



(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)



1-0025622

(51)⁷ A23K 1/00; A23K 1/18

(13) B

(21) 1-2012-02393

(22) 09/06/2010

(86) PCT/MY2010/000095 09/06/2010

(87) WO/2011/019264 17/02/2011

(30) PI 20097013 10/08/2009 MY

(45) 25/09/2020 390

(43) 25/04/2013 301A

(73) UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA (UPM) (MY)

Serdang Selangor Darul Ehsan, Malaysia

(72) FOO, Hooi Ling (MY); LOH, Teck Chwen (MY); KARUNAKARAMOORTHY, Anuradha (MY); SHAMSUDIN, Mariana, Nor (MY); HAJI ABDUL RAHIM, Raha (MY).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) SẢN PHẨM THỨC ĂN CHO CÁ CHỨA CHẤT CHUYỂN HÓA CÓ NGUỒN GỐC TỪ CHỦNG VI KHUẨN PROBIOTIC

(57) Sáng chế đề cập đến sản phẩm thức ăn cho cá chứa chất chuyển hóa có nguồn gốc từ probiotic LAB. Do đó, thức ăn này rất thích hợp để sử dụng làm thức ăn chăn nuôi động vật thủy sản.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110
UL4      ACGAAGCTCTGGTATTGATTCGCTTCATCATGATTTACATTGAGTGAGTGGGAACTGGTGAGTAAACCTGGGAGAGCGGGGGAACACCTGGA
AB112083 .....
D79210 .....
EF534363 .....
NC004567 .....

      120     130     140     150     160     170     180     190     200     210     220
UL4      AACAGATGCTAAATCCGCATACAACTTGGACGCGATGGTCGAGCTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGT
AB112083 .....
D79210 .....
EF534363 .....
NC004567 .....

      230     240     250     260     270     280     290     300     310     320     330
UL4      AACGGCTCAGCATGGCAATGATAGCGGACTTGAGAGGGTAATCGGCGCATTTGGGATTGAGACAGCGCGCAACTCTTACGGGAGCGCATAGGGAATCTTCCA
AB112083 .....
D79210 .....
EF534363 .....
NC004567 .....

      340     350     360     370     380     390     400     410     420     430     440
UL4      CAATGG-ACGAAATCTGATGGAGCAACGGCGGCTGAGTGAAGAGGGTTTGGCTCGTAAACTCTGTGTAAAGAGAGCATATCTGAGATTAATCTTCAGGTATT
AB112083 .....
D79210 .....
EF534363 .....
NC004567 .....

      450     460     470     480     490     500     510     520     530     540     550
UL4      GACGGTATTAAACAGAAAGCCACGGCTACTACTGTGCGGCAAGCGCGGTAATAGGTGGCAGCGGTTTGGCGGATTATTGGCGGTAAAGCGAGCGCGGGGT
AB112083 .....
D79210 .....
EF534363 .....
NC004567 .....

