(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) **1-0022938**

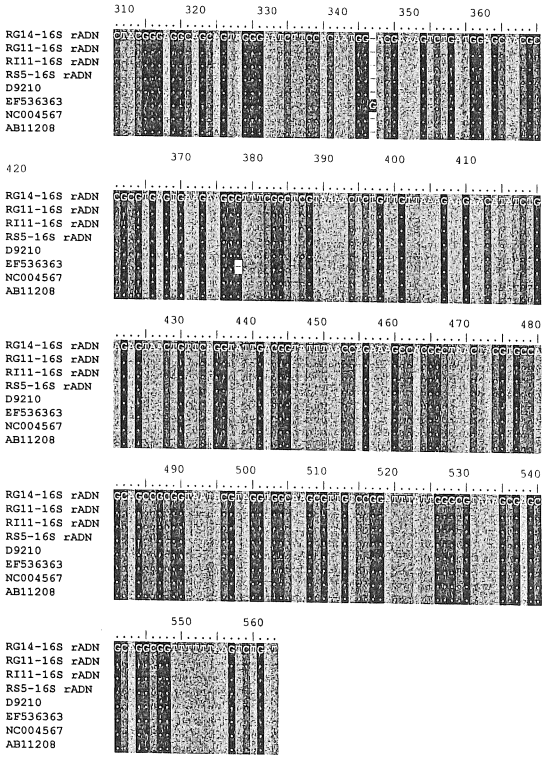
(51)[7] **C12N 1/20**, A23K 3/03, A23L 1/00

(13) **B**

(21) 1-2011-00452
(22) 09.04.2009
(86) PCT/MY2009/000050 09.04.2009
(87) WO2010/117255 14.10.2010
(45) 27.01.2020 382
(43) 25.06.2012 291
(73) UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA (UPM) (MY)
Serdang Selangor Darul Ehsan, Malaysia
(72) LOH, Teck, Chwen (MY), FOO, Hooi Ling (MY)
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyến (INVENCO.,LTD)

(54) DỊCH NUÔI CẤY THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN PROBIOTIC VÀ THỨC ĂN CHO ĐỘNG VẬT CHỨA DỊCH NUÔI CẤY NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chất bổ sung vào thức ăn cải tiến hoặc chế phẩm bổ sung vào thức ăn được thu từ nhiều hơn một chủng vi khuẩn sinh axit lactic. Chất bổ sung vào thức ăn được sử dụng để nuôi động vật có một dạ dày như là chim, gà. Ngoài ra, thức ăn này tạo ra sự tăng trưởng và việc sử dụng thức ăn tốt hơn cho động vật có một dạ dày. Ngoài ra, thức ăn cho động vật có thể được sử dụng để kiểm soát lượng thức ăn ăn vào ở động vật.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất bổ sung vào thức ăn có nguồn gốc từ vi khuẩn cho động vật có một dạ dày như là gia cầm, lợn và gà tây . Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến thức ăn cho động vật được tạo ra bởi vi sinh vật, tốt hơn là vi khuẩn sinh axit lactic.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong những năm gần đây, người ta đã đề cập đến việc sử dụng nhiều chất bổ sung vào thức ăn khác nhau để đạt được sự tăng trưởng nhanh ở gia súc, và về mặt này chất bổ sung là kháng sinh đã thu hút được sự chú ý lớn nhất. Kháng sinh kích thích tăng trưởng là chất phổ biến nhất trong số các chất bổ sung vào thức ăn, chủ yếu do các tác dụng tích cực của chúng đến sự tăng trưởng hoặc hiệu quả chuyển hóa thức ăn và cả sự giảm bớt tỷ lệ mắc các bệnh nhất định. Tuy nhiên, việc sử dụng rộng rãi kháng sinh có thể khiến động vật phát triển sự đề kháng với một số loài vi khuẩn gây bệnh (Mikkelsen và Jensen, 2000). Đã thu được các kết quả tương đối tốt với các chất bổ sung này. Các phát hiện mới đây đã cho thấy rằng các chất bổ sung này làm xuất hiện các chủng vi khuẩn kháng thuốc ở gia súc và cũng chứng minh rằng một lượng nhỏ chất kháng sinh được chuyển sang người. Cũng đã thấy rằng có nguy cơ nhất định về sự tăng nhạy cảm trên người tiếp xúc thức ăn này. Ở trang trại chăn nuôi động vật hiện đại, nhiều phương pháp khác nhau đã được khai thác để cải thiện sức khỏe động vật và hiệu suất tăng trưởng. Các phương pháp này bao gồm quản lý dinh dưỡng và việc sử dụng chất bổ sung vào thức ăn trong ngành chăn nuôi tốt hơn. Chất bổ sung vào thức ăn thông thường được sử dụng là kháng sinh, các probiotic, enzym và axit hữu cơ (Bernardeau *et al.*, 2002). Cũng như vậy, sự kháng chéo có thể xảy ra với kháng sinh điều trị thuộc cùng nhóm thuốc, đặc biệt

là các thuốc có mối liên hệ gần với liệu pháp kháng khuẩn ở người. Trong các năm gần đây, đã có đề xuất về việc sử dụng nhiều chất bổ sung vào thức ăn để đạt được sự tăng trưởng nhanh ở gia súc, và về mặt này, chất bổ sung kháng sinh đã thu hút được sự chú ý lớn nhất. Hiện đã phát hiện ra rằng bằng cách sử dụng chất bổ sung vào thức ăn theo sáng chế có thể có lợi để khắc phục được các bất lợi được đề cập ở trên mà vẫn thu được sản lượng gia súc ít nhất là tốt bằng trước đây khi sử dụng chất bổ sung vào thức ăn là kháng sinh. Vì thế, thu được kết quả mong muốn mà không gặp phải các hạn chế như trước đây.

Một số nước đã áp đặt các hạn chế hoặc cấm sử dụng kháng sinh làm các chất kích thích tăng trưởng và điều này đã gây chú ý đến các chất thay thế có thể khác (Wierup, 2000). Trong vài năm qua, các nghiên cứu tập trung vào một số chủng vi khuẩn sinh axit lactic có giá trị (lactic acid bacteria- LAB) và việc sử dụng tiềm năng của chúng làm chất probiotic. Các probiotic được coi như các chế phẩm vi khuẩn sống mà thúc đẩy sức khỏe của động vật có vú bằng việc lưu giữ hệ vi sinh vật tự nhiên trong ruột. Các probiotic được cho là tấn công vào niêm mạc ruột, xâm chiếm đường ruột và do đó ngăn cản việc tấn công của các vi sinh vật có hại ở đó. Điều kiện tiên quyết cho hoạt động của chúng cư trú tại đó là chúng phải đến được niêm mạc ruột ở dạng thích hợp và sống và đặc biệt là không bị phá hủy bởi sự ảnh hưởng của pH thấp chiếm ưu thế trong dạ dày. Cụ thể là, sinh lý của đường tiêu hóa của mèo và chó khác với người. Ví dụ, pH trung bình trong dạ dày là khoảng 3,4 với chó và 4,2 với mèo. LAB đóng vai trò là probiotic thường được đề xuất làm chất thay thế cho kháng sinh. LAB được sử dụng rộng rãi như là chủng nuôi cấy ban đầu trong thịt và các sản phẩm từ thịt, đóng một vai trò rất quan trọng trong việc đảm bảo độ an toàn của các thức ăn khác nhau trong quá trình tổng hợp các chất chuyển hóa như là các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn. Các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn là các hợp chất protein có các tính chất kháng vi khuẩn mà có thể ức chế nhiều loài vi khuẩn khác nhau, đặc biệt là vi khuẩn gây bệnh (De Vuyst và Vandamme, 1994). Các hợp chất này nhận được sự chú ý lớn bởi vì chúng được sản xuất ra bởi các vi khuẩn có lợi cho sức khỏe con người và cũng thường được sử dụng như là các chất bảo quản thức ăn tự nhiên. Đã thấy

rằng việc dùng các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn ảnh hưởng đến sinh thái học vi khuẩn của đường dạ dày ruột và làm giảm mức vi khuẩn gây bệnh ở các phần khác nhau của đường dạ dày ruột (van Winsen *et al.*, 2001). Gaenzale *et al.* (1999) đã cho thấy rằng chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn curvacin được tạo ra bởi *Lactobacillus curvatus* ức chế chủng *Escherichia coli* và *Listeria* trong dạ dày. Cũng được bộc lộ là các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn được tạo ra bởi *Lactococcus lactis* phân loài *lactis* có các đặc tính kháng khuẩn (Mishra và Lambert, 1996). Patent Mỹ số 5,968,569 mô tả việc đưa các vi sinh vật probiotic vào thức ăn ngũ cốc của vật nuôi, dù tài liệu này cũng như giải pháp kỹ thuật đã biết khác đều cung cấp thông tin về các chủng đặc biệt có liên quan được dự định dùng đặc biệt cho sức khỏe của vật nuôi. Do đó, vẫn có nhu cầu về các chủng vi khuẩn mới mà đặc biệt là thích hợp cho vật nuôi và được chọn lọc vì các đặc tính probiotic cao có lợi cho sức khỏe của vật nuôi và để đưa các chủng này vào chế phẩm thức ăn của vật nuôi.

