,73 ^{A, a}	55,43 ^{A, a}	54,69 ^{A, b}			

* Nồng độ VFA được thông báo theo mM

¹ Đối chứng – không được điều trị bằng *M. elsdenii*

² Liều thuốc nước – ngựa được nhận 50 mL *M. elsdenii* dưới dạng đưa qua ống vào dạ dày (1,97 x 10⁹ CFU/mL) khi bắt đầu mỗi giai đoạn điều trị

³ Đông khô – ngựa được nhận *M. elsdenii* hàng ngày dưới dạng bột đông khô trung bình 7,02 x 10⁸ CFU/mL trong 2 chế phẩm điều trị chứa mật đường

[†] T = Ảnh hưởng của việc điều trị; D = Ảnh hưởng của ngày lấy mẫu; I = Tương tác giữa việc điều trị và ngày lấy mẫu; $P < 0,05$

^{††} Tương phản '*M. elsdenii* với. Đối chứng'

^{A, B} Các giá trị trung bình ở mỗi dòng không có chỉ số trên giống nhau là khác nhau ở $P < 0,05$

^{a, b} Các giá trị trung bình ở mỗi cột không có chỉ số trên giống nhau là khác nhau ở $P < 0,05$

Việc bổ sung *M. elsdenii* không ảnh hưởng đến nồng độ axetat hoặc propionat trong manh tràng ($P > 0,10$; Bảng **). Tuy nhiên, sự tương tác giữa việc điều trị theo ngày được phát hiện với tỷ lệ axetat: Propionat (A:P) ($P < 0,05$). Tỷ lệ A:P manh tràng vào ngày 7 ở ngựa được nhận *M. elsdenii* đông khô (2,83) lớn hơn ngựa không được nhận *M. elsdenii* (2,41) hoặc được nhận *M. elsdenii* dưới dạng liều thuốc nước dùng qua đường miệng (2,60; $P < 0,05$). Valerat manh tràng vào ngày 7 ở ngựa được nhận *M. elsdenii* đông khô (0,15 mM) lớn hơn động vật đối chứng (0,04 mM) hoặc được nhận liều thuốc nước dùng qua đường miệng chứa *M. elsdenii* (0,07 mM; $P < 0,02$). Valerat manh tràng trong ngựa được phun lên cơ thể vào ngày 5 nhỏ hơn động vật đối chứng ($P < 0,01$); tuy nhiên, tương tự với ngựa được điều trị bằng *M. elsdenii* đông khô ($P > 0,10$). Nồng độ heptanoat và

isocaproat không đáng kể, và không có tác dụng tương tác hoặc điều trị được phát hiện, vì thế các VFA được loại trừ khỏi Bảng **.

Độ pH và sản phẩm lên men mạnh tràng bị ảnh hưởng nhiều nhất bởi việc bổ sung *M. elsdenii* từ ngày 5 đến ngày 7, ngày trong đó lượng ngũ cốc tối đa đã được tiêu thụ.

Ví dụ 11: Đánh giá hiệu quả của việc dùng giống nuôi cấy lỏng *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 (Lactipro®) ở gà hướng thịt

Nghiên cứu hiệu suất gà hướng thịt thử nghiệm được thực hiện ở Tập đoàn nghiên cứu đa ngành Virginia để đánh giá hiệu quả của *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 được phun sương hoặc đưa qua ống vào dạ dày lên hiệu suất sinh trưởng của gà con hướng thịt.

Gà giống hướng thịt (n=720) được chủng ngừa bằng cách phun Coccivac-B vào ngày 0 được chia ngẫu nhiên vào 6 nhóm điều trị sau: (1) nhóm đối chứng âm không nhận *Megasphaera* (nCON), (2) nhóm phun sương nhận *M. elsdenii* NCIMB 41125 vào ngày 0 bằng cách phun sương (1-2 mL/gà) khi ở trong trại sản xuất giống của chúng (d0 Mist), (3) nhóm đưa qua ống vào dạ dày vào ngày 7 nhận 2 mL *M. elsdenii* NCIMB 41125 ngày 7 bằng chế phẩm dùng qua đường uống sau khi đói ăn 2 giờ và khát nước 1 giờ (d7 GAV), (4) nhóm đưa qua ống vào dạ dày ngày 14 nhận 5 mL *M. elsdenii* NCIMB 41125 vào ngày 14 bởi chế phẩm dùng qua đường uống sau khi đói ăn 2 giờ và khát nước 1 giờ (d14 GAV), (5) nhóm đưa qua ống vào dạ dày ngày 21 nhận 10 mL *M. elsdenii* NCIMB 41125 vào ngày 21 bởi chế phẩm dùng qua đường uống sau khi đói ăn 2 giờ và khát nước 1 giờ (d21 GAV), và 6) nhóm đối chứng dương (pCON) không nhận *Megasphaera* nhưng nhận thức ăn giai đoạn khởi động và tăng trưởng được điều trị bằng BMD (50 g/t) và thức ăn giai đoạn được điều trị bằng Stafac (20 g/t).

Mỗi nhóm đại diện bằng 4 lồng chứa 30 con mỗi lồng. Chế độ ăn uống cung cấp cho gà như sau: thức ăn giai đoạn khởi động từ ngày 0-18, thức ăn giai đoạn tăng trưởng từ ngày 18-35, và thức ăn giai đoạn hoàn thiện từ ngày 35-39. Khối lượng của động vật, mức tiêu thụ thức ăn, và mức chuyển hóa thức ăn được ghi lại trong khoảng thời gian thử nghiệm 39 ngày.

Bảng 18: Hiệu suất gà hướng thịt được xác định sau 25 và 39 ngày cho ăn.

	nCON	pCON	d0 Mist	d7 GAV	d14 GAV	d21 GAV
Khối lượng hơi ngày 25, lbs	2,288 ^a	2,288 ^a	2,237 ^{ab}	2,160 ^b	2,212 ^{ab}	2,188 ^b
FCR, ngày 1-25	1,531 ^a	1,516 ^a	1,430 ^b	1,555 ^a	1,531 ^a	1,571 ^a
Tỷ lệ chết ngày 25, %	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,83 ^{ab}	0,00 ^a	1,67 ^b
Khối lượng hơi ngày 39, lbs	4,713 ^a	5,100 ^a	4,886 ^a	4,880 ^a	5,121 ^a	4,907 ^a
FCR, ngày 1-39	1,814 ^b	1,754 ^{ab}	1,739 ^{ab}	1,771 ^{ab}	1,715 ^{ab}	1,674 ^a
Tỷ lệ chết ngày 39, %	0,017 ^a	0,00 ^a	0,83 ^a	1,67 ^a	1,67 ^a	3,33 ^a

^{a, b} Giá trị trung bình trong mỗi hàng với chỉ số trên khác nhau là khác nhau ở $P < 0,05$.

Các kết quả được trình bày trên **Bảng 18**. Tỷ lệ chết tổng số không khác biệt giữa các nhóm điều trị (**Bảng 18**). Mức chuyển hóa thức ăn đối với Nhóm d0 Mist thấp hơn một cách đáng kể so với tất cả các nhóm điều trị vào ngày 25 với sự cải thiện 5,3% so với pCON và cải thiện 6,5% so với nCON. Sau 39 ngày cho ăn, mức chuyển hóa thức ăn của nhóm được điều trị bằng *Megasphaera elsdenii* không khác biệt một cách đáng kể với pCON nhưng có xu hướng thấp hơn về số lượng ngoại trừ d7 GAV. Mức chuyển hóa thức ăn đối với nhóm d21 GAV thấp hơn một cách đáng kể so với nCON với mức cải thiện 7,7% về mức chuyển hóa thức ăn.

Ví dụ 12: Nuôi cấy các chủng *M. elsdenii* khác nhau trên môi trường sinh trưởng bán xác định được bổ sung hai nguồn cacbon

A. Thiết kế thử nghiệm

Các chủng vi khuẩn dưới đây được sử dụng trong ví dụ này: (1) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, (2) *Megasphaera elsdenii* ATCC 25940, (3) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702261, (4) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702262, và (5) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410.

Tất cả các chủng được nuôi cấy trong các chai huyết thanh trên môi trường sinh trưởng lactat bán xác định. Sau đó giống nuôi cấy thu được được sử dụng để chủng đĩa 96 lỗ chứa môi trường sinh trưởng bán xác định được bổ sung hai nguồn cacbon: Na-lactat và glucoza bao gồm 60% lactat và 40% glucoza, 70% lactat và 30% glucoza, hoặc 40% lactat và 60% glucoza.

Các đĩa 96 lỗ sau đó được ủ ở 39°C trong điều kiện yếm khí và mật độ quang (600 nm) được tự động ghi lại tại các khoảng thời gian 15 phút.

B. Phân tích đặc điểm sinh trưởng của các chủng M. elsdenii trên các môi trường chứa hai nguồn cacbon

Các đường cong sinh trưởng thu được từ các môi trường bán xác định khác nhau và với các chủng *M. elsdenii* khác nhau được lập đồ thị, với thời gian nuôi cấy trên trục x và giá trị đọc mật độ quang trên trục y, để so sánh đặc điểm sinh trưởng (FIG. 23-25).

Tất cả các chủng *M. elsdenii* được thử nghiệm trong thử nghiệm thể hiện đặc điểm sinh trưởng tương tự khi được nuôi cấy trên môi trường bán xác định bao gồm 60% lactat và 40% glucoza, 70% lactat và 30% glucoza, hoặc 40% lactat và 60% glucoza.

Ví dụ 13: Nuôi cấy các chủng *M. elsdenii* khác nhau trên môi trường sinh trưởng bán xác định được bổ sung được bổ sung hai nguồn cacbon theo dõi bởi các tế bào đông khô

A. Thiết kế thử nghiệm

Các chủng vi khuẩn dưới đây được sử dụng trong ví dụ này: (1) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, (2) *Megasphaera elsdenii* ATCC 25940, (3) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702261, (4) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702262, và (5) *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410.

Tất cả các chủng được nuôi cấy trong các chai huyết thanh trên môi trường sinh trưởng lactat bán xác định. Các giống nuôi cấy thu được sau đó được sử dụng để chủng vào bình lên men 5-L chứa môi trường sinh trưởng bán xác định được bổ sung hai nguồn cacbon: Na-lactat và glucoza bao gồm 60% lactat và 40% glucoza hoặc 70% lactat và 30% glucoza.

Mẫu các giống nuôi cấy được thu thập sau 8, 10, 12, 14, và 16 giờ sinh trưởng, được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và tế bào được thu hoạch theo cách vô trùng và yếm khí bằng cách loại bỏ 99% chất lỏng. Phần cô đặc được trộn với dung dịch chất bảo quản đông lạnh (sucroza) ở tỷ lệ 1/5, trong các điều kiện vô trùng và yếm khí, để thu được nồng độ sucroza cuối cùng là 5% khối lượng/thể tích. Hỗn hợp được lấy mẫu để xác định nồng độ *M. elsdenii* trước đông khô (tức là, số tế bào sống sót).

Phân phân ước của hỗn hợp tạo thành được chuyển sang lọ 10 mL (4 mL/lọ) và đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng. Lọ được chuyển sang thiết bị đông khô để được đông khô

sau chu trình nhanh. Khi việc đông khô hoàn thành, khả năng sống của vi khuẩn được xác định bằng cách huyền phù lại sản phẩm được đông khô trong buồng yếm khí với chất pha loãng yếm khí, để tái hydrat trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó cấy trên aga lactat bán xác định (*tức là*, tính tế bào sống).

Mức tổn thất tế bào được tính bằng cách trừ nồng độ *M. elsdenii* được thu hồi sau đông khô từ nồng độ *M. elsdenii* ban đầu (trước đông khô).

B. So sánh mức tổn thất tế bào sau đông khô của các chủng M. elsdenii khác nhau trên các môi trường bán xác định khác nhau, được thu hoạch và đông khô ở các thời điểm khác nhau trong quá trình sinh trưởng

Tất cả các chủng *M. elsdenii* được thử nghiệm trong thử nghiệm này thu được tế bào sống sau đông khô. Giới hạn tổn thất tế bào chấp nhận được được thiết lập ở 1,6 log CFU/mL. Mức tổn thất tế bào gặp phải trong quá trình đông khô tế bào được sinh trưởng trên môi trường bán xác định chứa 70% lactat và 30% glucoza (**Bảng 19**), không liên quan đến chủng hoặc thời gian thu hoạch đều thấp hơn giới hạn chấp nhận được và nằm trong khoảng từ 0,3 đến 1,3 log.

Bảng 19: Tổn thất tế bào (Log CFU/mL) quan sát được sau đông khô ở chủng *M. elsdenii* được sinh trưởng trên môi trường bán xác định bao gồm 70% lactat và 30% glucoza, được thu hoạch và đông khô sau 8, 10, 12, 14, hoặc 16 giờ nuôi cấy.