      560
UL4      TTTTAAAGCTGAT
AB112083 .....
D79210 .....
EF534363 .....
NC004567 .....
```

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sản phẩm thức ăn cho cá chứa chủng vi khuẩn probiotic, trong đó chủng vi khuẩn là chủng *Lactobacillus plantarum* I-UL4 và được nộp lưu dưới số truy nhập 36838 ở BIOTEC Culture Collection để sử dụng trong việc làm giảm lượng *A. hydrophila* trong phân ở cá. Các phương án được ưu tiên theo sáng chế được mô tả trong các điểm yêu cầu bảo hộ thuộc từ 2 đến 7.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

LAB được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm để sản xuất các sản phẩm lên men bao gồm các sản phẩm sữa ví dụ như là sữa chua và pho mát, sản phẩm thịt, sản phẩm bánh mì, các sản phẩm rượu vang và thực vật. *Lactococcus lactis* là một trong số LAB phổ biến nhất được sử dụng trong nuôi cấy chất môi sản phẩm sữa. LAB được sử dụng phổ biến làm các chất để tiêm cấy vào thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ thực vật và động vật, nghĩa là cho mục đích bảo quản.

LAB được sử dụng bao gồm một hoặc nhiều loài LAB mà thông thường được sử dụng trong xử lý thực phẩm, ví dụ, liên cầu khuẩn kiểu N, pediococci, leconostoc hoặc vi khuẩn sữa lactobacilli. Chúng có thể được thêm ở dạng dịch nuôi cấy tinh khiết nhưng thích hợp hơn là sử dụng dịch nuôi cấy hỗn hợp từ nguyên liệu lên men có nguồn gốc từ thực vật hoặc động vật. LAB probiotic cũng được biết là sản xuất nhiều loại các chất kháng khuẩn, cũng như các chất chuyển hóa bậc một ức chế, như là axit axetic, axit lactic, axit propionic, etanol, diacetyl, hydro peroxit, các bacterioxin và chất giống kháng sinh có hoạt tính chống lại vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Các bacteriocin là các hợp chất protein, mà có tính chất kháng vi khuẩn có thể ức chế nhiều loài vi khuẩn khác nhau, đặc biệt là vi khuẩn gây bệnh. Hợp chất này được chú ý nhiều bởi vì chúng được tạo ra bởi các vi khuẩn có lợi cho sức khỏe của con người và cũng thường được sử dụng làm chất bảo quản sinh học cho thực phẩm tự nhiên. Đã được biết rằng việc dùng bacteriocin làm ảnh hưởng đến hệ vi khuẩn của đường dạ dày ruột và làm giảm mức độ vi khuẩn gây bệnh trong các phần khác nhau của đường dạ dày

ruột. Mặc dù, có rất nhiều báo cáo về các lợi ích cho sức khỏe của LAB, nhưng chỉ giới hạn các bằng chứng là có sẵn cho thấy các chất chuyển hóa LAB có thể tạo ra các tác dụng có lợi cho vật chủ. Các chất chuyển hóa của LAB thân thiện với môi trường biểu hiện các tác dụng đối kháng chống lại vi khuẩn gây bệnh có thể là được quan tâm ứng dụng làm chất bổ sung cho thức ăn để thay thế cho việc sử dụng kháng sinh. Vì vậy vẫn có nhu cầu cao về các sản phẩm thủy sản và việc gia tăng tìm kiếm các chất thay thế cho chất kháng sinh. Nghề nuôi trồng thủy sản đã trở thành một trong các lĩnh vực sản xuất thực phẩm tăng trưởng nhanh nhất, và đang được tập trung nhiều hơn vào khả năng áp dụng các phương pháp thông thường đã biết từ ngành chăn nuôi gia súc để kiểm soát dịch bệnh và thúc đẩy tăng trưởng trong ngành nuôi trồng thủy sản. Sự bùng phát dịch bệnh bị gây ra bởi các sinh vật có hại có trong môi trường xung quanh được công nhận như một trong số các cản trở đáng kể nhất trong lĩnh vực sản xuất thủy sản, làm ảnh hưởng đến sự phát triển kinh tế của lĩnh vực này ở nhiều nước.