Trước đây đã biết rằng với sự hỗ trợ của LAB, người ta có thể sử dụng sữa gầy, bơ sữa, và nước sữa làm thức ăn cho động vật. Do đó, các sản phẩm này chứa, ngoài axit lactic, vitamin, đường và các hyđrat-cacbon khác nhưng không có vi sinh vật sống. Sáng chế đề xuất chất bổ sung vào thức ăn kích thích tăng trưởng chứa nguồn chất chuyển hóa có trong tự nhiên được tạo ra bởi loài *Lactobacillus*. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng một lượng hữu hiệu các chất chuyển hóa thu được từ loài *Lactobacillus*, và tạo ra liều tối ưu có hiệu quả nhất của các chất chuyển hóa làm chất bổ sung vào thức ăn để cải thiện hiệu suất tăng trưởng và sức khỏe chung của gia cầm. Chất bổ sung vào thức ăn cho động vật này sẽ kết hợp với các chất dinh dưỡng để tạo thành thức ăn cho động vật. Các thí nghiệm với động vật được kiểm soát một cách khoa học đã cho thấy rằng lợi ích kinh tế từ việc động vật được nuôi với thức ăn được cung cấp các chất bổ sung theo sáng chế đã tăng lên vì chất lượng và giá trị của các sản phẩm từ động vật tăng lên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến dịch nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học của chủng vi khuẩn probiotic, trong đó chủng vi khuẩn là vi khuẩn

sinh axit lactic được chọn từ nhóm gồm có *Lactobacillus plantarum* (tốt hơn là các chủng RI11, RG14, RS5 và RG11). Đã biết rằng vi khuẩn sinh axit lactic, có khả năng tạo ra các chất chuyển hóa bao gồm cả các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn. Sáng chế mô tả, các chất chuyển hóa được bổ sung vào thức ăn cho động vật làm chất thêm và/hoặc chất bổ sung. Thức ăn cho động vật bao gồm một lượng hữu hiệu chất chuyển hóa nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,5% tính theo trọng lượng khô.

Do đó, thức ăn cho động vật bao gồm: các chất dinh dưỡng, các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn, vitamin (tốt hơn là vitamin B), axit hữu cơ (tốt hơn là axit focmic, axit axetic và axit lactic) và/hoặc hỗn hợp của chúng. Ngoài ra, thức ăn cho động vật bao gồm hỗn hợp của các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn, và axit hữu cơ hoặc hỗn hợp của các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn, vitamin B và axit hữu cơ. Lượng chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn được sử dụng trong thức ăn cho động vật cụ thể tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,8%.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm thức ăn cho động vật bao gồm cả ngô; bột thô; cám gạo; cám bột mì; mật đường; dầu cọ, dầu dừa thô; đá vôi; monodicanxiphotphat; dicanxi photphat; muối; lyxin; cholin clorua; vitamin; chất khoáng; threonin; hợp chất chống dính khuôn; đồng sulfat; DL-methionin; chất chống oxi hóa.

Tốt hơn là, ngô được sử dụng là ngô vàng, bột thô được sử dụng bao gồm bột đậu tương và bột cùi dừa khô, dầu cọ được sử dụng bao gồm dầu cọ được tinh chế và dầu cọ thô. Ngoài ra, chế phẩm thức ăn còn bao gồm hỗn hợp bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm ngô vàng; bột đậu tương; bột cùi dừa khô; cám gạo; mật đường; dầu dừa thô; đá vôi; muối; lyxin; cholin clorua; vitamin; chất khoáng; threonin; hợp chất chống dính khuôn; đồng sulfat; DL-methionin; và chất chống oxi hóa.

Cụ thể là, chế phẩm thức ăn cho động vật còn bao gồm các chất chuyển hóa như là các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn, kết hợp với vitamin B, và axit hữu cơ. Điều này đã gợi ý rằng, các chất chuyển hóa được thêm vào thức ăn

cho động vật với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 8 kg theo tổng khẩu phần thức ăn.

Đặc biệt hơn là, chế phẩm thức ăn cho động vật giúp làm tăng tổng lượng thức ăn ăn vào nằm trong khoảng từ 3% đến 10% và chế phẩm này làm tăng sự tăng trưởng của động vật nằm trong khoảng từ 5% đến 7%. Do đó, chế phẩm thức ăn cho động vật tạo ra tốc độ chuyển hóa nằm trong khoảng từ 3% đến 8%.

Theo một phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến chế phẩm thức ăn cho động vật có khả năng làm giảm số lượng vi khuẩn loài enterobacteria trong phân và làm tăng số lượng vi khuẩn lactic trong phân ở động vật có một dạ dày hoặc động vật không phải loài nhai lại. Do đó, chế phẩm cũng có khả năng làm giảm lượng cholesterol trong huyết tương và thịt ở động vật có một dạ dày hoặc động vật không phải loài nhai lại. Chế phẩm cũng có khả năng làm tăng chiều cao nhung mao của ruột non ở động vật có một dạ dày hoặc động vật không phải loài nhai lại.

Do đó, sáng chế đề cập đến quy trình kích thích sự tăng trưởng và/hoặc chuyển hóa thức ăn ở động vật có một dạ dày hoặc động vật không phải loài nhai lại, trong đó quy trình này bao gồm việc cho động vật ăn một lượng hữu hiệu các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn, được trộn với vitamin B, và axit hữu cơ.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến thức ăn cho động vật chứa các chất chuyển hóa được tạo ra bởi *Lactobacillus plantarum* (tốt hơn là các chủng RI11, RG14, RS5 và RG11).

Ngoài ra, một phương án khác của sáng chế đề cập đến việc sử dụng thức ăn cho động vật ở động vật/các động vật có một dạ dày, (tốt hơn là chim, thỏ, chồn vizon, sóc sinsin, chó, loài gặm nhấm, lợn, hoặc bê tiền nhai lại hoặc cừu tiền nhai lại).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ đi kèm là một phần của bản mô tả này và bao gồm phương án ví dụ hoặc ưu tiên của sáng chế, mà có thể được thể hiện trong nhiều dạng khác nhau. Tuy nhiên, cần hiểu rằng, các phương án ưu tiên được mô tả chỉ đơn thuần là ví dụ của sáng chế. Do đó, các hình vẽ được mô tả ở đây không được hiểu làm giới hạn

sáng chế, mà chỉ đơn thuần là cơ sở cho yêu cầu bảo hộ và để hướng dẫn cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế.

Fig.1 trình bày sự sắp xếp một phần trình tự 16S rADN của các chủng RG14, RG11, RI11 và RS5 cùng với bốn chuỗi có sẵn trong ngân hàng gen (Số truy cập: D9210, EF536363, NC004567 và AB11208).

Fig.2 trình bày sự khuếch đại các gen cấu trúc của chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn từ các chủng *L.plantarum*. A). Khuếch đại *Plantaricin EF* (~450 bp). B) Khuếch đại của *Plantaricin W* (~ 200 bp).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các phương án ưu tiên của sáng chế được mô tả chi tiết. Tuy nhiên, cần hiểu rằng, các phương án ưu tiên được mô tả chỉ đơn thuần là ví dụ của sáng chế, mà có thể được thể hiện ở nhiều dạng. Vì thế, các mô tả chi tiết ở đây không được hiểu là làm giới hạn sáng chế, mà chỉ là cơ sở cho yêu cầu bảo hộ và hướng dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế.