Chủng	Thời gian thu hoạch, giờ				
	8	10	12	14	16
NCIMB 41125	-	0,41	0,46	0,60	0,42
ATCC 25940	0,61	0,56	0,64	0,80	0,61
NCIMB 702261	0,76	0,85	1,09	0,81	1,29
NCIMB 702262	0,65	0,98	1,01	0,96	0,99
NCIMB 702410	0,81	0,83	1,00	1,02	1,20

Mức tổn thất tế bào gặp phải trong quá trình đông khô tế bào được sinh trưởng trên môi trường bán xác định chứa 60% lactat và 40% glucoza (**Bảng 20**), bị ảnh hưởng nhiều hơn bởi thời gian thu hoạch, nhưng tất cả các chủng đều dẫn đến việc tổn thất tế bào mà thấp hơn giới hạn chấp nhận được trong ít nhất ba thời điểm thu hoạch. Việc tối ưu hóa thời gian thu hoạch trước khi sấy đông khô có thể giúp cải thiện hơn nữa hiệu quả thu hồi sau quá trình sấy đông khô.

Bảng 20: Mức tổn thất tế bào (Log CFU/mL) quan sát được sau đông khô ở các chủng *M. elsdenii* được sinh trưởng trên môi trường bán xác định bao gồm 60% lactat và 40% glucoza, được thu hoạch và đông khô sau 8, 10, 12, 14, hoặc 16 giờ nuôi cấy.

Chủng	Thời gian thu hoạch, giờ				
	8	10	12	14	16
NCIMB 41125	0,34	0,28	0,34	0,37	0,33
ATCC 25940	0,72	1,46	2,01	1,80	1,47
NCIMB 02261	0,74	1,26	1,28	1,48	1,45
NCIMB 02262	0,58	1,19	1,74	1,32	1,80
NCIMB 02410	-	0,70	1,12	1,37	1,19

Toàn bộ các phương pháp được mô tả trong bản mô tả thu được sản phẩm đông khô chứa tế bào sống không liên quan đến các chủng *Megasphaera elsdenii* được sử dụng.

Ví dụ 14: Bao nang *M. elsdenii* đông khô và xác định độ ổn định của chúng

Phần cô đặc *M. elsdenii* NCIMB 41125 thu được qua TFF được trộn vô trùng với chất bảo quản đông lạnh dung dịch (sucroza) ở tỷ lệ 1/5 để thu được nồng độ sucroza cuối cùng 5% (khối lượng/thể tích). Hỗn hợp được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được chuyển sang thiết bị đông khô để được đông khô sử dụng chu trình nhanh. Khi việc đông khô hoàn thành, khả năng sống của vi khuẩn được xác định bằng cách huyền phù lại sản phẩm được đông khô trong buồng yếm khí với chất pha loãng yếm khí, để tái hydrat trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó cấy trên aga lactat bán xác định.

Bột *M. elsdenii* đông khô tạo thành sau đó được trộn với chất mang (chất độn) và được bao nang bằng cách phân tán bột này vào dầu cọ chung cất hoặc axit stearic đã làm nóng. Hỗn hợp sau đó được làm lạnh nhanh và sản phẩm được lấy mẫu để xác định khả năng sống của vi khuẩn. Các mẫu được huyền phù lại trong buồng yếm khí với chất pha loãng yếm khí, được trộn trong 15 giây, và tái hydrat trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng trước khi được cấy trên aga lactat bán xác định. Thử nghiệm được lặp lại ba lần bằng cách sử dụng nhiệt độ làm nóng khác nhau và các loại dầu khác nhau (phương pháp 1, 2, và 3). Phương pháp 1 sử dụng nhiệt độ làm nóng là 110°C và dầu cọ chung cất làm nguyên liệu bao nang. Phương pháp 2 sử dụng nhiệt độ làm nóng là 52°C và hỗn hợp của mono- và di-glyxerit của các axit palmitic, stearic, oleic, linoleic, và linolenic làm nguyên liệu bao nang. Phương pháp 3 sử dụng nhiệt độ làm nóng là 65°C và hỗn hợp của mono- và di-glyxerit của các axit palmitic, stearic, oleic, linoleic, và linolenic làm nguyên liệu bao nang.

Phần trăm tổn thất được tính bằng cách trừ nồng độ *M. elsdenii* được thu hồi sau khi bao nang từ nồng độ được thu hồi sau đông khô và chia cho nồng độ thu hồi sau đông khô.

Các mẫu bổ sung được thu thập từ sản phẩm được bao nang, sử dụng phương pháp 2 và phương pháp 3, và bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong điều kiện hiếu khí trong thời gian 4 tháng để đánh giá độ ổn định của sản phẩm. Các mẫu được huyền phù lại trong buồng yếm khí với chất pha loãng yếm khí, được trộn trong 15 giây, và tái hydrat trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng trước khi được cấy trên aga lactat bán xác định. FIG. 26 và 27 thể hiện độ ổn định của *M. elsdenii* đông khô được bao nang sử dụng phương pháp 2 hoặc 3 chỉ tổn thất khoảng 1 log CFU/g.

Bảng 21: Phần trăm tổn thất quan sát được sau khi bao nang *M. elsdenii* đông khô sử dụng phương pháp 1, 2, hoặc 3.

Phần trăm tổn thất sau khi bao nang	
Phương pháp 1	83,4 %
Phương pháp 2	24,5 %
Phương pháp 3	32,1 %

Phương pháp 2 và 3 được sử dụng để bao nang *M. elsdenii* đông khô dẫn đến mức thu hồi tế bào lớn hơn 67,9% (Bảng 21).

Ngoài ra, các mẫu đông khô được bao nang theo phương pháp 2 hoặc phương pháp 3 dẫn đến việc giảm khả năng sống của tế bào là 1 log trong khi bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong điều kiện oxy và độ ẩm bình thường trong thời gian lên đến 4 tháng.

Việc bao nang *M. elsdenii* đông khô theo phương pháp 2 và 3 cũng bảo vệ cho vi khuẩn tránh được oxy và độ ẩm. Quá trình này sẽ cho phép bảo quản *M. elsdenii* đông khô được bao nang ở nhiệt độ trong phòng không cần bao gói đặc biệt và sẽ cho phép bổ sung sản phẩm vào thức ăn.

Ví dụ 15: Thời hạn sử dụng của *M. elsdenii* đông khô được sản xuất ở quy mô thử nghiệm

A. Thiết kế thử nghiệm

Mé 600 L chứa môi trường bán xác định bao gồm 70% lactat và 30% glucoza được sử dụng trong thử nghiệm để nuôi *M. elsdenii* NCIMB 41125. Sau 14 giờ ủ ở 39°C, giống nuôi cấy thu được được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và tế bào được thu hoạch bằng cách sử dụng hệ thống lọc dòng tiếp tuyến như được mô tả trong Ví dụ 2. 90% thể

tích chất lỏng được loại bỏ khỏi giống nuôi cấy và sau đó phần cô đặc được tạo huyền phù lại trong dung dịch chất bảo quản đông lạnh ở tỷ lệ 1:5 để thu được nồng độ sucroza cuối cùng là 5% khối lượng/thể tích.

Sau đó hỗn hợp được đông lạnh trong nitơ lỏng, các viên đông lạnh được chuyển sang thiết bị đông khô và được đông khô theo chu trình nhanh. Khi quá trình đông khô được hoàn thành, bột được đông khô được thu gom và được bao gói (**Bảng 22**) trong điều kiện yếm khí trong túi Mylar đơn độc (“M.e.”) hoặc với maltodextrin làm chất độn (“M.e. + Maltodextrin”).

Bảng 22: Nạp vào túi Mylar

	Đông khô bột	Maltodextrin	Tổng khối lượng túi
M.e.	0,15 g	-	0,15 g
M.e. + Maltodextrin	0,15 g	2,34 g	2,50 g

Nồng độ *M. elsdenii* trong sản phẩm đông khô (3 mẫu mỗi chế phẩm điều trị) được xác định bằng cách huyền phù lại sản phẩm được đông khô trong buồng yếm khí với chất pha loãng yếm khí, tái hydrat trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó cấy lên trên aga lactat bán xác định (tức là tính tế bào sống sót). Nồng độ *M. elsdenii* được biểu diễn là CFU/túi và được chuyển đổi thành logarit.

B. Nghiên cứu thời hạn sử dụng

Các túi Mylar chứa các chế phẩm điều trị khác nhau được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng (75°F; 25°C) hoặc 40°F (4°C). Các mẫu bổ sung thu được sau 0,5, 1, 2, 3, 4, và 6 tháng bảo quản và được xử lý theo cách giống như mô tả trước đây (3 mẫu cho mỗi chế phẩm điều trị tại mỗi thời điểm) để xác định thời hạn sử dụng của sản phẩm. Nồng độ *M. elsdenii* được biểu diễn dưới dạng CFU/túi và được chuyển đổi thành logarit.

Dữ liệu về thời hạn sử dụng được trình bày trên Fig. 28. Nồng độ *M. elsdenii* theo thời gian bị ảnh hưởng bởi thời gian bảo quản. Sau 6 tháng bảo quản, các mẫu bảo quản ở 40°F (4,4°C) là ổn định không liên quan đến sự có mặt hoặc vắng mặt của maltodextrin, trong khi đó các mẫu bảo quản ở 75°F (23,9°C) tổn thất khoảng 1,6 log đối với chế phẩm điều trị “M.e” và khoảng 0,8 log đối với chế phẩm điều trị “M.e. + Maltodextrin”.

Ví dụ 16: Sự sinh trưởng, môi trường, nhiệt độ, và độ pH của tế bào vi sinh vật

Vi khuẩn yếm khí có thể được chia thành ba nhóm, (1) các vi khuẩn yếm khí bắt buộc; (2) các vi khuẩn yếm khí không bắt buộc; và (3) các vi khuẩn yếm khí tùy ý. Các vi khuẩn yếm khí bắt buộc là các vi khuẩn không sống song trong nồng độ oxy khí quyển bình thường. Một số vi khuẩn yếm khí bắt buộc có thể sống sót ở điều kiện lên đến 8% oxy, trong khi một số khác không thể sống sót trừ khi nồng độ oxy nhỏ hơn 0,5%. Các vi khuẩn yếm khí có thể sống với sự có mặt của oxy, nhưng không sử dụng oxy để sinh trưởng. Các vi khuẩn yếm khí tùy ý có thể sử dụng oxy để hô hấp hiếu khí, nhưng cũng có thể sử dụng hô hấp yếm khí nếu không có oxy.

Tương tự, vi khuẩn hiếu khí có thể được chia thành hai nhóm: (1) vi khuẩn hiếu khí bắt buộc; và (2) vi khuẩn hiếu khí. Vi khuẩn hiếu khí bắt buộc cần oxy để thực hiện hô hấp tế bào và có thể sống ở nồng độ oxy trong khí quyển bình thường. Vi khuẩn hiếu khí cần oxy để sinh trưởng tế bào, nhưng bị tổn hại bởi nồng độ oxy trong khí quyển bình thường.

Nấm men là vi sinh vật đơn bào nhân chuẩn được phân loại là thành viên thuộc giới nấm. Nấm men có thể là vi khuẩn hiếu khí bắt buộc hoặc các vi khuẩn yếm khí tùy ý.

Megasphaera, như *M. elsdenii* và *Bifidobacterium*, như *B. breve* là loài điển hình của các vi khuẩn yếm khí bắt buộc. *Lactobacillus*, như *L. plantarum* và *Bifidobacterium*, như *B. animalis* subsp. *lactis* là loài điển hình của các vi khuẩn yếm khí không bắt buộc. *Pediococcus*, như *P. acidilactici* và *Lactobacillus*, như *L. casei* là loài điển hình của các vi khuẩn yếm khí tùy ý. *Bacillus*, như *B. subtilis* là loài điển hình của vi khuẩn hiếu khí bắt buộc. *Saccharomyces*, như *S. boulardii* và *S. cerevisiae* là loài điển hình của nấm men.

Vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men sinh trưởng trên môi trường chứa ít nhất một nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, lactat, dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, manitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men và tổ hợp của chúng. Tương tự, vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men sinh trưởng trên môi trường chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm gồm: casein, lactat, dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol,

manitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, chất chiết nấm men và tổ hợp của chúng. Vi khuẩn yếm khí sinh trưởng trong điều kiện yếm khí và với các điều kiện oxy cần thiết để hỗ trợ quá trình sinh trưởng của tế bào vi khuẩn yếm khí, và vi khuẩn hiếu khí và nấm men sinh trưởng trong các điều kiện oxy thích hợp với môi trường chứa ít nhất hai nguồn cacbon nêu trên và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15° C đến 45° C đối với *L. plantarum* và 20° C đến 45° C đối với *B. breve*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *P. acidilactici*, *L. casei*, *S. boulardii*, và *B. subtilis*. Nhiệt độ tối ưu cho các chủng này là 37° C, ngoại trừ *S. cerevisiae*, ưa thích 30° C. Độ pH của môi trường nằm trong khoảng từ 4,0 đến 9, cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ độ pH 4,0 đến 4,5, 4,5 đến 5,5, 5,5 đến 6,5, 6,5 đến 7,5, 7,5 đến 8,5, hoặc 8,5 đến 9,0. Vi sinh vật sinh trưởng cho đến khi pha sự sinh trưởng theo cấp số nhân kết thúc, tức là, ít nhất 1 giờ đến 6 giờ, 6 giờ đến 12 giờ, 12 giờ đến 24 giờ, 24 giờ đến 36 giờ, 36 giờ đến 48 giờ, 48 giờ đến 72 giờ, 72 giờ đến 96 giờ, hoặc 96 giờ đến 120 giờ.

Khi môi trường chứa ít nhất 1×10^3 CFU/g, vi sinh vật được thu hoạch trong các điều kiện thích hợp và vi sinh vật được đông khô và/hoặc được bao nang để sử dụng trong các chế phẩm thức ăn cho động vật.

Ví dụ 17: Sử dụng lọc dòng tiếp tuyến để cô đặc giống nuôi cấy vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men

Phương pháp được trình bày trong ví dụ 2 được sử dụng trong ví dụ này với vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men được bộc lộ trong ví dụ 16 và sử dụng môi trường thích hợp để cho phép tế bào vi sinh vật sinh trưởng tối ưu. Tương tự với *Megasphaera elsdenii*, sử dụng lọc dòng tiếp tuyến đối với vi khuẩn hiếu khí (*Bacillus subtilis*), vi khuẩn yếm khí (*Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Pediococcus acidilactici*, và *Lactobacillus casei*), và nấm men (*Saccharomyces boulardii* và *cerevisiae*) thu được các kết quả tương tự liên quan đến lượng vi sinh vật sống được thu hồi trong phân thẩm qua và phân cô đặc trong thời gian xử lý cô đặc. Ngoài ra, quy trình lọc không ảnh hưởng đến khả năng sống của vi sinh vật hoặc khả năng sinh trưởng của vi sinh vật sau khi lọc. Vì thế, vi sinh vật được sinh trưởng trong *canh thang* lỏng, lọc và được chuẩn bị để đông khô, đông khô, và/hoặc *bao nang*.

Ví dụ 18: Các thông số đông lạnh và đông khô đối với vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men

Để xác định sự ảnh hưởng của các thông số đông lạnh và đông khô khác nhau lên các loại vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men khác nhau, ví dụ theo ví dụ 17 được thực hiện. Tương tự với Ví dụ 3, giới hạn tổn thất tế bào chấp nhận được được thiết lập là 1,6 log CFU/mL.

Phần cô đặc của *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces boulardii*, và *Saccharomyces cerevisiae* được huyền phù lại trong dung dịch chất bảo quản đông lạnh không chứa chất bảo quản đông lạnh, sữa tách béo, trehaloza, sucroza, hoặc tổ hợp của chúng trước khi đông khô. Sau đó mỗi hỗn hợp được chuyển sang lọ và được đông lạnh chậm ở -80°C hoặc đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng, trước khi được đặt vào trong thiết bị đông khô để được đông khô bằng chu trình nhanh hoặc chậm.

Phần cô đặc không được trộn với chất bảo quản đông lạnh đều có mức tổn thất tế bào lớn hơn phần cô đặc được trộn với dung dịch chất bảo quản đông lạnh và mức tổn thất tế bào lớn hơn ngưỡng không liên quan đến chu trình đông khô hoặc phương pháp đông lạnh.

Ngoài ra, tất cả quy trình đông khô được thử nghiệm cho thấy các sản phẩm có thể giữ được khả năng sống thích hợp để giống nuôi cấy bắt đầu sự sinh trưởng sau khi tái hydrat, ngay cả sau thời gian bảo quản kéo dài từ 4 đến 12 tháng ở nhiệt độ trong phòng hoặc ít nhất 4°C.

Ví dụ 19: Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản lên năng suất và độ ổn định của vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men đông khô

Các phương pháp thử nghiệm về khả năng sống của tế bào và vi sinh vật đặc điểm sinh trưởng được trình bày trong Ví dụ 4 được sử dụng trong Ví dụ này với vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men được bộc lộ trong Ví dụ 16 và sử dụng môi trường thích hợp để cho phép tế bào vi sinh vật sinh trưởng tối ưu.

Để xác định sự ảnh hưởng của quy trình đông khô và điều kiện bảo quản lên đặc điểm sinh trưởng và thời hạn sử dụng của *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*,

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces boulardii*, và *Saccharomyces cerevisiae*, các giống nuôi cấy đông khô được sản xuất trong Ví dụ 18 sau đó được thử nghiệm về các đặc điểm sinh trưởng vi sinh vật và khả năng sống của tế bào trong khi bảo quản ở 4 °C hoặc 25 °C trong các điều kiện hiếu khí hoặc yếm khí trong 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, và 24 tuần bằng cách phân tích đường cong sinh trưởng và kỹ thuật nuôi cấy trải.

Các mẫu từ vi khuẩn yếm khí đông khô mà được bảo quản trong điều kiện hiếu khí, không liên quan đến chế phẩm điều trị, phân hủy nhanh hơn với mức tổn thất tế bào bổ sung so với mẫu tương tự được bảo quản yếm khí của chúng.

Các mẫu được bảo quản ở 25°C phân hủy nhanh hơn mẫu tương tự của chúng được bảo quản ở 4°C.

Các mẫu được đông lạnh trong nitơ lỏng và được bảo quản ở 25°C sau đông khô không bị tổn thất tế bào nhiều hơn mẫu tương tự của chúng được bảo quản ở 4°C trong khoảng thời gian bảo quản 16 tuần; tuy nhiên, sự khác biệt giữa các mẫu là đáng kể giữa nhiệt độ bảo quản 25°C và 4°C sau 20 và/hoặc 24 tuần bảo quản.

Vào mỗi ngày lấy mẫu, thử nghiệm đường cong sinh trưởng được thực hiện để so sánh đặc điểm sinh trưởng của sản phẩm đông khô với sản phẩm không đông khô. Các mẫu không đông khô mà được sử dụng cho mỗi đường cong sinh trưởng là "mới" (không quá 2 ngày tuổi). Sản phẩm đông khô được bảo quản ở 4°C có giai đoạn tiềm phát ngắn hơn sản phẩm đông khô được bảo quản ở 25 °C. Sau 16 tuần bảo quản, tất cả các mẫu từ vi khuẩn yếm khí chứa chất bảo quản đông lạnh, đông lạnh trong nitơ lỏng, đông khô, và được bảo quản trong điều kiện yếm khí được phục hồi và có khả năng sống trở lại. Tương tự, tất cả các mẫu từ vi khuẩn hiếu khí và nấm men chứa chất bảo quản đông lạnh, đông lạnh trong nitơ lỏng, và đông khô được phục hồi và cũng có khả năng sống trở lại.

Ví dụ 20: Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản lên năng suất và độ ổn định của vi khuẩn hiếu khí, yếm khí, và nấm men đông khô được bao nang

Phần cô đặc đông lạnh và đông khô của các vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men khác nhau được thực hiện như được mô tả trong các ví dụ 16-19. Sau khi đông khô, vi khuẩn yếm khí được trộn với chất mang (chất độn) và được bao nang bằng cách

phân tán bột đông khô trong dầu được làm nóng như được mô tả trong Ví dụ 14. Hỗn hợp sau đó được làm lạnh nhanh và sản phẩm thu được được lấy mẫu để xác định khả năng sống của. Các mẫu vi sinh vật yếm khí được tạo huyền phù lại trong buồng yếm khí với chất pha loãng yếm khí, được trộn trong 15 giây, và được tái hydrat trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng trước khi được cấy trên aga lactat bán xác định. Các mẫu vi sinh vật hiếu khí được huyền phù lại trong nồng độ oxy khí quyển thông thường với chất pha loãng, được trộn trong 15 giây, và được tái hydrat trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng trước khi được cấy trên aga lactat bán xác định. Thử nghiệm này được lặp lại ba lần bằng cách sử dụng các nhiệt độ và các loại dầu khác nhau (phương pháp 1, 2, và 3). Phương pháp 1 sử dụng nhiệt độ làm nóng là 110°C và dầu cọ chung cất làm vật liệu bao nang. Phương pháp 2 sử dụng nhiệt độ làm nóng là 52°C và hỗn hợp của mono- và di-glyxerit của các axit palmitic, stearic, oleic, linoleic, và linolenic làm vật liệu bao nang. Phương pháp 3 sử dụng nhiệt độ làm nóng là 65°C và hỗn hợp của các mono- và di-glyxerit của các axit palmitic, stearic, oleic, linoleic, và linolenic làm vật liệu bao nang.

Phần trăm tổn thất tế bào từ việc bao nang nhỏ hơn 40% khi sử dụng phương pháp 2 hoặc 3. Sau khi bao nang các vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn yếm khí, và nấm men khác nhau, vi sinh vật được bao nang được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong điều kiện oxy khí quyển bình thường có khả năng sống của tế bào chỉ giảm nhẹ trong thời gian bảo quản (ví dụ, giảm khả năng sống của tế bào là 0,5 đến 2-log).

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô ở quy mô thương mại, bao gồm:

(a) tạo giống nuôi cấy lỏng trong điều kiện yếm khí bao gồm tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm bao gồm: casein, lactat, dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, mannitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, và tổ hợp của chúng,

(b) thu hoạch tế bào này,

(c) bổ sung ít nhất một chất bảo quản lạnh vào tế bào đã thu hoạch này,

(d) đông lạnh tế bào,

(e) đông khô tế bào, và

(f) thu được khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* sống sau khi đông khô, trong đó phương pháp này được thực hiện trong điều kiện yếm khí ở quy mô thương mại, và trong đó chất bảo quản lạnh là fructoza, glucoza, sucroza, trehaloza, maltodextrin, betain, hoặc tổ hợp của chúng.

2. Phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô ở quy mô thương mại, bao gồm:

(a) tạo giống nuôi cấy lỏng bao gồm tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng,

(b) thu hoạch tế bào này trong vòng 12 giờ sau khi giống nuôi cấy kết thúc pha sinh trưởng theo cấp số nhân của nó và trước khi giống nuôi cấy bắt đầu pha sinh trưởng ổn định của nó,

(c) bổ sung ít nhất một chất bảo quản lạnh vào tế bào đã thu hoạch,

(d) đông lạnh tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -80°C đến khoảng -210°C trong thời gian khoảng 5 giờ thu hoạch,

(e) đông khô tế bào, và

(f) thu được từ khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* sống sau khi đông khô, trong đó phương pháp này được thực hiện trong điều kiện yếm khí ở quy mô thương mại, và trong đó chất bảo quản lạnh là fructoza, glucoza, sucroza, trehaloza, maltodextrin, betain, hoặc tổ hợp của chúng.

3. Phương pháp sản xuất tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô ở quy mô thương mại, bao gồm:

(a) tạo giống nuôi cấy lỏng bao gồm tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng,

(b) thu hoạch tế bào này trong vòng 12 giờ sau khi giống nuôi cấy kết thúc pha sinh trưởng theo cấp số nhân của nó và trước khi giống nuôi cấy bắt đầu pha sinh trưởng ổn định của nó,

(c) bổ sung ít nhất một chất bảo quản lạnh vào tế bào đã thu hoạch,

(d) đông lạnh tế bào ở nhiệt độ khoảng -80°C đến khoảng -210°C trong thời gian khoảng 5 giờ thu hoạch,

(e) đông khô tế bào, và

(f) thu được khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* sống sau khi đông khô, trong đó phương pháp này được thực hiện trong điều kiện yếm khí ở quy mô thương mại, và trong đó chất bảo quản lạnh là fructoza, glucoza, sucroza, trehaloza, maltodextrin, betain, hoặc tổ hợp của chúng.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ pH của giống nuôi cấy *M. elsdenii* trước khi thu hoạch là trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 7,0.

5. Phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô ở quy mô thương mại, bao gồm:

(a) tạo giống nuôi cấy lỏng trong điều kiện yếm khí hoặc điều kiện yếm khí một phần bao gồm tế bào vi khuẩn yếm khí và môi trường sinh trưởng chứa ít nhất hai nguồn cacbon được chọn từ nhóm bao gồm: pepton, casein, lactat, dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, mannitol, sorbitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza,

protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, trypton, dịch chiết nấm men, và tổ hợp của chúng,

(b) thu hoạch tế bào này,

(c) bổ sung ít nhất một chất bảo quản lạnh vào tế bào đã thu hoạch,

(d) đông lạnh tế bào ở nhiệt độ từ khoảng -80°C đến khoảng -210°C trong thời gian khoảng 5 giờ thu hoạch,

(e) đông khô tế bào, và

(f) thu được từ khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào vi khuẩn yếm khí sống sau khi đông khô, trong đó phương pháp này được thực hiện trong điều kiện yếm khí ở quy mô thương mại, và trong đó chất bảo quản lạnh là fructoza, glucoza, sucroza, trehaloza, maltodextrin, betain, hoặc tổ hợp của chúng.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó độ pH của giống nuôi cấy vi khuẩn yếm khí trước khi thu hoạch là trong khoảng từ khoảng 4,0 đến khoảng 9,0.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất bảo quản lạnh là sucroza.

8. Phương pháp theo điểm 2, trong đó chất bảo quản lạnh là sucroza.

9. Phương pháp theo điểm 3, trong đó chất bảo quản lạnh là sucroza.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó từ khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 25°C trong thời gian ít nhất 2 tuần.

11. Phương pháp theo điểm 2, trong đó từ khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 25°C trong thời gian ít nhất 2 tuần.

12. Phương pháp theo điểm 3, trong đó từ khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 25°C trong thời gian ít nhất 2 tuần.

13. Phương pháp theo điểm 5, trong đó từ khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 25°C trong thời gian ít nhất 2 tuần.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó từ khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C trong thời gian ít nhất 1 tháng.
15. Phương pháp theo điểm 2, trong đó từ khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C trong thời gian ít nhất 1 tháng.
16. Phương pháp theo điểm 3, trong đó từ khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C trong thời gian ít nhất 1 tháng.
17. Phương pháp theo điểm 5, trong đó từ khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* đông khô sống được sau khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C trong thời gian ít nhất 1 tháng.
18. Phương pháp theo điểm 5, trong đó chất bảo quản lạnh là sucroza.
19. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc bao nang tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô.
20. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc bao nang tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô.
21. Phương pháp theo điểm 3, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc bao nang tế bào *Megasphaera elsdenii* đông khô.
22. Phương pháp theo điểm 5, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc bao nang tế bào vi khuẩn yếm khí đông khô.
23. Phương pháp sản xuất tế bào *M. elsdenii* đông khô ở quy mô thương mại, bao gồm các bước:

(a) tạo giống nuôi cấy lỏng trong điều kiện yếm khí bao gồm tế bào *M. elsdenii* và môi trường sinh trưởng chứa một hoặc nhiều nguồn cacbon được chọn từ nhóm bao gồm: casein, lactat, dextroza, fructoza, fructan, glucoza, sucroza, lactoza, maltoza, axetat, glyxerol, mannitol, sacaroza, xyloza, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, arabinoza, protein đậu nành, protein hòa tan, rafinoza, amyloza, tinh bột, và tổ hợp của chúng,

(b) thu hoạch tế bào này trong vòng 12 giờ sau khi giống nuôi cấy kết thúc pha sinh trưởng theo cấp số nhân của nó và trước khi giống nuôi cấy bắt đầu pha sinh trưởng ổn định của nó,

(c) bổ sung chất bảo quản lạnh vào tế bào đã thu hoạch, trong đó chất bảo quản lạnh này được chọn từ một hoặc nhiều sucroza, lactoza, sữa bột, chế phẩm công thức dùng cho nhũ nhi, hoặc sữa tách béo, và trong đó chất bảo quản lạnh có mặt với lượng từ khoảng 1% đến khoảng 20% (khối lượng/thể tích) của giống nuôi cấy,

(d) đông lạnh tế bào ở nhiệt độ khoảng -20°C đến khoảng -196°C trong thời gian khoảng 5 giờ thu hoạch,

(e) đông khô tế bào, và

(f) thu được khoảng 1×10^7 đến khoảng 1×10^{12} CFU/g tế bào *M. elsdenii* sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 25°C trong thời gian ít nhất 2 tuần, trong đó phương pháp này được thực hiện trong điều kiện yếm khí ở quy mô thương mại.

24. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất bảo quản lạnh là dạng dung dịch, trong đó dung dịch chất bảo quản lạnh này được bổ sung vào tế bào đã thu hoạch ở tỷ lệ là 1/10 đến 1/5.

25. Phương pháp theo điểm 2, trong đó chất bảo quản lạnh là dạng dung dịch, trong đó dung dịch chất bảo quản lạnh này được bổ sung vào tế bào đã thu hoạch ở tỷ lệ là 1/10 đến 1/5.

26. Phương pháp theo điểm 3, trong đó chất bảo quản lạnh là dạng dung dịch, trong đó dung dịch chất bảo quản lạnh được bổ sung vào tế bào đã thu hoạch ở tỷ lệ là 1/10 đến 1/5.

27. Phương pháp theo điểm 5, trong đó chất bảo quản lạnh là dạng dung dịch, trong đó dung dịch chất bảo quản lạnh được bổ sung vào tế bào đã thu hoạch ở tỷ lệ là 1/10 đến 1/5.

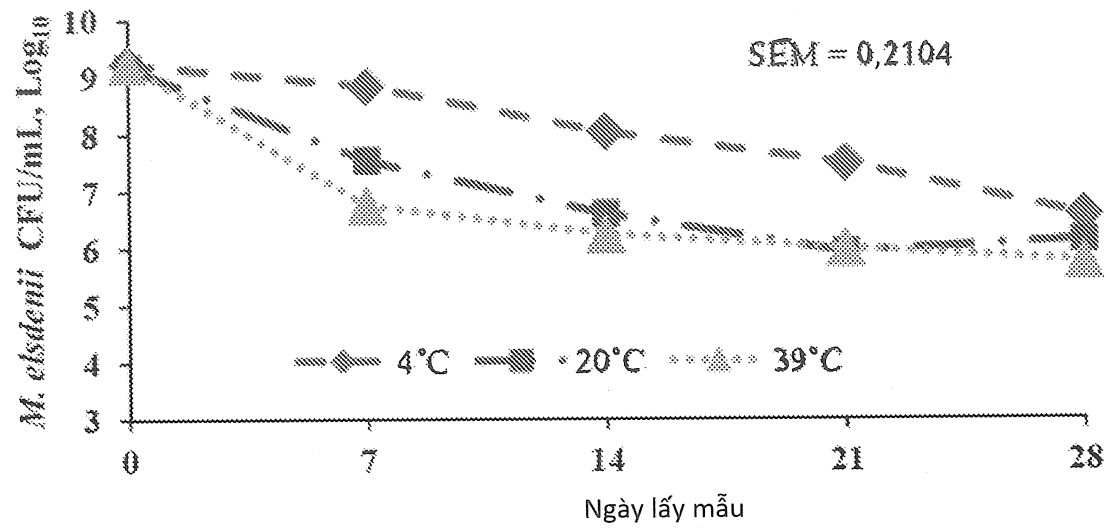
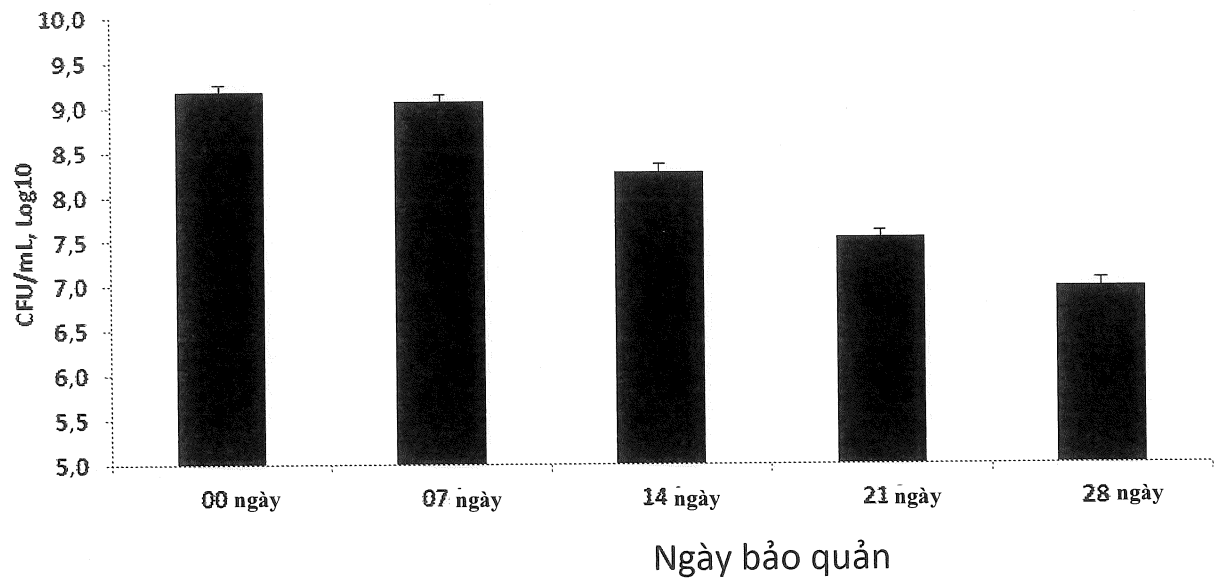