Đã có nhiều sự tập trung hơn vào việc kiểm soát sự có mặt của các tác nhân gây bệnh trong môi trường nuôi trồng thủy sản bằng việc áp dụng và kiểm tra các phương pháp thông thường được sử dụng trong chăn nuôi động vật trên cạn. Các phương pháp này bao gồm việc bổ sung hợp chất kháng khuẩn, ví dụ như chất kháng sinh, vào môi trường. Tuy nhiên, các phương pháp tiếp cận thông thường này có sự thành công hạn chế. Như được kỳ vọng, nhu cầu kiểm soát bệnh được giải thích bởi việc phát hiện các phương pháp kiểm soát bệnh mới. Một phương pháp như vậy bao gồm việc sử dụng "các probiotic", mà là chủng vi khuẩn đối kháng được sử dụng để kiểm soát các quần thể tác nhân gây bệnh tiềm tàng thông qua ví dụ sự loại trừ cạnh tranh. Kỹ thuật này được sử dụng trong ngành chăn nuôi gia súc, trong đó các sản phẩm probiotic thương mại đã được tung ra và có bán trên thị trường. Việc dùng các sản phẩm này qua đường miệng làm cho sự đề kháng tăng lên đối với các nhiễm trùng ruột và tăng cường đáp ứng miễn dịch chung cho động vật được điều trị.

Hơn nữa, kháng sinh và các probiotic là chất bổ sung vào thức ăn thông thường được sử dụng trong hoạt động nuôi trồng thủy sản. Các probiotic được xác định làm chất phụ gia vi khuẩn sống bất kỳ mà có lợi trên vật chủ bằng các thay đổi trong cộng đồng vi khuẩn có liên quan đến vật chủ hoặc ở xung quanh, thông qua cải thiện việc sử dụng thức ăn hoặc giá trị dinh dưỡng của nó, hoặc bằng cách tăng đáp ứng của vật chủ

với bệnh hoặc bằng cách cải thiện chất lượng môi trường của nó. Kháng sinh thúc đẩy tăng trưởng là một loại chất phụ gia thức ăn gia súc thông thường khác, phần lớn do các tác dụng tích cực của nó cho sự tăng trưởng hoặc hiệu quả chuyển hóa thức ăn và việc giảm bớt tỷ lệ mắc các bệnh nhất định. Tuy nhiên, việc sử dụng rộng rãi kháng sinh có thể dẫn đến phát triển sự đề kháng trong một số loài vi khuẩn gây bệnh. Tương tự, sự đề kháng thuốc chéo có thể xảy ra đối với kháng sinh điều trị thuộc cùng một nhóm được chất, cụ thể là các thuốc kháng sinh có mối quan hệ gần với các liệu pháp kháng vi khuẩn ở người. Một số nước đã áp đặt bắt buộc hạn chế hoặc cấm sử dụng kháng sinh làm chất thúc đẩy tăng trưởng và điều này khiến cho tập trung vào phát triển các phương án có thể thay thế.

Ứng dụng của các chất chuyển hóa LAB trong ngành nuôi trồng thủy sản có thể làm gia tăng sản xuất các động vật thủy sản để hỗ trợ nhu cầu ngày càng tăng của người tiêu dùng và có tác động làm giảm sử dụng kháng sinh làm chất phụ gia thức ăn gia súc mà sẽ dẫn đến sự kháng thuốc đối với các vi khuẩn gây bệnh. So sánh với vi sinh vật sống, thì các chất chuyển hóa có nhiều ưu điểm hơn trong việc bảo quản, vận chuyển và xử lý.

Kỹ thuật trước đây trong ngành nuôi trồng thủy sản hiện nay cho thấy rằng các loài vi khuẩn đã được thí nghiệm về sự kiểm soát môi trường nước. WO02/00035 mô tả phức hợp thực phẩm có hoạt tính sinh học để kiểm soát các bệnh do vi khuẩn gây ra trong các động vật dưới nước. Phức hợp thực phẩm này được mô tả như nhũ tương chứa ít nhất một vi khuẩn probiotic này, được chọn lựa để sản xuất hóa chất kháng khuẩn, và ít nhất một hợp chất ức chế hoặc điều hòa. Ít nhất một hợp chất ức chế hoặc điều hòa này là furanon, mà chứa nhóm chất hóa học nói chung làm ức chế sự xâm chiếm bề mặt của các vi sinh vật. Vi khuẩn probiotic được mô tả nói chung là vi khuẩn *Bacillus*. Không có chủng *Bacillus* ưu tiên đặc biệt nào được đề cập và các ví dụ thực hiện chỉ đề cập đến vi khuẩn probiotic như vậy.