Theo một phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện ngành nông nghiệp chăn nuôi, cụ thể là trong sản xuất gia súc cho thịt như là gia cầm. Phương pháp này tạo ra chiến lược trong chăn nuôi nhờ khả năng cải thiện được các tính chất sau: hiệu suất tăng trưởng, chế phẩm tươi sống, hình dạng bên ngoài, và sức khỏe chung của động vật. Ví dụ, đã được minh họa là các phương pháp của sáng chế cho thấy sự cải thiện đặc tính bất kỳ hoặc kết hợp các đặc tính sau: năng suất động vật (bao gồm cả hiệu suất tăng trưởng, hệ vi sinh vật trong phân, axit béo dễ bay hơi và chiều cao nhung mao của ruột non); cholesterol trong huyết tương; và việc sử dụng các chất dinh dưỡng trong chế độ ăn.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các tác dụng của các chất chuyển hóa được tạo ra bởi *Lactobacillus* sp. đối với năng suất tăng trưởng, lượng vi sinh vật trong phân, chiều cao nhung mao của ruột non và axit béo dễ bay hơi trong phân (volatile fatty acids - VFA) ở gà giò.

Ngoài ra, một mục đích khác của sáng chế đề xuất phương pháp xác định hỗn hợp tối ưu của các các chất chuyển hóa của loài *Lactobacillus* sp. làm chất

thêm hoặc chất bổ sung trong chế độ ăn của động vật có một dạ dày. Do đó, liều tối ưu được ưu tiên cho hỗn hợp chất chuyển hóa trong chất bổ sung vào thức ăn cho động vật hoặc chất bổ sung trong chế độ ăn của động vật có một dạ dày.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm cho các chất chuyển hóa có các đặc tính probiotic. Điều này có thể tạo ra phương pháp cải thiện sức khỏe chung của động vật. Một đối tượng khác của sáng chế là chất bổ sung vào thức ăn cho động vật giúp động vật tiêu hóa tốt thức ăn. Do đó, thức ăn cho động vật có ưu điểm là hạn chế mùi từ phân của động vật và tạo ra phân có chất lượng tốt cho đất nông nghiệp.

Phương pháp tốt nhất để thực hiện sáng chế

Trong một khoảng giá trị được cung cấp, cần hiểu rằng là từ mỗi giá trị trong khoảng này, đến một phần mười đơn vị của giới hạn dưới trừ khi được quy định rõ ràng theo cách khác, nằm giữa giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng đó và giá trị được nêu khác bất kỳ hoặc giá trị nằm trong khoảng trong khoảng được nêu đó, được bao gồm trong sáng chế. Các giới hạn trên và dưới của các khoảng nhỏ hơn này có thể độc lập được bao gồm trong khoảng nhỏ hơn, và cũng được bao gồm trong sáng chế, tùy thuộc vào giới hạn loại trừ đặc biệt bất kỳ trong khoảng được nêu. Khoảng được nêu bao gồm một hoặc cả cả hai giới hạn, các khoảng loại trừ một hoặc cả hai giới hạn được bao gồm đó cũng được bao gồm trong sáng chế.

Trừ khi được xác định theo cách khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế. Mặc dù, phương pháp bất kỳ và nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây cũng có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, song phương pháp và nguyên liệu ưu tiên được mô tả. Tất cả các công bố được đề cập ở đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn để trình bày và mô tả phương pháp và/hoặc nguyên liệu có liên quan đến các công bố được viện dẫn. Cần lưu ý rằng như được sử dụng ở đây và trong yêu cầu bảo hộ đi kèm, các thuật ngữ số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều trừ khi được quy định theo cách khác.

Động vật có một dạ dày như là lợn, gia cầm, bê sữa và cá được tăng trưởng mạnh để sản xuất thịt, cá và trứng. Các động vật này được cho ăn với chế độ ăn chứa nhiều nguyên liệu thô có nguồn gốc động vật và/hoặc thực vật để cung cấp năng lượng và protein. Phần lớn thức ăn được tiêu thụ được sản xuất trên thị trường, nhưng một phần đáng kể được sản xuất trong trang trại và được cho ăn trực tiếp. Thức ăn thường được bổ sung vitamin và khoáng chất để đáp ứng các yêu cầu dinh dưỡng của động vật.

Sáng chế đề xuất các chất chuyển hóa mới có các đặc tính probiotic để sử dụng làm chất bổ sung vào thức ăn hoặc chất kích thích tăng trưởng ở gia cầm. Chất bổ sung vào thức ăn cho động vật mà bao gồm một lượng hữu hiệu các chất chuyển hóa của loài *Lactobacillus* sp có trong tự nhiên được đề xuất. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến dịch nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học của các chủng *Lactobacillus plantarum* RS5, R11, RG14 và RG11 (Comb 3456) hoặc chủng đột biến của chúng thu được từ vi sinh vật. Các vi sinh vật được ký gửi ở BIOTEC Culture Collection (BCC), Đơn vị nghiên cứu trung tâm BIOTEC của Thái Lan (một thành viên của NSTDA) và cũng có thể được thu từ phòng công nghệ xử lý sinh học, khoa công nghệ xử lý sinh học, Đại học Putra Malaysia. Tốt hơn là, dịch nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học của các chủng *plantarum* RS5, R11, RG14 và RG11 hoặc chủng đột biến của nó có khả năng tạo ra một lượng hữu hiệu các chất chuyển hóa để sử dụng làm thức ăn cho động vật.

Tốt hơn là, chất bổ sung vào thức ăn cho động vật bao gồm ít nhất khoảng 0,2% (trọng lượng/thể tích) chất chuyển hóa ở dạng hỗn hợp tính trên trọng lượng khô. Chất bổ sung vào thức ăn cho động vật có thể được kết hợp với các chất dinh dưỡng để tạo thành thức ăn cho động vật, mà là một khía cạnh khác của sáng chế. Ngoài ra, sáng chế bao gồm phương pháp chăn nuôi động vật bằng thức ăn cho động vật này. Sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sức khỏe gia cầm. Theo các phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất phương pháp gia tăng và/hoặc làm tăng thêm sự tăng trưởng của gia cầm; cải thiện sự miễn dịch; và tình trạng sức khỏe chung của gia cầm. Để làm việc này, sáng chế đề xuất nguyên liệu và phương pháp dùng

các chất chuyển hóa của *Lactobacillus* sp được phân lập từ thức ăn Malaysia cho gia cầm.

Bốn hỗn hợp của các chất chuyển hóa được tạo ra từ các chủng của *L. plantarum* được sử dụng để nghiên cứu về năng suất của gà giò. Tổng 432 gà giò Ross đực được nuôi từ một ngày tuổi đến 42 ngày tuổi trong bãi nuôi phủ rơm sâu (12 con/bãi). Các con gà giò này được chia thành 6 nhóm và được cho ăn với các chế độ ăn khác nhau: (i) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn (đối chứng âm); (ii) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn + Neomyxin và Oxytetraxyclin (đối chứng dương); (iii) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn + 0,3 % hỗn hợp chất chuyển hóa của các chủng *L. plantarum* RS5, RI11, RG14 và RG11 (com3456); (iv) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn + 0,3% hỗn hợp chất chuyển hóa của các chủng *L. plantarum* TL1, RI11 và RG11 (Com246); (v) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn + 0,3% hỗn hợp chất chuyển hóa của các chủng *L. plantarum* TL1, RG14 và RG11 (Com256) và (vi) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn + 0,3% hỗn hợp chất chuyển hóa của các chủng *L. plantarum* TL1, RS5, RG14 và RG11 (Com2356). Trọng lượng cơ thể cuối cùng cao hơn, mức tăng trọng lượng, mức tăng trung bình hàng ngày và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp hơn đáng kể được thấy (p<0,05) ở cả bốn nhóm nghiên cứu. Việc bổ sung hỗn hợp các chất chuyển hóa cũng làm tăng mật độ LAB trong phân, chiều cao nhung mao ruột non và axit béo dễ bay hơi trong phân và cholesterol thấp hơn và mật độ *Enterobacteriaceae* trong phân. Các tác dụng của các liều hỗn hợp chất chuyển hóa cho ăn khác nhau của các chủng *L. plantarum* RS5, RI11, RG14 và RG11 (Com3456) đến sản lượng gà giò được nghiên cứu. Tổng 504 con gà giò Ross đực được chia thành 7 nhóm nghiên cứu và được dùng các chế độ ăn khác nhau: (i) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn (đối chứng âm); (ii) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn + 100 ppm Neomyxin và Oxytetraxyclin (đối chứng dương); (iii) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn + 0,1% hỗn hợp các chất chuyển hóa của các chủng *L. plantarum* RS5, RI11, RG14 và RG11 (Com3456); (iv) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn + 0,2% Com3456; (v) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn + 0,3% Com3456 (vi) chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương chuẩn + 0,4% Com3456 và (vii) chế độ ăn dựa

trên ngô-đậu tương chuẩn + 0,5% Com3456. Việc bổ sung Com3456 với các liều dùng khác nhau đã cải thiện hiệu suất tăng trưởng, làm giảm *Enterobacteriaceae* và làm tăng số lượng vi khuẩn sinh axit lactic, và làm tăng chiều cao nhung mao của ruột non và nồng độ axit béo dễ bay hơi trong phân. Nhóm nghiên cứu có 0,4% và 0,2% Com3456 thu được kết quả tốt nhất, đặc biệt là về hiệu suất tăng trưởng; tỷ lệ chuyển hóa thức ăn và chiều cao nhung mao so với các liều dùng khác. Tuy nhiên, liều dùng 0,2% được đề xuất do nồng độ thấp hơn của nó với tác dụng tương tự là 0,4%. Các kết quả này chỉ ra rằng 0,2% là mức tối ưu được đưa vào trong các chế độ ăn của gà giò để thay thế chất kích thích tăng trưởng kháng sinh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Gà giò và thiết kế thí nghiệm