FIG. 1

2/28

**FIG. 2**

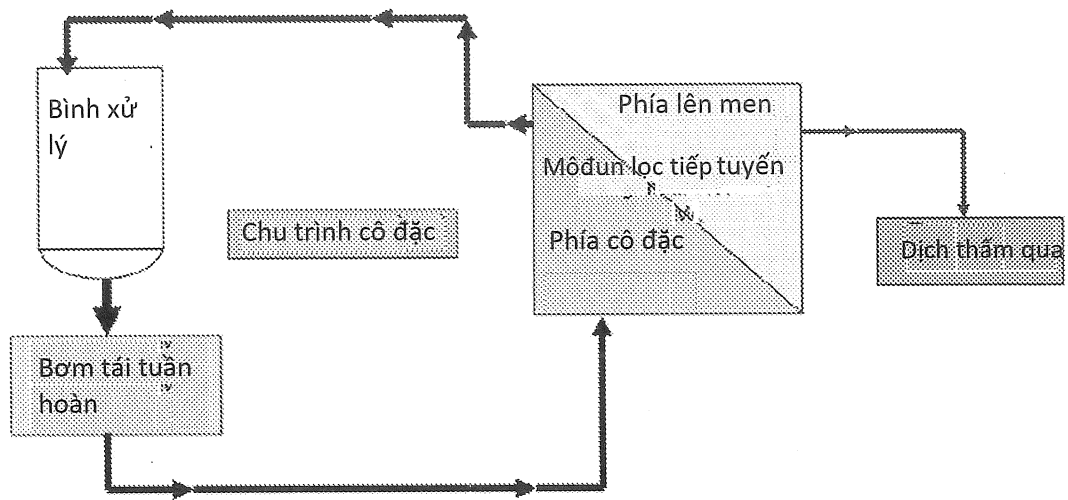


FIG. 3

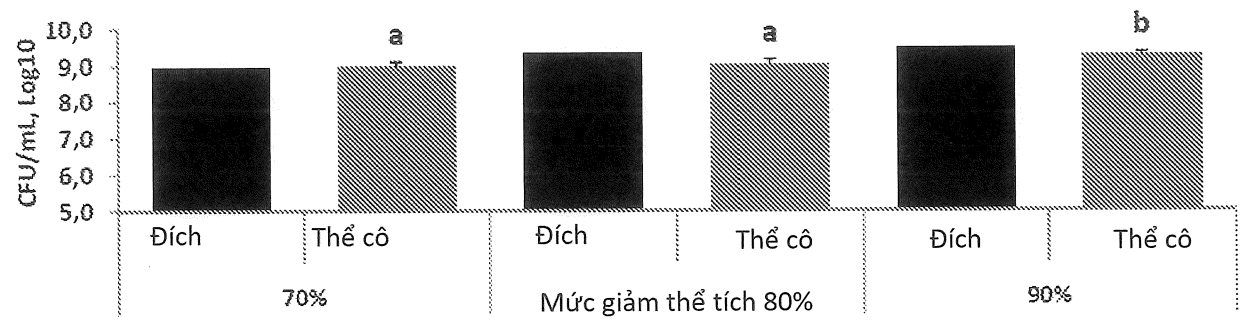


FIG. 4

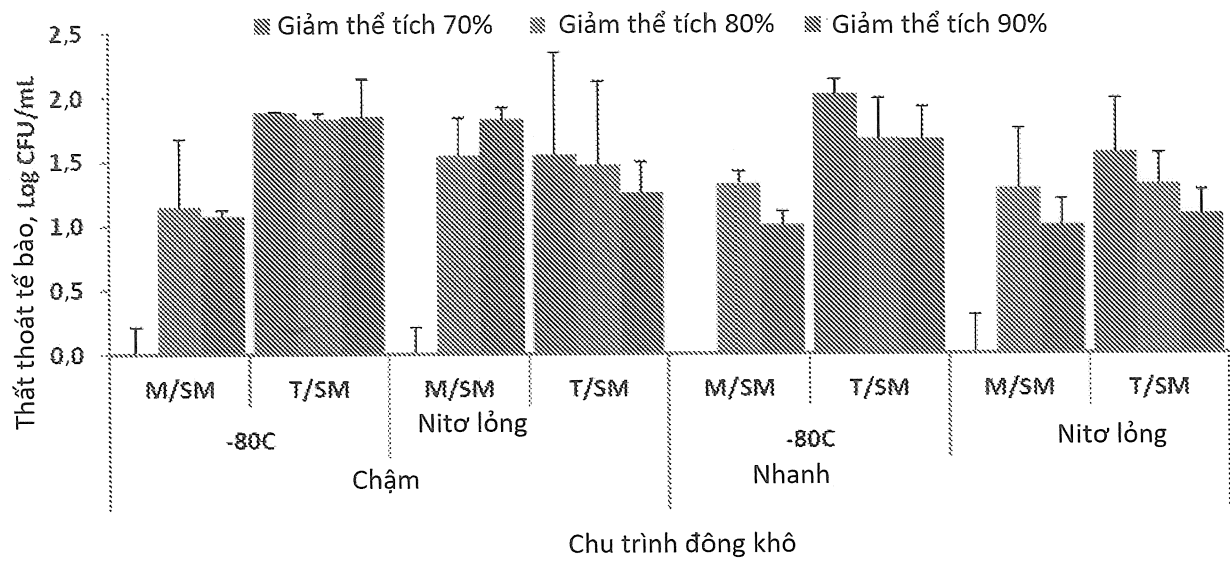
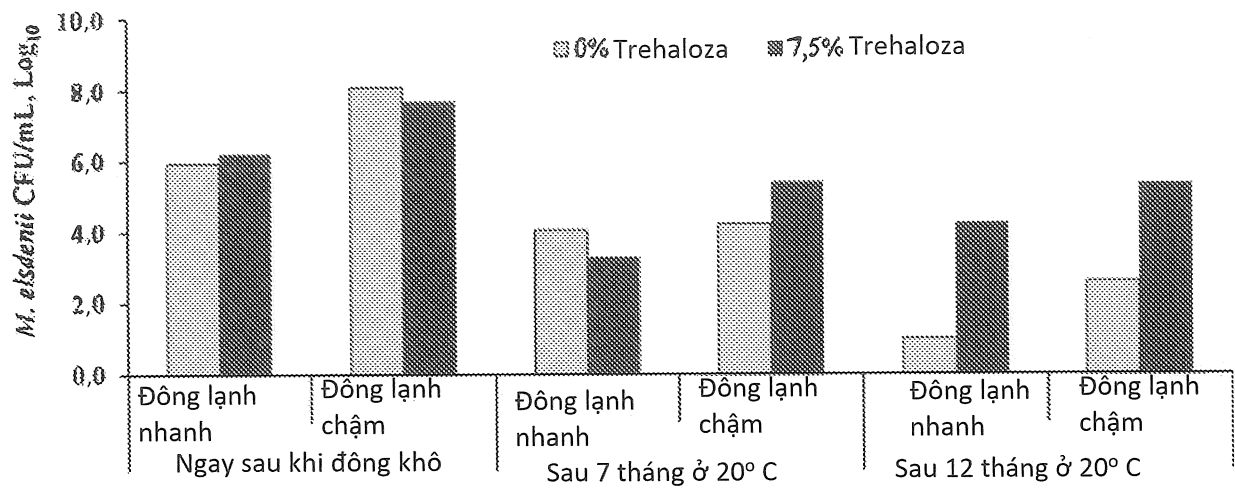


FIG. 5

6/28

**FIG. 6**

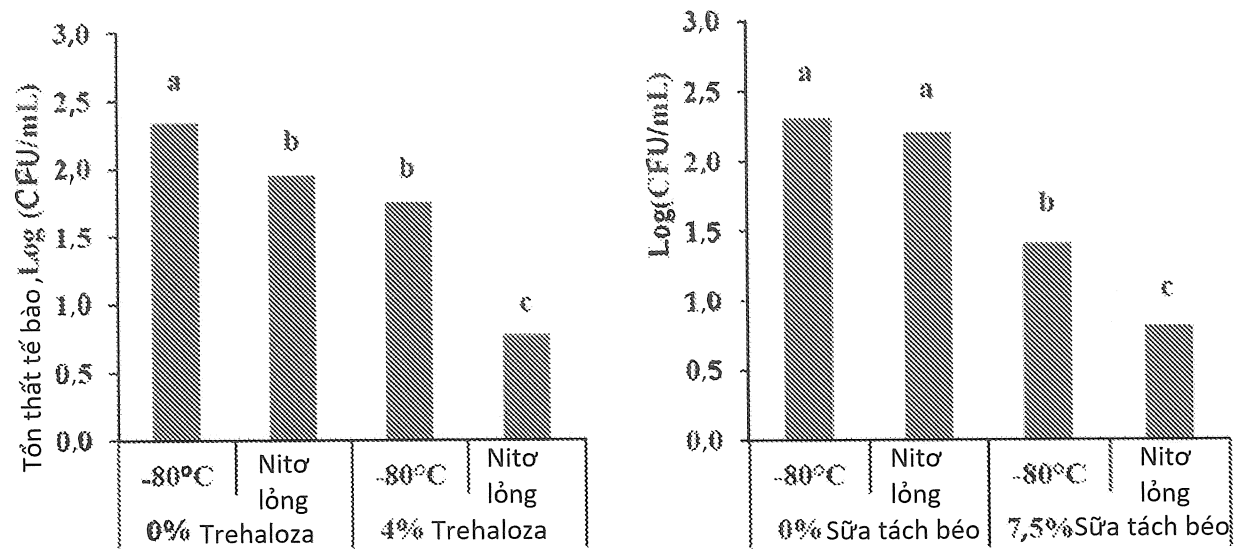


FIG. 7

8/28

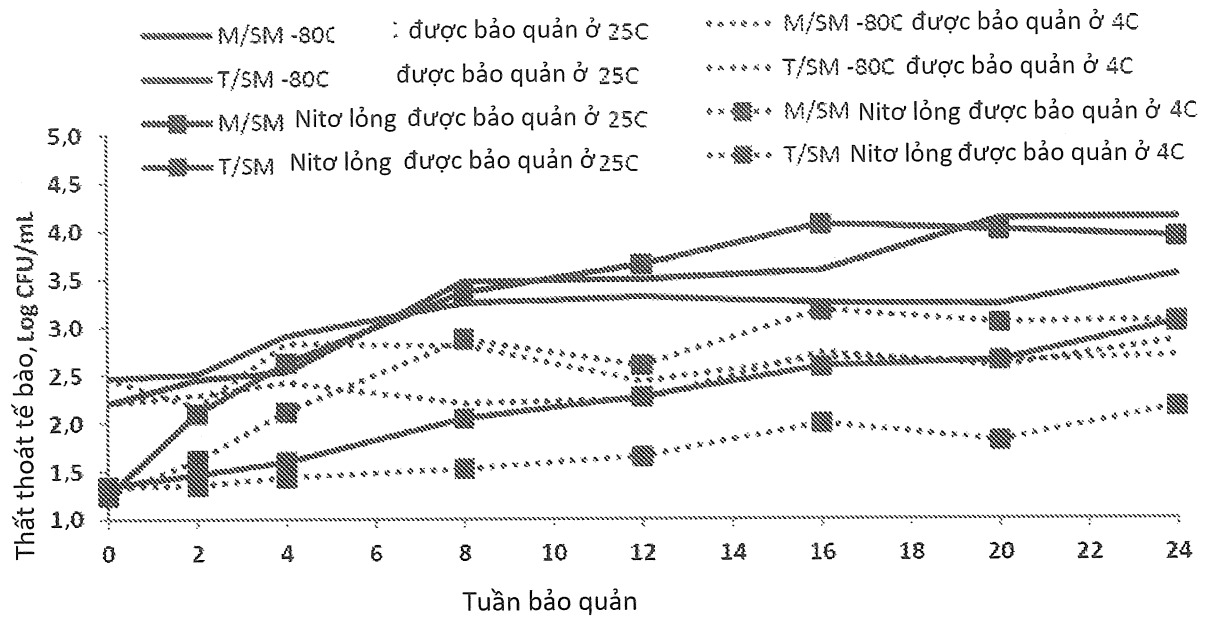


FIG. 8

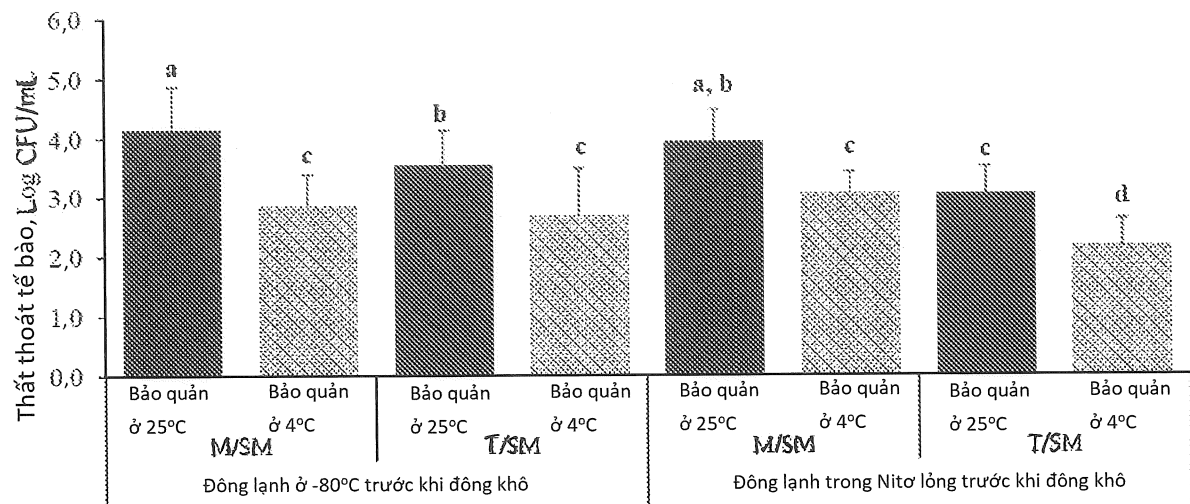
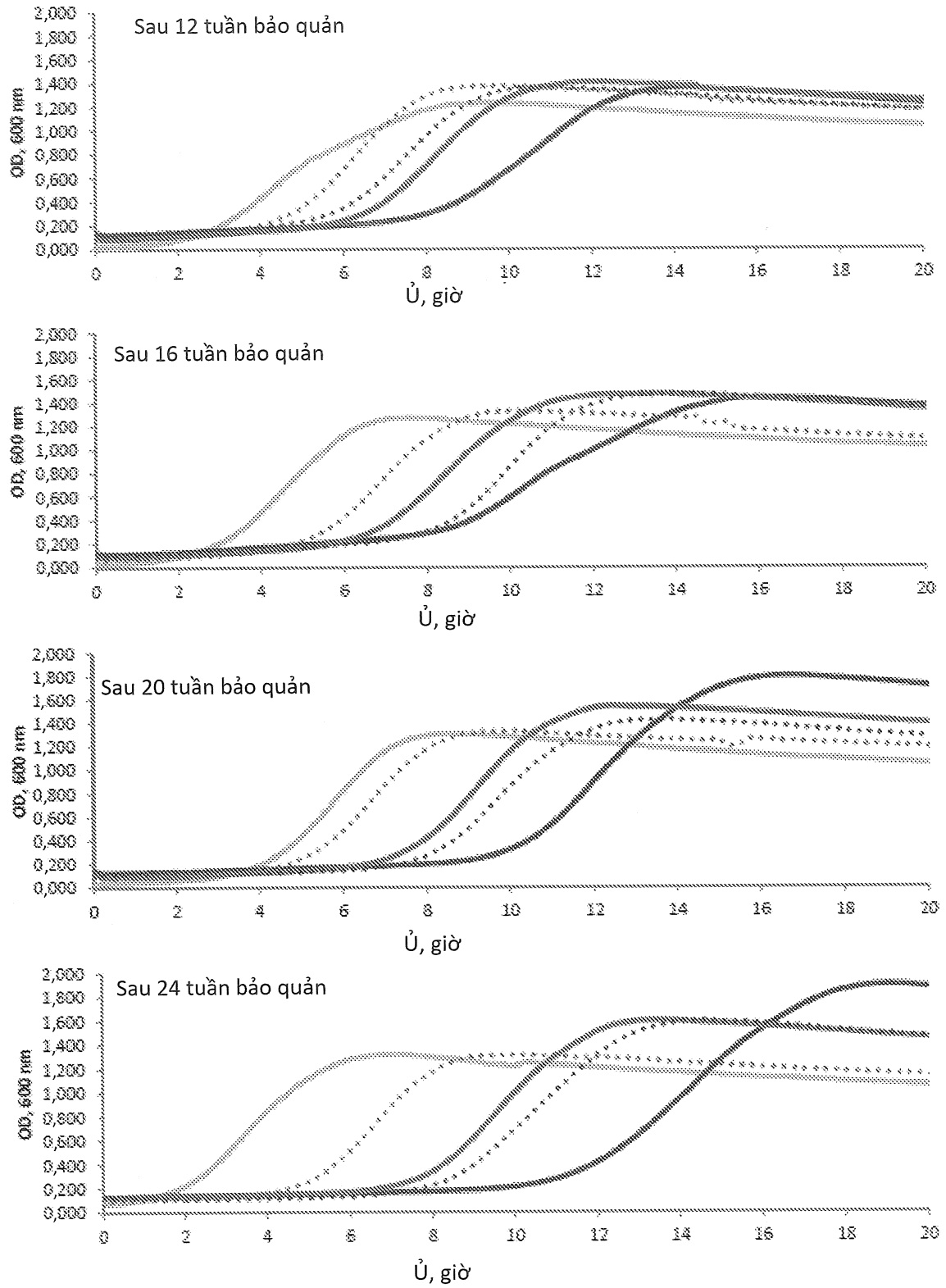