JP2000103740A mô tả được phẩm cho cá và tôm cua, mà chứa các chất chuyển hóa và các sản phẩm làm hoạt chất, như là peptit thu được bởi dịch nuôi cấy hỗn hợp của *Bacillus thuringiensis* và *Bacillus pumilu*. Dựa vào các ví dụ cụ thể đã kết luận rằng dịch nuôi cấy hỗn hợp này cải thiện hoạt động của hệ miễn dịch và phòng ngừa

nhằm trùng cho cá được nuôi. Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế này là đưa ra sản phẩm thức ăn cho động vật dưới nước (ví dụ cá) có khả năng làm tăng đáng kể sự đề kháng của động vật ngành nuôi trồng thủy sản (ví dụ cá) chống lại các vi sinh vật gây bệnh có liên quan. Giải pháp này dựa vào nhận biết của các tác giả của sáng chế này về sản phẩm thức ăn cho cá được làm giàu chất chuyển hóa có nguồn gốc từ LAB probiotic làm chất bổ sung thức ăn cho các động vật ngành nuôi trồng thủy sản mà có khả năng làm tăng đáng kể sự đề kháng của cá được nuôi chống lại các vi sinh vật gây bệnh có liên quan.

SON V M ET AL, “Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*”, FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB LNKD-DOI:10.1016/J.FSI.2009.02.2018, tập 26, số 5, khuyến nghị việc dùng *L. plantarum* thực chế để thúc đẩy sự tăng trưởng và tăng cường sự miễn dịch trong cá mú *Epinephelus coioides*.

LOH T C ET AL, “Effects on growth performance, fecal microflora and plasma cholesterol after supplementation of spray-dried metabolite to postweaning rats”, CZECH JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE, POTRAVINARSKYCH INFORMACI, PRAGUE (20090101), tập 54, số 1, mô tả các ảnh hưởng của các chất chuyển hóa LAB được phun khô lên các thông số khác nhau ở chuột sau khi cai sữa.

US 2002/0176910 A1 bộc lộ các sản phẩm thức ăn cho động vật chứa axit sorbic và vi sinh vật sống hoặc chết tạo ra bacteriocin.

FOO, H.L; LOH, T.C; LAI, P.W; LIM, Y.Z; KUFLI, C.N.; RUSUL, G., “Effects of Adding *Lactobacillus plantarum* I-UL4 Metabolites in Drinking Water of Rats”, PAKISTAN JOURNAL OF NUTRITION, (20030901), tập 2, số 5, các trang 283-288, mô tả ảnh hưởng của chất chuyển hóa LAB trong nước uống lên các thông số khác nhau ở chuột.

VENDRELL D ET AL, “Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria”, COMPARATIVE IMMUNOLOGY, MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, PERGAMON PRESS,

OXFORD, GB LNKD-DOI:10.1016/J.CIMID.2007.04.002, tập 31, số 4 thể hiện rằng sự bổ sung probiotic làm giảm đáng kể tỷ lệ chết ở cá hồi cầu vồng.

FOO HL et al. “Effects of feeding *Lactobacillus plantarum* I-UL4 isolated from Malaysian Tempeh on growth performance, faecal flora and lactic acid bacteria and plasma cholesterol concentrations in postweaning rats” Food science and biotechnology 12(4):403-408 August 2003, nghiên cứu các ảnh hưởng của việc dùng qua đường miệng của *L. plantarum* I-UL4 (LP) trong chế độ ăn của chuột sau cai sữa lên hiệu suất tăng trưởng, độ pH của phân, các lượng vi khuẩn Enterobacteriaceae và vi khuẩn axit lactic (LAB) và nồng độ cholesterol trong huyết tương.