Tổng 432 con gà giò Ross đực từ một công ty ở địa phương được nuôi từ một ngày tuổi đến 42 ngày tuổi trong bãi lót ổ rơm sâu. Mỗi bãi gồm có 12 con gà và được phân bổ ngẫu nhiên vào chuồng mở có ổ lót vỏ bào gỗ. Sau khi được mua về, các gà được tiêm vacxin chống lại bệnh viêm phế quản nhiễm trùng (infectious bronchitis - IB) và bệnh do virút Newcastle (Newcastle disease - ND) (IB-ND Fort Dodge, Mỹ) bằng đường trong mắt. Vacxin IBD (UPM93, MyVac, Malaysia) chống lại bệnh viêm túi huyệt truyền nhiễm IBD được dùng vào ngày thứ 14 của thời kỳ nuôi. Sau khi tiêm vacxin, các con gà được buộc dải băng để theo dõi trọng lượng của từng con, nước và thức ăn được cung cấp *tùy ý*. Chế độ ăn ban đầu và cuối cùng được đề nghị tương ứng cho gà từ 0 – 21 và 22 – 42 ngày tuổi. Các nhóm nghiên cứu chế độ ăn gồm có: (i) chế độ ăn cơ bản dựa trên ngô-đậu tương không có kháng sinh (đối chứng âm); (ii) chế độ ăn cơ bản với 100ppm Neomyxin và Oxytetraxyclin (đối chứng dương); (iii) chế độ ăn cơ bản được bổ sung với 0,1% hỗn hợp các chất chuyển hóa từ 4 chủng của *L. plantarum* RS5, RI11, RG14 và RG11 (Com3456); (iv) chế độ ăn cơ bản được bổ sung với 0,2% hỗn hợp chất chuyển hóa của Com3456; (v) chế độ ăn cơ bản được bổ sung với 0,3% hỗn hợp chất chuyển hóa của Com3456; (vi) chế độ ăn cơ bản được bổ sung với 0,4% hỗn hợp chất chuyển hóa của Com 3456 và (vii) chế độ ăn cơ bản được bổ sung với 0,5% hỗn hợp chất chuyển hóa của Com3456. Các chế độ ăn được tạo ra để đáp ứng

tất cả các yêu cầu về các chất dinh dưỡng cho gà giò. Tỷ lệ thành phần trong chế độ ăn ban đầu và cuối cùng được trình bày tương ứng trong Bảng 1 và 2.

Bảng 1: Tỷ lệ thành phần trong chế độ ăn ban đầu

Thành phần	Các nhóm nghiên cứu chế độ ăn[1]					
	Đối chứng âm	Đối chứng dương	Com3456	Com246	Com256	Com2456
Ngô	50,600	50,600	50,600	50,600	50,600	50,600
Đậu tương	29,382	29,382	29,382	29,382	29,382	29,382
Cám bột mì	6,072	6,062	5,772	5,772	5,772	5,772
CPO	3,600	3,600	3,600	3,600	3,600	3,600
Bột cá 55%	7,600	7,600	7,600	7,600	7,600	7,600
L-Lyxin	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
DL-Methionin	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Monodicanxiphotphat 21	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Canxi cacbonat	0,680	0,680	0,680	0,680	0,680	0,680
Cholin clorua	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060
Muối	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
Hỗn hợp chất khoáng[2]	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Hỗn hợp vitamin[3]	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060
Chất chống oxi hóa	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Chất liên kết độc tố	0,135	0,135	0,135	0,135	0,135	0,135
Kháng sinh[4]		0,010				
Bột chuyển hóa			0,300	0,300	0,300	0,300
Tổng cộng	100	100	100	100	100	100
Phân tích theo tính toán:						
Protein thô, %	22,50	22,48	22,48	22,47	22,45	22,44
ME, kCal/kg	2919,90	2918,68	2918,68	2917,48	2916,28	2915,08

[1]Com3456 là hỗn hợp của 4 chủng RS5, RI11 RG11 và RG14; Com246 là hỗn hợp của TL1, RI11 và RG11; Com256 là hỗn hợp của TL1, RI14 và RG11; Com2456 là hỗn hợp của TL1, RI11, RG14 và RG11.

[2]Hỗn hợp chất khoáng được cung cấp mỗi kilogam chế độ ăn: Fe 100 mg; Mn 110 mg; Cu 20 mg; Zn 100 mg; I 2 mg; Se 0,2 mg; Co 0,6 mg.

[3]Hỗn hợp vitamin được cung cấp mỗi kilogam chế độ ăn: vitamin A 6.667 IU; vitamin D 1.000 IU; vitamin E 23 IU; vitamin K3 1,33 mg; cobalamin 0,03 mg; thiamin 0,83 mg; riboflavin 2 mg; axit folic 0,33mg; biotin 0,03 mg; axit pantothenic 3,75 mg; niaxin 23,3 mg; pyridoxin 1,33 mg.

[4] hỗn hợp của Oxytetraxyclin và Neomyxin ở nồng độ 100 ppm (trọng lượng/trọng lượng).

Bảng 2: Tỷ lệ thành phần trong chế độ ăn cuối cùng

Thành phần	Các nhóm nghiên cứu chế độ ăn[1]					
	Đối chứng âm	Đối chứng dương	Com3456	Com246	Com256	Com2456
Ngô	54,900	54,900	54,900	54,900	54,900	54,900
Đậu tương	26,900	26,900	26,900	26,900	26,900	26,900
Cám bột mì	6,375	6,365	6,075	6,075	6,075	6,075
CPO	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
Bột cá 55%	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
L-Lyxin	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
DL-Methionin	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Monodicanxiphotphat 21	1,400	1,400	1,400	1,400	1,400	1,400
Canxi cacbonat	0,992	0,992	0,992	0,992	0,992	0,992
Cholin clorua	0,058	0,058	0,058	0,058	0,058	0,058
Muối	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
Hỗn hợp chất khoáng[2]	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Hỗn hợp vitamin[3]	0,058	0,058	0,058	0,058	0,058	0,058
Chất chống oxi hóa	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
Chất liên kết độc tố	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Kháng sinh[4]		0,010				
Bột chuyển hóa			0,300	0,300	0,300	0,300
Tổng cộng	100	100	100	100	100	100
Phân tích theo tính toán:						
Protein thô, %	20,34	20,34	20,29	20,29	20,29	20,29

ME, kCal/kg	2912,30	2912,20	2908,60	2908,60	2908,60	2908,60

[1]Com3456 là hỗn hợp của 4 chủng RS5, RI11 RG11 và RG14; Com246 là hỗn hợp của TL1, RI11 và RG11; Com256 là hỗn hợp của TL1, RI14 và RG11; Com2456 là hỗn hợp của TL1, RI11, RG14 và RG11.

[2]Hỗn hợp chất khoáng được cung cấp mỗi kilogam chế độ ăn: Fe 100 mg; Mn 110 mg; Cu 20 mg; Zn 100 mg; I 2 mg; Se 0,2 mg; Co 0,6 mg.

[3]Hỗn hợp vitamin được cung cấp mỗi kilogam chế độ ăn: vitamin A 6.667 IU; vitamin D 1.000 IU; vitamin E 23 IU; vitamin K3 1,33 mg; cobalamin 0,03 mg; thiamin 0,83 mg; riboflavin 2 mg; axit folic 0,33mg; biotin 0,03 mg; axit pantothenic 3,75 mg; niaxin 23,3 mg; pyridoxin 1,33 mg.

[4] hỗn hợp của Oxytetraxyclin và Neomyxin ở nồng độ 100 ppm (trọng lượng/trọng lượng).