FIG. 9

10/28

**FIG. 10**

11/28

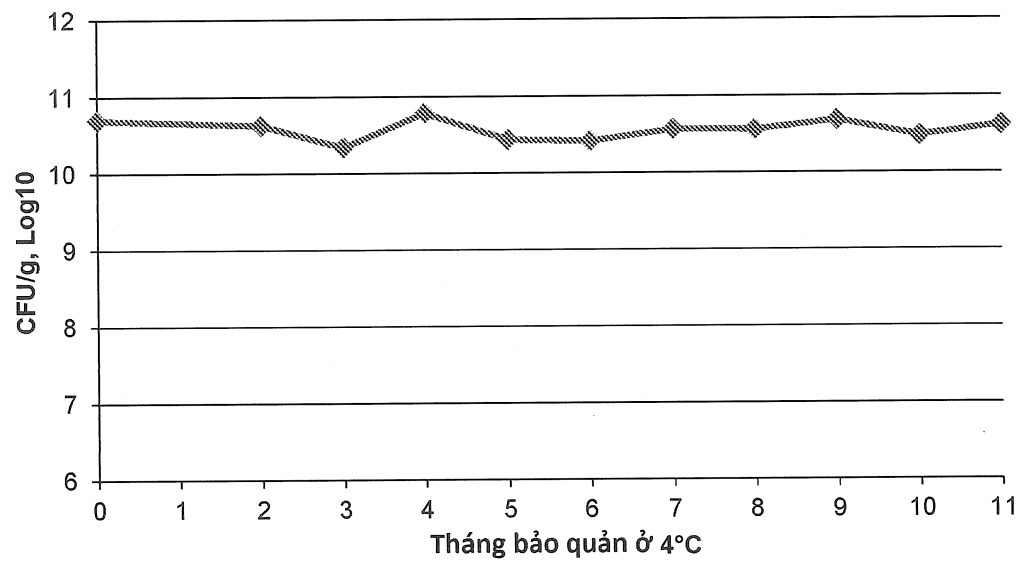
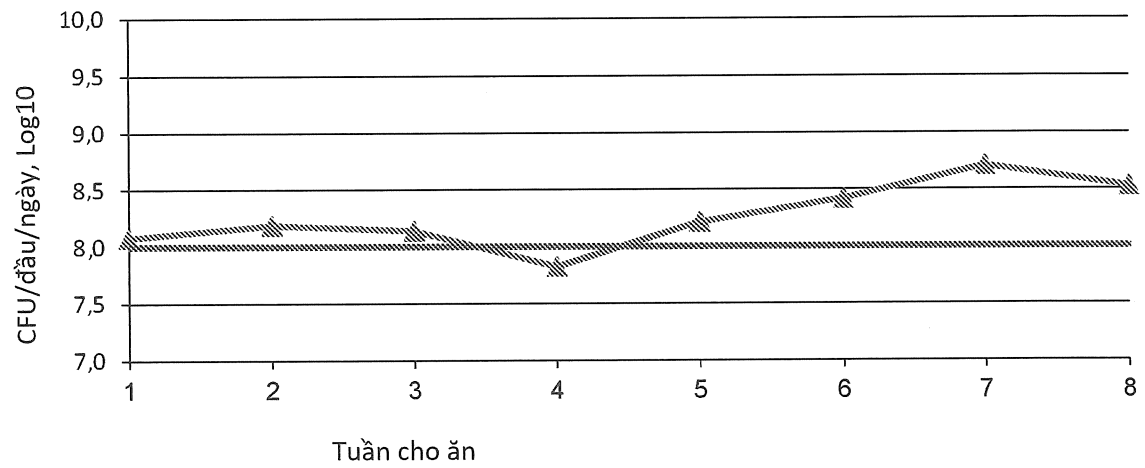


FIG. 11

12/28

**FIG. 12**

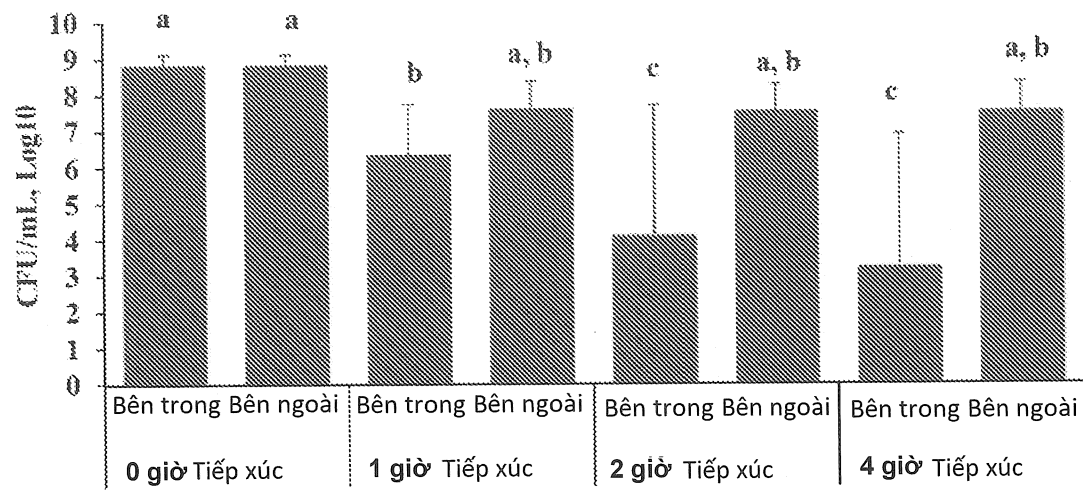
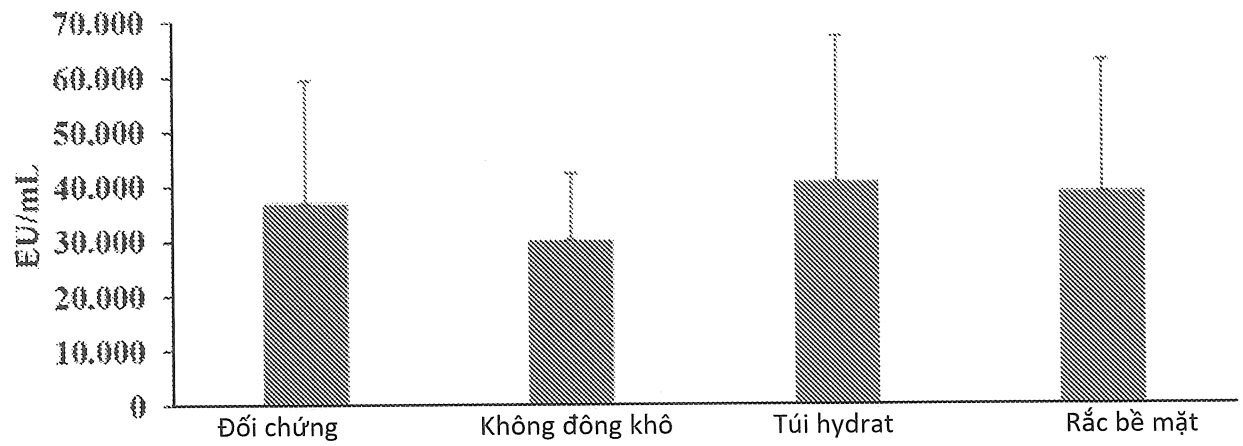
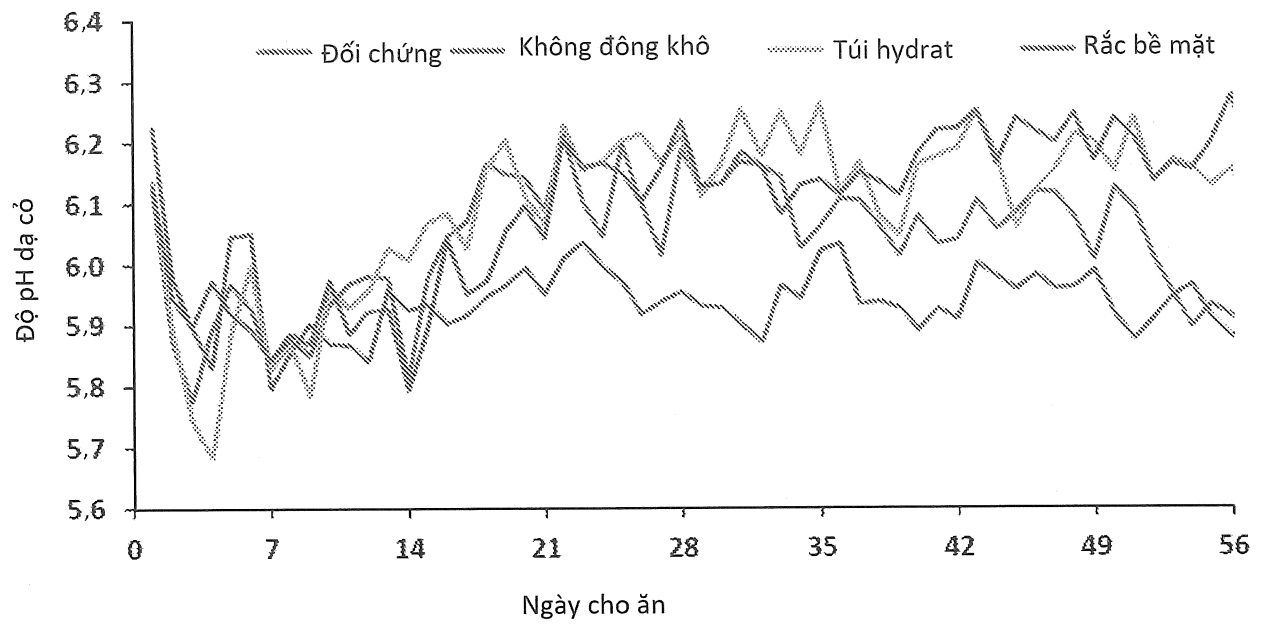