Số liệu và thu thập mẫu

Trọng lượng cơ thể từng con (body weight - BW) và lượng thức ăn ăn vào của từng bãi nuôi (feed intake - FI) được ghi chép hàng tuần và mức tăng trọng lượng thực (weight gain - WG), tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (feed conversion ratio-FCR) và mức tăng trung bình hàng ngày (average daily gain-ADG) được tính. 12 con gà giò ở tuần thứ 6 của mỗi nhóm nghiên cứu được chọn ngẫu nhiên và bằng nhau và được giết thịt để lấy mẫu phân và ruột non được lấy ra để phân tích tiếp. Tất cả các quy trình được thông qua bởi Uỷ ban cố vấn nghiên cứu, Đại học Putra Malaysia.

Hiệu suất tăng trưởng

Hiệu suất tăng trưởng được trình bày trong Bảng 3. BW, tổng WG và ADG của các con gà ở 42 ngày tuổi trong nhóm nghiên cứu đối chứng âm là thấp nhất ($p<0,05$) trong số các nhóm nghiên cứu, trong khi gà trong nhóm nghiên cứu, được bổ sung 0,4% Com3456 từ 4 chủng của *L. plantarum* có BW, WG và ADG cao nhất ($p<0,05$) ở 6 tuần tuổi, tiếp theo là các gà ở nhóm đối chứng dương và 0,2% Com3456 ở vị trí thứ ba. Tuy nhiên, không có sự khác biệt nào về BW và WG ($p>0,05$) trong số các con gà trong nhóm đối chứng dương và các nhóm nghiên cứu được bổ sung Com3456, ngoại trừ nhóm nghiên cứu được bổ sung với 0,5% Com3456, mà là nhóm thu được kết quả thấp nhất trong số các nhóm nghiên cứu.

Giá trị trung bình của lượng thức ăn ăn vào không khác nhau đáng kể ($p>0,05$) giữa các nhóm nghiên cứu. Liên quan đến FCR, kết quả thấp nhất ($p<0,05$) được nhận thấy ở nhóm nghiên cứu được bổ sung với 0,4% Com3456 so với các nhóm nghiên cứu còn lại. Điều này cho thấy rằng BW thực, tổng WG và ADG của đối chứng dương và 5 nhóm được bổ sung với các liều dùng Com3456 khác nhau cao hơn so với của gà trong nhóm đối chứng âm, mà được cho ăn với chế độ ăn dựa trên ngô-đậu tương. Các hỗn hợp chất chuyển hóa từ 4 chủng của *L. plantarum* (Com3456) ở các mức liều dùng khác nhau có thể thay thế một phần chất kích thích tăng trưởng kháng sinh và liều dùng tối ưu về hiệu suất tăng trưởng là 0,4% Com3456, mà thu được hiệu suất tăng trưởng cao nhất, tiếp theo là 0,2% Com3456. Đối với tỷ lệ cải thiện hiệu suất so với đối chứng âm, các con gà được bổ sung với các liều hỗn hợp chất chuyển hóa khác nhau có BW thực cao hơn 4 - 12% ở tuần thứ 6 so với các con gà trong nhóm đối chứng âm.

Các hỗn hợp chất chuyển hóa như là sự lựa chọn tiềm năng của AGP là do các tác dụng chống vi khuẩn của chúng. Các tác dụng chống vi khuẩn chính trong việc cải thiện tốc độ tăng trưởng là do tác dụng kìm hãm vi khuẩn và diệt khuẩn để ức chế và giết lượng vi khuẩn gây bệnh trong hệ vi sinh vật trong đường dạ dày ruột. Hoạt tính kháng khuẩn của AGP đã được chứng minh ở động vật không có vi trùng.

Bảng 3: Hiệu suất tăng trưởng ở tuần thứ 6 của các nhóm nghiên cứu được bổ sung các hỗn hợp chất chuyển hóa khác nhau

Thông số	Nhóm nghiên cứu chế độ ăn[1]						SEM
	Đối chứng âm	Đối chứng dương	Com3456	Com246	Com256	Com2456	
Lượng thức ăn ăn vào, kg	4,38	4,38	4,45	4,4	4,21	4,46	0,04
Mức tăng trọng lượng hàng ngày, g	49,40[b]	53,28[a]	53,43[a]	52,59[a]	52,53[a]	52,99[a]	0,36
Trọng lượng	2,07[b]	2,22[a]	2,23[a]	2,20[a]	2,20[a]	2,21[a]	0,01

cơ thể, kg							
Tổng mức tăng trọng lượng, kg	2,03[b]	2,18[a]	2,19[a]	2,16[a]	2,15[a]	2,17[a]	0,01
Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn	2,17[a]	2,01[b]	2,04[b]	2,06[b]	1,98[b]	2,05[b]	0,02

[a,b]giá trị trung bình ± SEM trong cùng hàng với chỉ số ở trên thông thường là sự khác biệt không đáng kể.

[1]Com3456 là hỗn hợp của 4 chủng RS5, RI11 RG11 và RG14; Com246 là hỗn hợp của TL1, RI11 và RG11; Com256 là hỗn hợp của TL1, RI14 và RG11; Com2456 là hỗn hợp của TL1, RI11, RG14 và RG11.

Vi khuẩn sinh axit lactic và số lượng *Enterobacteriaceae* (*Enterobacteriaceae* count - ENT) trong phân

Mật độ LAB và ENT trong phân được xác định sử dụng phương pháp như được mô tả bởi Foo *et al.* (2003b). 10% (trọng lượng/thể tích) mẫu phân được pha loãng trong nước pepton vô trùng, để ở nhiệt độ phòng trong một giờ trước khi pha loãng liên tiếp 10 lần (thể tích/thể tích). Việc đếm LAB được thực hiện trên thạch MRS (*Lactobacillus*-Agar De Man, ROGOSA và SHAPE) (Merck®, KgaA, Darmstadt). Các đĩa được ủ trong lọ kỵ khí ở 30°C trong 48 giờ. ENT được trải ra và được đếm trên thạch EMB (thạch sucroza lactoza xanh metylen eozin (Merck®, KgaA, Darmstadt) và được ủ hiếu khí trong 24 giờ ở 37°C. Số lượng đơn vị tạo thành khuẩn lạc (colony-forming units - CFU) được biểu hiện bằng logarit cơ số 10 của CFU (logCFU) mỗi gam. Tất cả các mẫu được lặp lại ba lần. Số lượng LAB và ENT trong phân được trình bày trong Bảng 4. Số lượng LAB trong phân từ các con gà trong nhóm đối chứng âm là thấp nhất ($p<0,05$), trong đó không có sự khác biệt đáng kể nào giữa các nhóm nghiên cứu còn lại. Đối với lượng ENT ở tuần thứ 6, các con gà trong nhóm đối chứng âm và dương có kết quả cao nhất ($p<0,05$). Ngược lại, số lượng ENT thấp nhất ($p<0,05$) được quan sát thấy ở các nhóm 0,2% và 0,5% Com3456. Số lượng ENT từ các nhóm nghiên cứu còn lại gồm 0,1%, 0,3% và 0,4% Com3456 cũng thấp hơn đáng kể ($p<0,05$) so với nhóm đối chứng âm và dương.

Đã thấy rằng hỗn hợp chất chuyển hóa có tác dụng trong việc làm giảm ENT trong đường dạ dày ruột. Ngoài ra, các hỗn hợp chất chuyển hóa làm tăng LAB trong dạ dày ruột. Mặc dù với các mức độ khác nhau, tất cả các mức liều dùng của các hỗn hợp chất chuyển hóa đều có tác dụng trong việc làm tăng LAB trong đường dạ dày ruột. Tất cả các nhóm nghiên cứu được bổ sung Com3456 đều có tác dụng dương tính trong việc làm giảm số lượng ENT. Tác dụng của hỗn hợp chất chuyển hóa trong việc giảm ENT trong đường dạ dày ruột tạo ra cơ hội tốt hơn cho LAB tăng mật độ trong hệ vi sinh vật đường ruột thông qua sự loại trừ cạnh tranh.

Bảng 4: Số lượng LAB và ENT và axit béo dễ bay hơi trong phân của các nhóm nghiên cứu được bổ sung các hỗn hợp chất chuyển hóa khác nhau

Thông số	Nhóm nghiên cứu chế độ ăn[1]						SEM
	đối chứng âm	đối chứng dương	Com3456	Com246	Com256	Com2456	
số lượng vi khuẩn, logCFU/g							
LAB	5,78^{c}	5,92^{bc}	6,63^{a}	6,26^{ba}	6,42^{a}	6,40^{a}	0,06
ENT	3,83^{a}	3,74^{ab}	3,10^{c}	3,25^{bc}	3,65^{bac}	3,57^{bac}	0,08
Axit béo dễ bay hơi, mM							
Axetic	33,16^{b}	54,80^{ba}	65,72^{a}	47,61^{ba}	50,76^{ba}	63,80^{ba}	4,16
Propionic	1,18^{c}	5,22^{bc}	3,30^{bc}	13,18^{a}	6,07^{bac}	9,73^{ba}	1,07
Butyric	1,41^{b}	5,33^{ba}	2,45^{ba}	7,83^{a}	3,44^{ba}	6,36^{ba}	0,81
axit khác	0,60^{b}	2,04^{ba}	1,34^{ba}	2,40^{a}	1,18^{ba}	1,96^{ba}	0,23
Tổng	36,34^{b}	67,40^{ba}	72,50^{a}	69,80^{ba}	61,40^{ba}	81,80^{a}	5,57

$^{a-c}$giá trị trung bình hàng ± SEM với các chỉ số trên thông thường là sự khác biệt không đáng kể

[1]Com3456 là hỗn hợp của 4 chủng RS5, RI11 RG11 và RG14; Com246 là hỗn hợp của TL1, RI11 và RG11; Com256 là hỗn hợp của TL1, RI14 và RG11; Com2456 là hỗn hợp của TL1, RI11, RG14 và RG11.

Hình thái học ruột non

Phương pháp này là phương pháp biến đổi như được mô tả bởi Hair-Bejo (1990). Các đoạn có chiều dài từ 5 đến 6cm được lấy ra từ tá tràng, hỗng tràng, và hồi tràng như sau: i) phần giữa của vòng tá tràng, ii) phần giữa của điểm cuối của vòng tá tràng và túi thừa Meckel (hỗng tràng), và iii) phần giữa của túi thừa Meckel

và chỗ nối manh tràng (hồi tràng). Các đoạn ruột được rửa bằng dung dịch formalin đệm trung tính 10% và sau đó được sử dụng để phân tích hình thái học. Để phân tích hình thái học, các đoạn được cố định trong dung dịch formalin đệm trung tính 10% qua đêm. Các mẫu ruột sau đó được cắt, khử nước trong máy xử lý mô (Leica, Nhật) và được nhúng vào sáp parafin. Các đoạn 4µm được cắt từ mỗi mẫu, được cố định trên các phiến kính, được nhuộm bằng haematoxylin và eozin, được đặt vào và kiểm tra dưới kính hiển vi ánh sáng. Các biến đổi hình thái học được kiểm tra bao gồm: chiều cao nhung mao (từ đỉnh của các nhung mao đến chỗ nối khe nhung mao), độ dày nhung mao (được xác định như là chiều dày của sự lõm vào giữa các nhung mao kề nhau). Chiều cao nhung mao và độ dày nhung mao được đo sử dụng máy phân tích hình ảnh. Các giá trị là trung bình từ 20 nhung mao tốt nhất và chỉ các nhung mao có hướng thẳng đứng và các khe từ mỗi phiến kính được đo.

Xác định axit béo dễ bay hơi (volatile fatty acid - VFA)

Nồng độ VFA trong phân được xác định sử dụng phương pháp biến đổi của Jin *et al.* (1998). Một gam mẫu phân (được bảo quản ở –20°C) từ mỗi mẫu được cân trong ống lấy mẫu. Một mL axit metaphosphoric 24% được pha loãng trong axit sulphuric 1,5M (phòng thí nghiệm BHD, Poole, Anh) được thêm vào. Hỗn hợp được giữ ở nhiệt độ phòng qua đêm và được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Dịch nổi bề mặt thu gom được giữ trong lọ nhỏ có nắp xoáy 2mL (Kimble Glass Inc., Mỹ). Axit 4-metyl-valeric 20mM tiêu chuẩn nội (công ty hóa chất Sigma, St. Louis, Missouri, Mỹ) được thêm vào dịch nổi bề mặt để thu được 10mM trong hỗn hợp và được bảo quản ở –20°C cho đến khi phân tích GLC. VFA được tách ra bằng Quadrex 007 Series (tập đoàn Quadrex, New Haven, CT 06525 USA) được liên kết với pha được dung hợp với cột mao dẫn silic đioxit (15m, 0,32mm ID, độ dày màng 0,25µm) trong 6890N (Hewlett-Packard, Avondale, PA) được trang bị đầu dò ion hóa bằng ngọn lửa. Nitơ tinh khiết có chức năng như là khí mang với tốc độ chảy 60mL/phút. Nhiệt độ của bơm tiêm và đầu dò là 230°C. Nhiệt độ cột được đặt ở 200°C trong trạng thái đẳng nhiệt. Các chất chuẩn có bán trên thị trường gồm 20mM axit axetic, và 10mM mỗi axit propionic, butyric, isobutiric, valeric, isovaleric và 4-metyl-valeric từ Sigma (công ty hóa chất Sigma, St. Louis,

Missouri, Mỹ) được sử dụng như là các chất chuẩn ngoại để nhận biết các đỉnh. VFA trong phân được trình bày trong Bảng 5. VFA chính là axetic, tiếp theo là propionic và butyric nhưng với nồng độ nhỏ hơn. Các nhóm nghiên cứu được bổ sung với 0,4% và 0,3% Com3456 có mức axit axetic và VFA tổng số cao nhất ($p<0,05$). Ngược lại, các kết quả thấp nhất ($p<0,05$) được nhận thấy ở các con gà trong nhóm đối chứng âm. Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể ($p>0,05$) về nồng độ axit axetic và VFA tổng số được thấy trong số các nhóm nghiên cứu còn lại. Xét về axit propionic và VFA khác, không có sự khác biệt đáng kể ($p>0,05$) được quan sát trong số tất cả các nhóm nghiên cứu. Mức axit butyric của các con gà được cho ăn với 0,1% Com3456 là khác đáng kể ($p<0,05$) với mức của các nhóm nghiên cứu được bổ sung với 0,3%, 0,4% và 0,5% Com3456. Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể ($p>0,05$) được nhận thấy trong số 6 nhóm nghiên cứu còn lại. Sự bổ sung các hỗn hợp chất chuyển hóa làm tăng VFA trong phân. Có sự tăng VFA ở một số liều dùng Com3456, đặc biệt là ở các liều 0,3% và 0,5% Com3456 ở tuần thứ 3 và 0,4% Com3456 ở tuần thứ 6. Một trong các lý do chính của sự tăng VFA ở các nhóm gà nghiên cứu có thể là do tăng LAB trong các nhóm nghiên cứu được bổ sung các hỗn hợp chất chuyển hóa như là LAB và các cơ chất khác nhau lên men của hệ sinh vật trong ruột khác như là lactoza, amin nguồn gốc sinh vật và các hợp chất gây dị ứng thành các axit béo mạch ngắn và các axit hữu cơ khác và các khí (Gibson & Fuller, 2000).

Bảng 5: Chiều cao nhung mao và độ dày khe trong ruột non của các nhóm nghiên cứu được bổ sung các hỗn hợp chất chuyển hóa khác nhau

	Mô tả	Các nhóm nghiên cứu chế độ ăn[1]						SEM
		Đối chứng âm	Đối chứng dương	Com3456	Com246	Com256	Com2456	
Chiều cao nhung mao, µm	Tá tràng	1312,84^{c}	1386,58^{b}	1486,44^{a}	1315,20^{c}	1376,6^{cb}	1406,38^{b}	9,90
	Hỗng tràng	904,42^{c}	918,20^{c}	1012,80^{ba}	996,92^{b}	1035,40^{a}	1003,50^{ba}	5,10
	Hồi tràng	554,17^{d}	577,50^{dc}	592,17^{bc}	641,70^{a}	607,80^{b}	620,00^{ba}	4,48
khe, µm	Tá tràng	157,34^{dc}	141,64^{e}	187,59^{a}	173,10^{ba}	152,40^{de}	168,63^{bc}	2,21

Hỗng tràng	117,42^{c}	173,51^{a}	147,80^{b}	176,17^{a}	162,20^{ba}	152,60^{b}	2,34
Hồi tràng	88,00^{dc}	113,25^{a}	97,50^{bc}	105,40^{ba}	112,50^{a}	80,00^{d}	1,67

$^{a-e}$Giá trị trung bình ± SEM trong cùng hàng với các chỉ số trên thông thường là sự khác biệt không đáng kể.