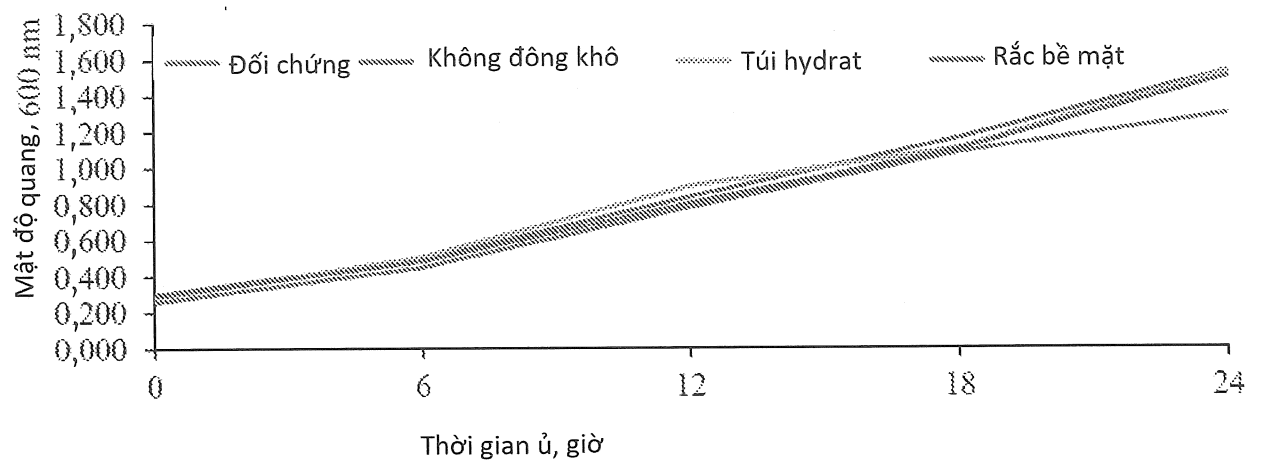
FIG. 13

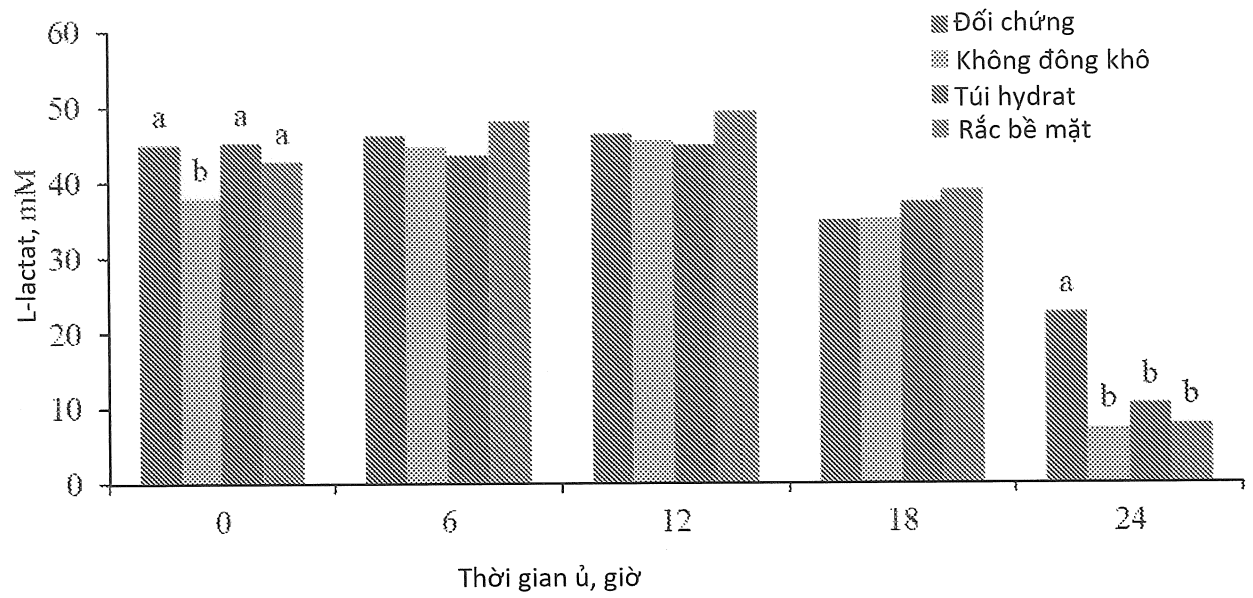
14/28

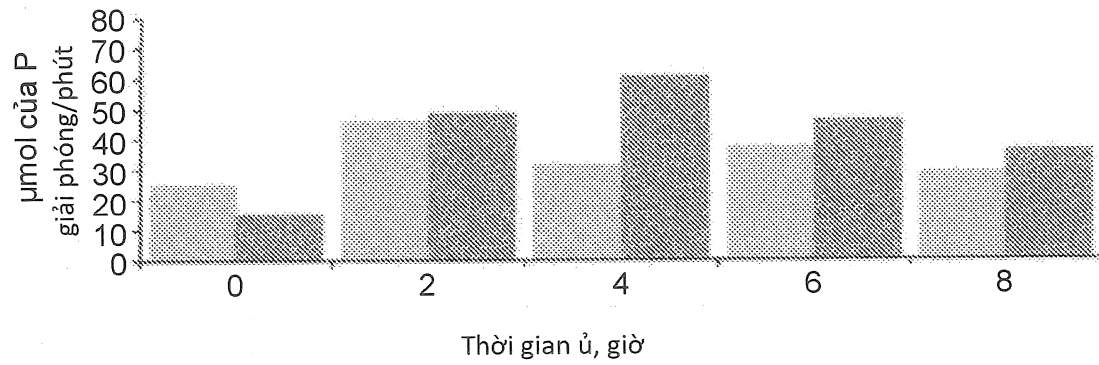
**FIG. 14**

15/28

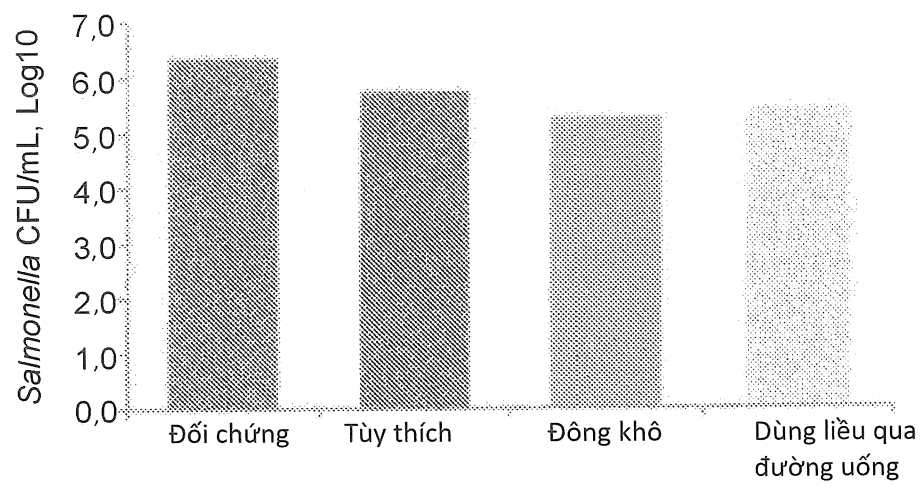
**FIG. 15**

**FIG. 16**

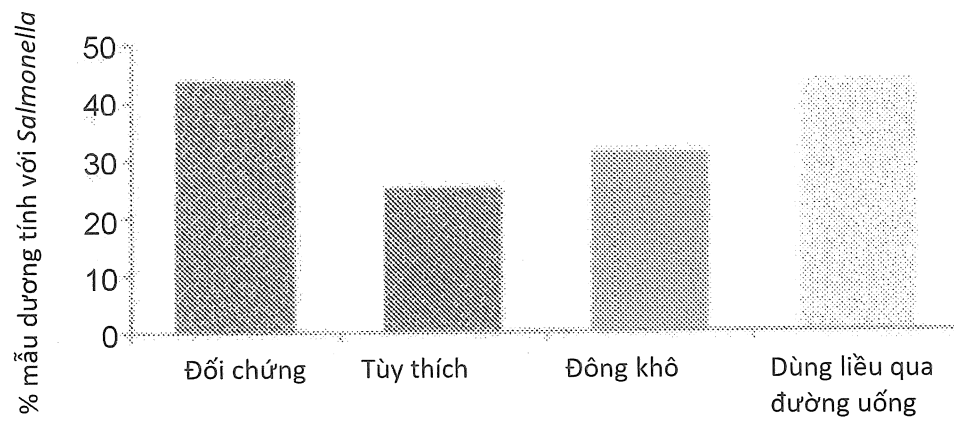
**FIG. 17**

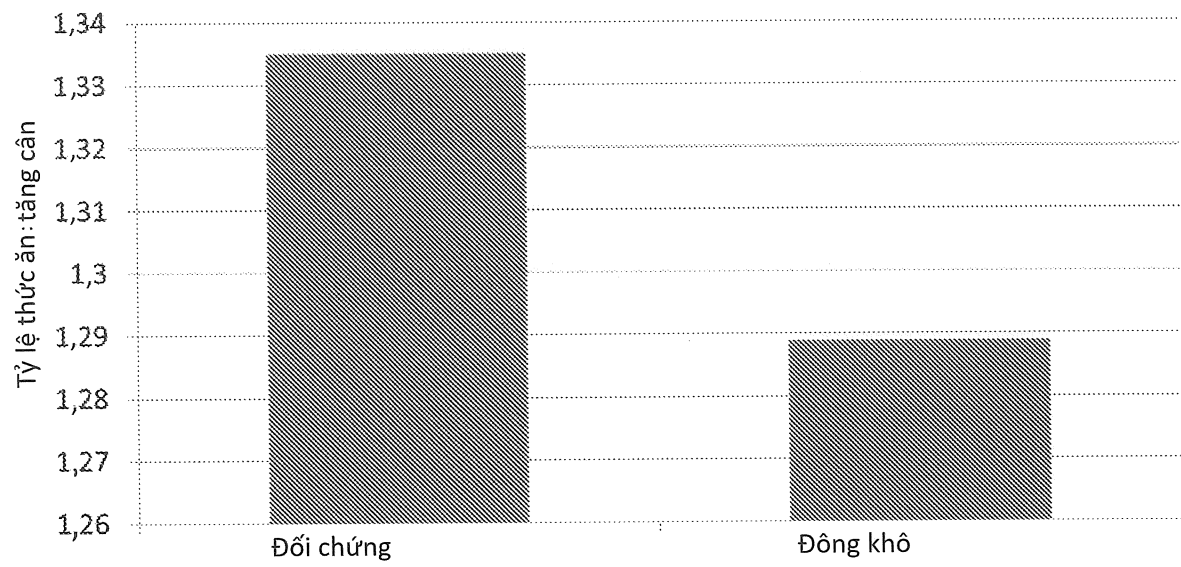
**FIG. 18**

19/28

**FIG. 19**

20/28

**FIG. 20**

**FIG. 21**

22/28