[1]Com3456 là hỗn hợp của 4 chủng RS5, RI11 RG11 và RG14; Com246 là hỗn hợp của TL1, RI11 và RG11; Com256 là hỗn hợp của TL1, RI14 và RG11; Com2456 là hỗn hợp của TL1, RI11, RG14 và RG11.

Phân tích số liệu

Số liệu được phân tích như là thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn sử dụng phương thức mô hình tuyến tính chung của hệ phân tích thống kê (SAS, 1998). Kiểm định đa khoảng Duncan được sử dụng để so sánh giá trị trung bình của các nhóm nghiên cứu. Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM). Các đơn vị thí nghiệm là các bãi nuôi gà giò làm các đối tượng thí nghiệm. Mô hình thống kê như sau:

$Yijk=\mu + \tau i + \varepsilon ij + \delta ijk$

- μ = hiệu quả trung bình
- τi = hiệu quả của nhóm nghiên cứu thứ i
- εij = sai số ngẫu nhiên
- δijk= sai số lấy mẫu

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dịch nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học của chủng vi khuẩn probiotic, trong đó chủng vi khuẩn này là vi khuẩn sinh axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus plantarum* và nhóm *Lactobacillus plantarum* bao gồm các chủng RI11, RG14, RS5 và RG11.

2. Dịch nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học theo điểm 1, trong đó vi khuẩn sinh axit lactic này có khả năng tổng hợp các chất chuyển hóa.

3. Dịch nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học theo điểm 2, trong đó các chất chuyển hóa bao gồm các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn.

4. Thức ăn cho động vật chứa các chất chuyển hóa của dịch nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học theo điểm 2, trong đó các chất chuyển hóa được bổ sung vào thức ăn cho động vật dưới dạng chất thêm và/hoặc chất bổ sung.

5. Thức ăn cho động vật theo điểm 4, trong đó thức ăn cho động vật chứa một lượng hữu hiệu chất chuyển hóa nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,5% tính theo trọng lượng khô.

6. Thức ăn cho động vật theo điểm 5, trong đó thức ăn cho động vật bao gồm:

a) các chất dinh dưỡng;

b) các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn;

c) vitamin;

d) các axit hữu cơ

hoặc hỗn hợp của chúng.

7. Thức ăn cho động vật theo điểm 6, trong đó vitamin là vitamin B.

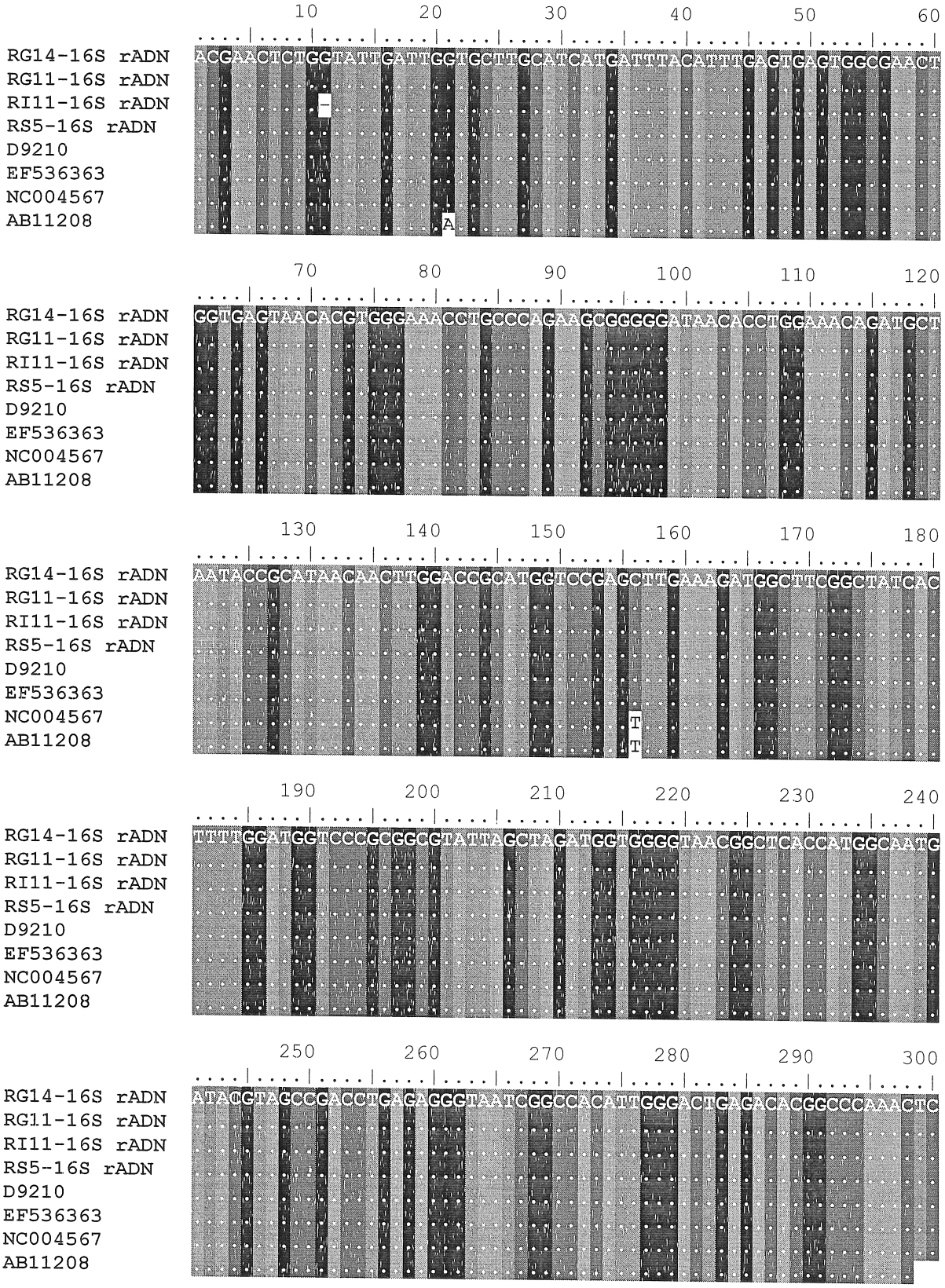
8. Thức ăn cho động vật theo điểm 6, trong đó các axit hữu cơ là axit formic, axit axetic và axit lactic.

9. Thức ăn cho động vật theo điểm 6, trong đó thức ăn cho động vật bao gồm hỗn hợp của các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn, vitamin và axit hữu cơ.

10. Thức ăn cho động vật theo điểm 6, trong đó thức ăn cho động vật bao gồm hỗn hợp của các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn, và axit hữu cơ.

11. Thức ăn cho động vật theo điểm 10, trong đó lượng các chất kháng khuẩn được tổng hợp bởi vi khuẩn nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,8%.

1/3


10 20 30 40 50 60
RG14-16S rADN
RG11-16S rADN
RI11-16S rADN
RS5-16S rADN
D9210
EF536363
NC004567
AB11208
70 80 90 100 110 120
RG14-16S rADN
RG11-16S rADN
RI11-16S rADN
RS5-16S rADN
D9210
EF536363
NC004567
AB11208
130 140 150 160 170 180
RG14-16S rADN
RG11-16S rADN
RI11-16S rADN
RS5-16S rADN
D9210
EF536363
NC004567
AB11208
190 200 210 220 230 240
RG14-16S rADN
RG11-16S rADN
RI11-16S rADN
RS5-16S rADN
D9210
EF536363
NC004567
AB11208
250 260 270 280 290 300
RG14-16S rADN
RG11-16S rADN
RI11-16S rADN
RS5-16S rADN
D9210
EF536363
NC004567
AB11208