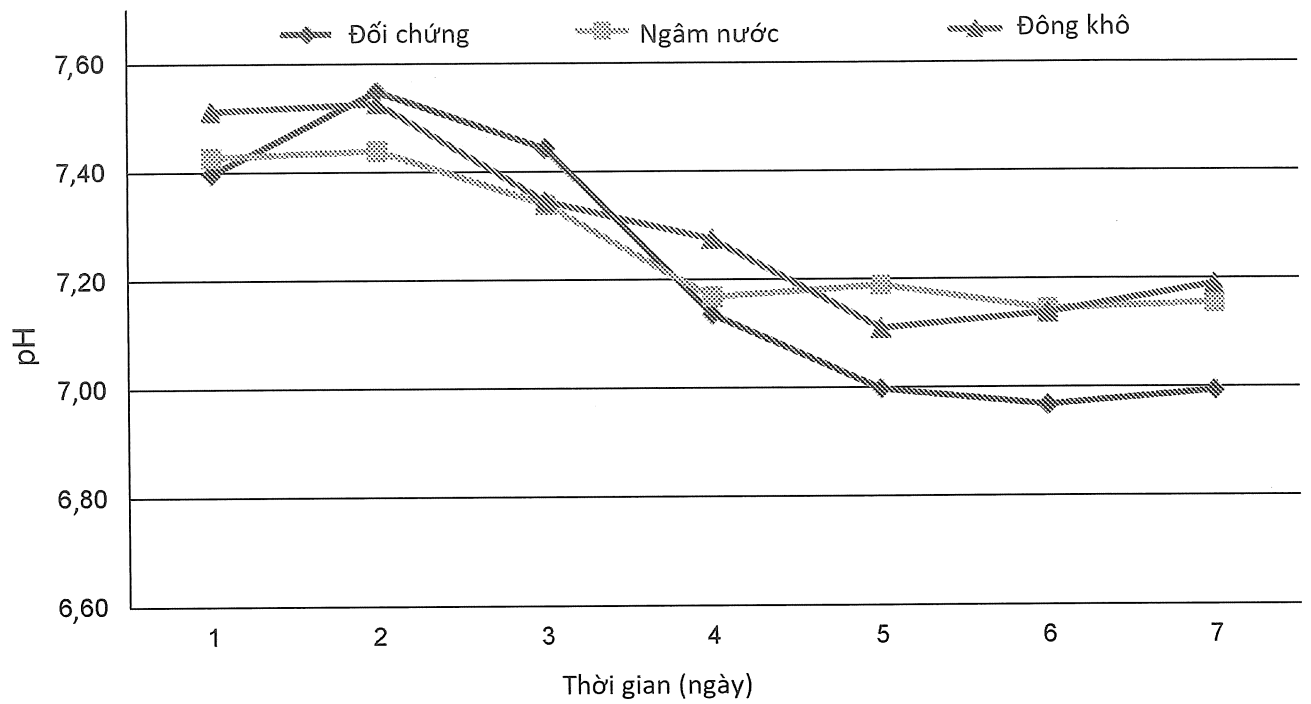
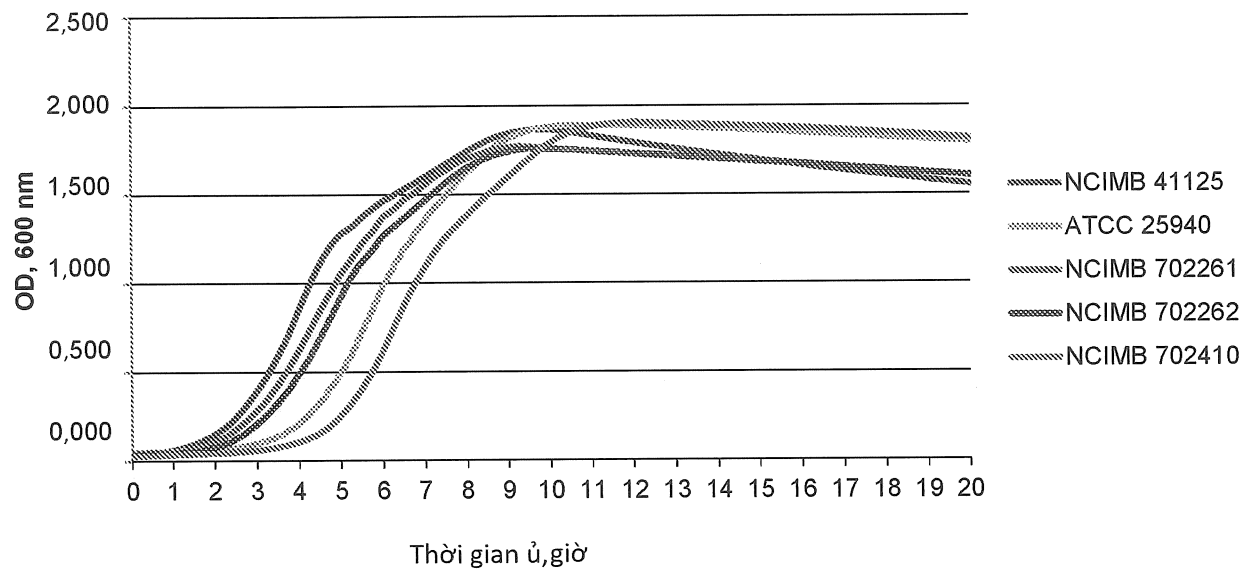
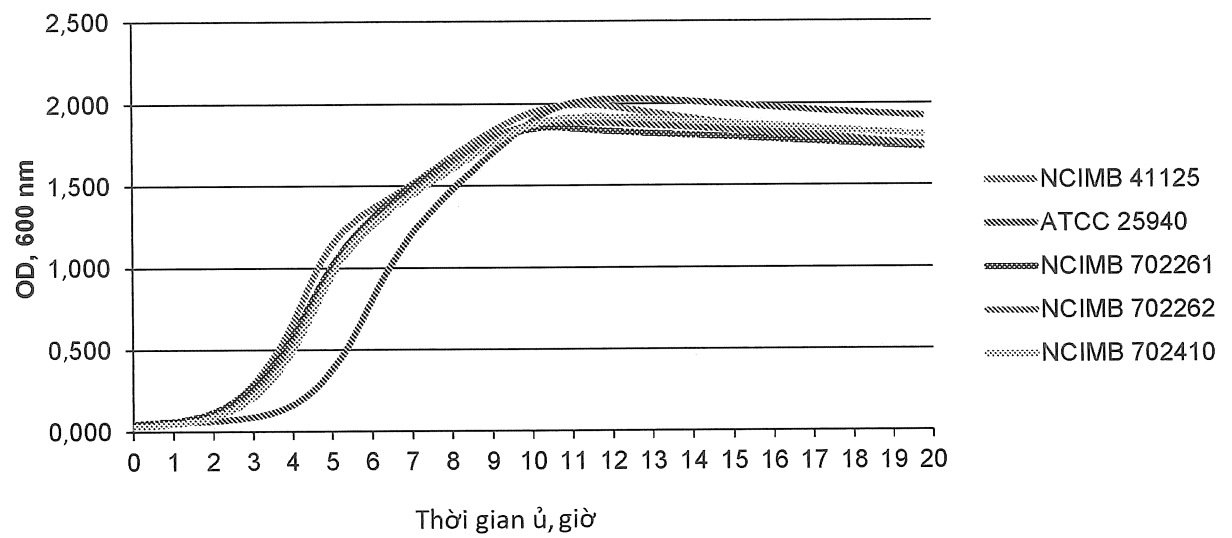


FIG. 22

**FIG. 23**

24/28

**FIG. 24**

25/28

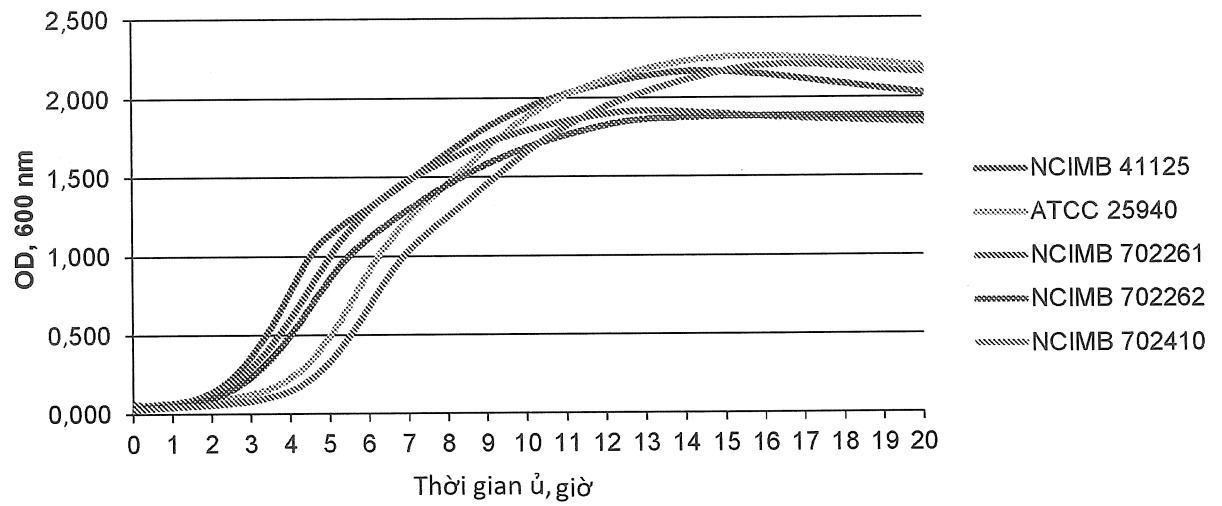


FIG. 25

41901

26/28

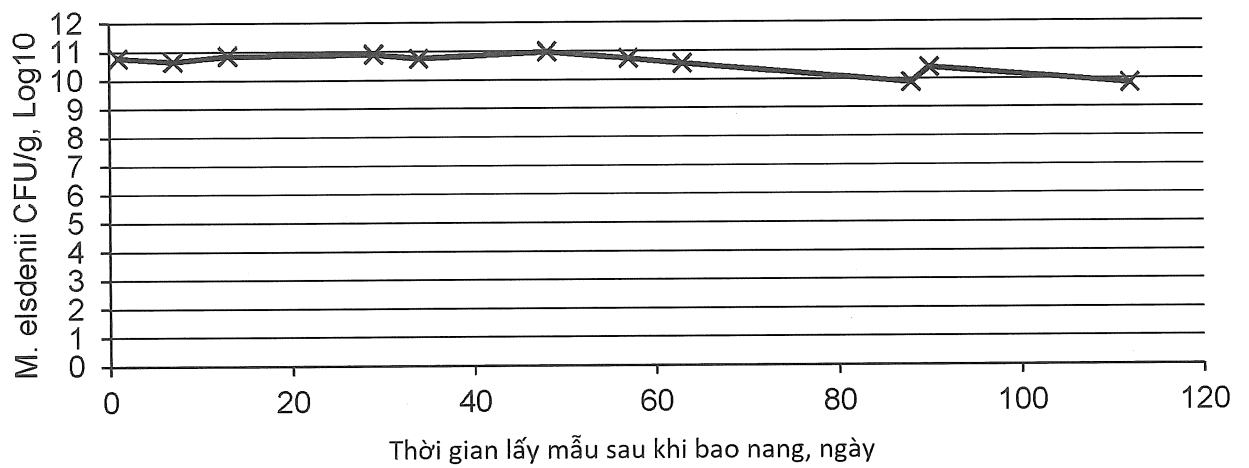
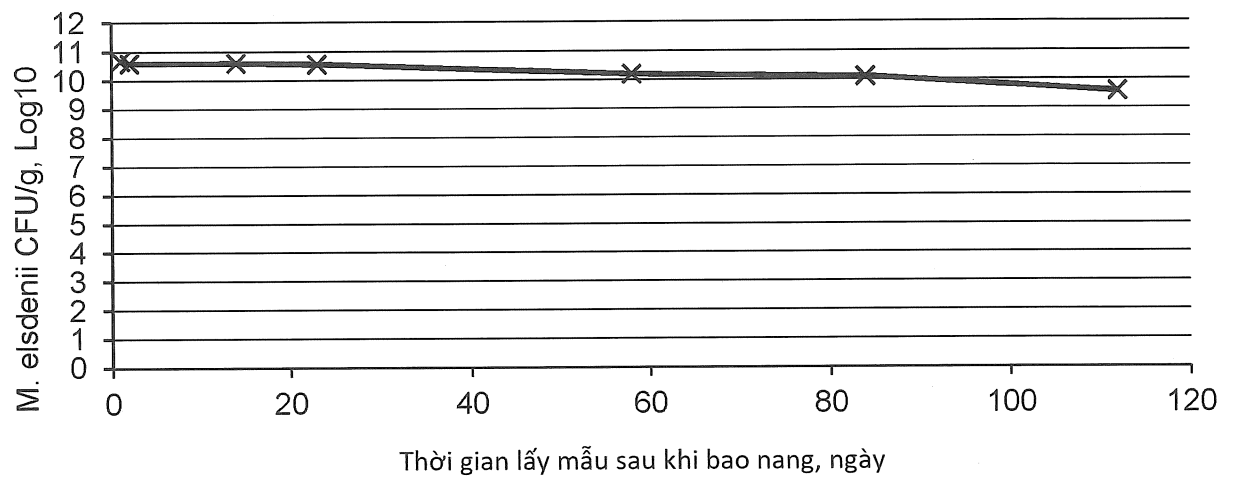


FIG. 26

27/28

**FIG. 27**

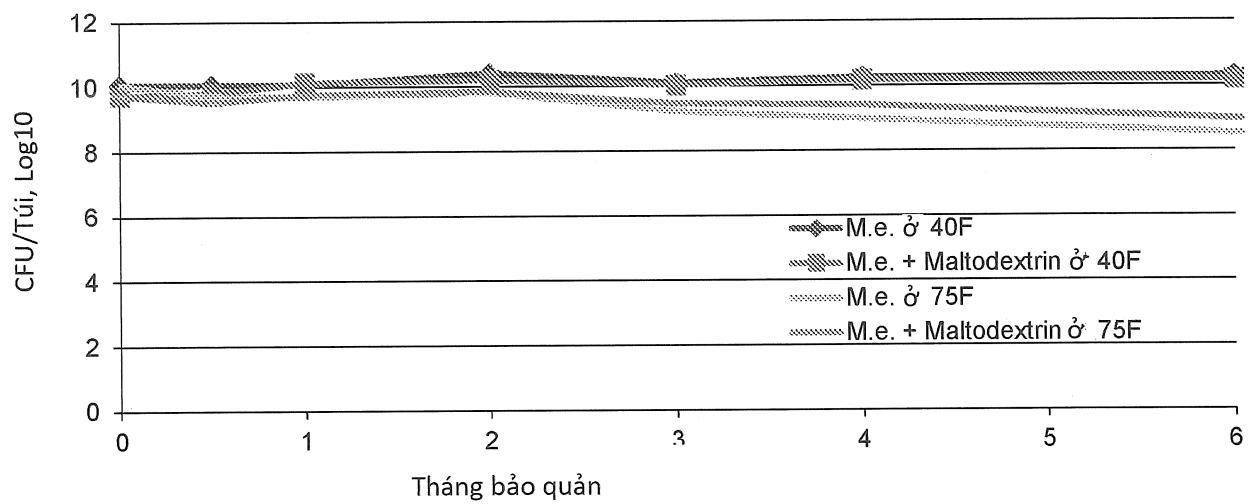


FIG. 28