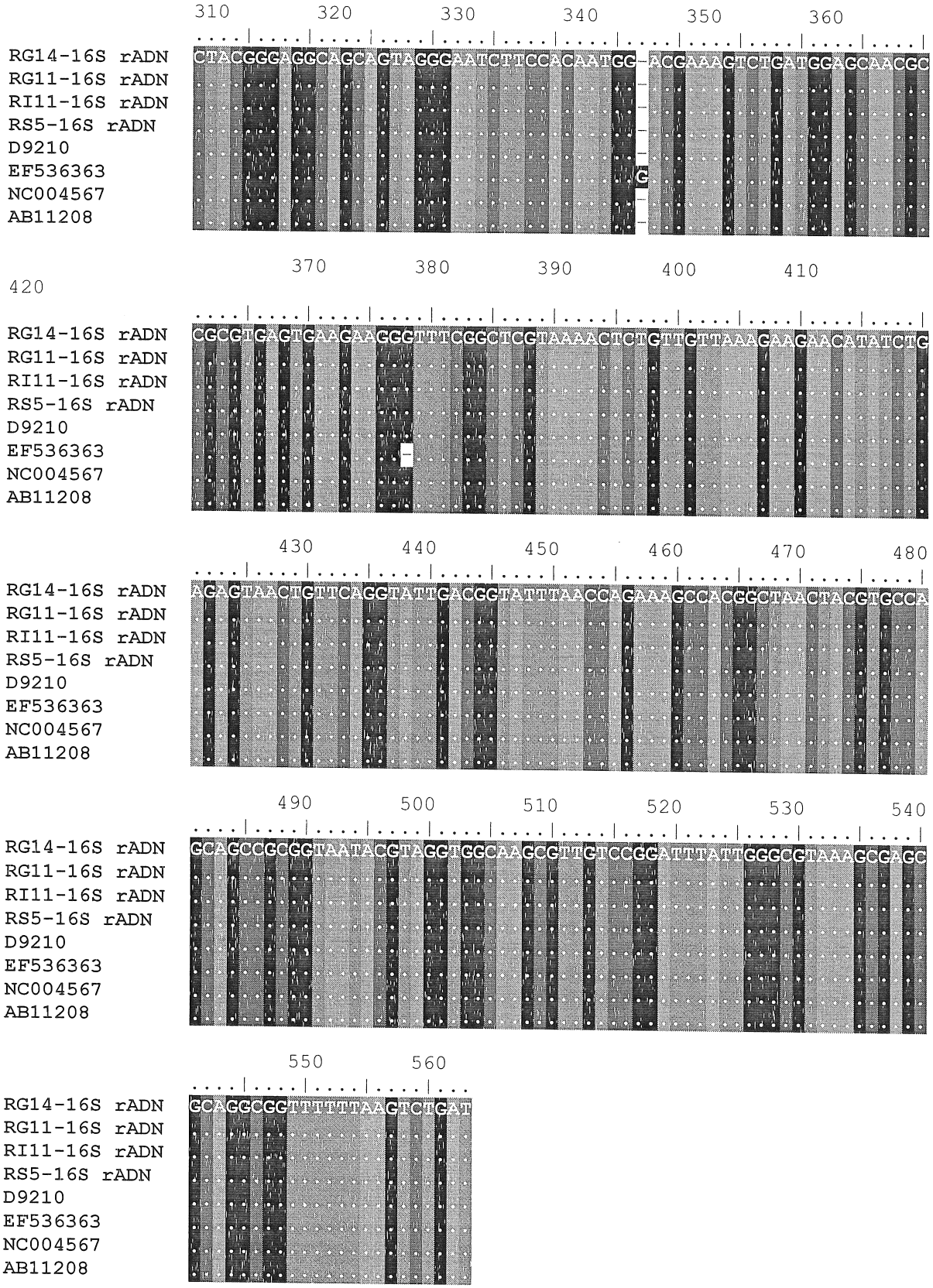

310 320 330 340 350 360
RG14-16S rADN
RG11-16S rADN
RI11-16S rADN
RS5-16S rADN
D9210
EF536363
NC004567
AB11208
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGG-ACGAAAGTCTGATGGAGCAACGC
370 380 390 400 410
420
CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTG
430 440 450 460 470 480
AGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
490 500 510 520 530 540
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC
550 560
GCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGAT

FIG. 1

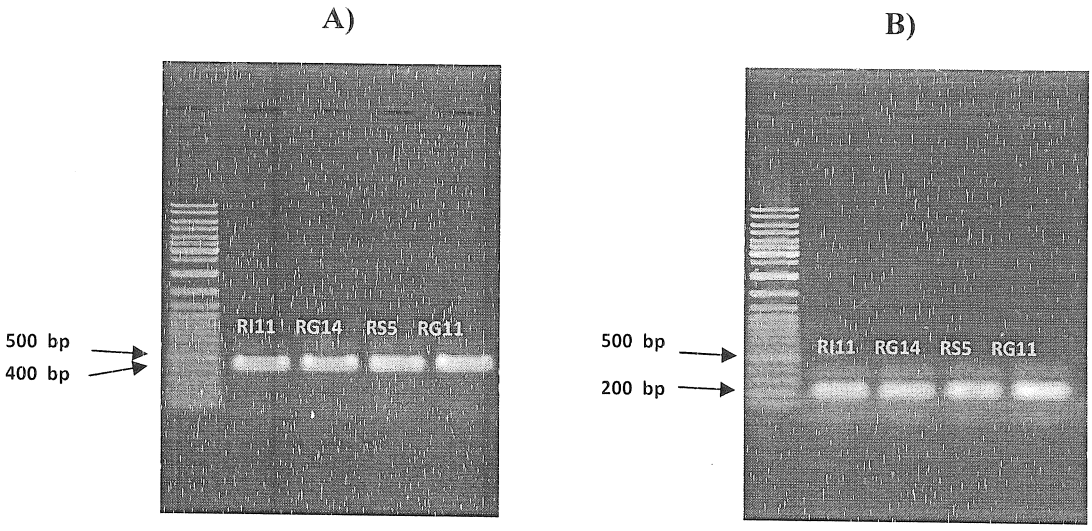

A)
B)
500 bp
400 bp
RI11
RG14
RS5
RG11
500 bp
200 bp
RI11
RG14
RS5
RG11

FIG. 2

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Đại học Putra Malaysia

<120> Dịch nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học của chủng vi khuẩn probiotic và thức ăn cho động vật chứa dịch nuôi cấy này

<130> SK/PCT0010/UPM/09 PCT/MY2009/000050

<160> 5

<170> Patent phiên bản 3.4

<210> 1
<211> 562
<212> ADN
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<221> đặc điểm khác
<223> Chủng lactobacillus plantarum RG14

<400> 1
acgaactctg gtattgattg gtgcttgcat catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60

ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120

aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggctatcac 180

ttttggatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggt aacggctcac catggcaatg 240

atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300

ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360

gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420

gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480

cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg 540

caggcggttt tttaagtctg at 562

<210> 2
<211> 561
<212> ADN
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<221> đặc điểm khác
<223> Chủng lactobacillus plantarum RI-11

<400> 2
acgaactctg tattgattgg tgcttgcatc atgatttaca tttgagtgag tggcgaactg 60

gtgagtaaca cgtgggaaac ctgcccagaa gcgggggata acacctggaa acagatgcta 120

ataccgcata acaacttgga ccgcatggtc cgagcttgaa agatggcttc ggctatcact 180

tttggatggt cccgcggcgt attagctaga tggtggggta acggctcacc atggcaatga 240

tacgtagccg acctgagagg gtaatcggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc 300

tacgggaggc agcagtaggg aatcttccac aatggacgaa agtctgatgg agcaacgccg 360

cgtgagtgaa gaagggtttc ggctcgtaaa actctgttgt taaagaagaa catatctgag 420

agtaactgtt caggtattga cggtatttaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc 480

agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt attgggcgta aagcgagcgc 540

aggcggtttt ttaagtctga t 561

<210> 3
<211> 562
<212> ADN
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<221> đặc điểm khác
<223> Số truy nhập cơ sở dữ liệu EF536363

<400> 3
acgaactctg gtattgattg gtgcttgcat catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60

ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120

aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggctatcac 180

ttttggatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggt aacggctcac catggcaatg 240

atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300

ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatgggacg aaagtctgat ggagcaacgc 360

cgcgtgagtg aagaaggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420

gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480

cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg 540

caggcggttt tttaagtctg at 562

<210> 4
<211> 562
<212> ADN
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<221> đặc điểm khác
<223> Số truy nhập cơ sở dữ liệu NC004567

<400> 4
acgaactctg gtattgattg gtgcttgcat catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60

ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120

aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagtttga aagatggctt cggctatcac 180

ttttggatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggt aacggctcac catggcaatg 240

atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300

ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360

gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420

gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480

cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg 540

caggcggttt tttaagtctg at 562

<210> 5
<211> 562
<212> ADN
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<221> đặc điểm khác
<223> Số truy nhập cơ sở dữ liệu AB11208

<400> 5
acgaactctg gtattgattg atgcttgcat catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60

ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120

aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagtttga aagatggctt cggctatcac 180

ttttggatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggt aacggctcac catggcaatg 240

atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300

ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360

gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420

gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480

cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg 540

caggcggttt tttaagtctg at 562