José L. Balcázar, Daniel Vendrell, Ignacio de Blas, Imanol Ruiz-Zarzuela, José L. Muzquiz, Olivia Girones, “Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish”, Aquaculture, Tập 278, ấn hành 1-4, mỏng 10 tháng Sáu năm 2008, các trang 188-191, phân tích các ảnh hưởng của vi khuẩn probiotic chống lại sự bám dính của các tác nhân gây bệnh ở cá.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến sản phẩm thức ăn cho cá chứa chủng vi khuẩn probiotic, trong đó chủng vi khuẩn là chủng *Lactobacillus plantarum* I-UL4 và được nộp lưu dưới số truy nhập 36838 ở BIOTEC Culture Collection để sử dụng làm giảm số lượng *A. hydrophila* trong phân ở cá.

Đã được cho rằng thức ăn cho động vật chứa các chất chuyển hóa được tạo ra từ chủng *Lactobacillus plantarum* I-UL4 và các chất chuyển hóa này bao gồm các bacteriocin, vitamin B và axit hữu cơ, như là axit formic, axit axetic và axit lactic.

Tốt hơn là, thức ăn cho động vật chứa các chất chuyển hóa với nồng độ ít nhất là từ 0,1% đến 0,5% của trọng lượng khô. Thực vậy, các chất chuyển hóa được sử dụng làm chất phụ gia hoặc chất bổ sung vào thức ăn.

Hơn nữa, thức ăn cho cá nêu trên có khả năng làm gia tăng sự tăng trưởng của động vật từ 20% đến 50% và có khả năng làm tăng tỷ lệ sống tương đối ít nhất là 80%. Hơn nữa, thức ăn cho cá có khả năng làm giảm lượng vi khuẩn Enterobacteriaceae và

A. hydrophila trong phân và làm tăng lượng LAB trong phân của các động vật thủy sản.

Cũng được bộc lộ là phương pháp nuôi trồng các động vật thủy sản trong đó các động vật thủy sản được cho ăn sản phẩm thức ăn cho động vật thủy sản chứa vi khuẩn probiotic *Lactobacillus plantarum*. Các động vật thủy sản được cho ăn một lượng thức ăn cho động vật thủy sản tương ứng với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 20% tổng lượng hấp thu thức ăn của các động vật thủy sản trong ngành nuôi trồng thủy sản.

Được bộc lộ thêm là phương pháp nuôi động vật thủy sản trong ngành nuôi trồng thủy sản bao gồm cho động vật thủy sản ăn sản phẩm thức ăn cho động vật thủy sản chứa vi khuẩn probiotic *Lactobacillus plantarum*.

Ngoài ra, sáng chế này đề cập đến thức ăn cho động vật thủy sản được sản xuất bằng các phương pháp nêu ở trên. Tốt hơn là, sáng chế này cũng mô tả chế phẩm thức ăn cho động vật mà chứa tổng protein (nằm trong khoảng từ 30% đến 40% của tổng khẩu phần thức ăn), tổng chất béo (tổng chất béo nằm trong khoảng từ 3% đến 5% của tổng khẩu phần thức ăn), chất ẩm (nằm trong khoảng từ 10% đến 12% của tổng khẩu phần thức ăn), và bột chất chuyển hóa (tốt hơn là bao gồm các bacteriocin, kết hợp với vitamin B, và axit hữu cơ). Chế phẩm còn chứa hỗn hợp bất kỳ được chọn từ nhóm gồm protein, chất béo và độ ẩm. Thực vậy, bột chất chuyển hóa chiếm một lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,5% của tổng khẩu phần thức ăn.

Đã được mô tả trong sáng chế này là thức ăn cho động vật có phương thức làm gia tăng tổng lượng hấp thu thức ăn từ 3% đến 10% và chế phẩm tạo ra khả năng làm giảm lượng *Enterobacteriaceae* trong phân và làm tăng vi khuẩn axit lactic trong phân của các động vật thủy sản.

Sáng chế này bao gồm nhiều đặc điểm mới và sự kết hợp của các phần sau đây đã mô tả đầy đủ và được minh họa bằng phần mô tả và các hình vẽ kèm theo, nên hiểu rằng có thể có nhiều thay đổi trong phần mô tả chi tiết mà không tách khỏi phạm vi của sáng chế này hoặc làm mất đi bất kỳ ưu điểm nào của sáng chế này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế này sẽ được hiểu đầy đủ từ phần mô tả chi tiết sáng chế được đưa ra dưới đây và các hình vẽ kèm theo mà được đưa chỉ bằng cách minh họa, mà không làm giới hạn sáng chế này, trong đó:

Fig.1 thể hiện thử nghiệm khuếch tán lỗ thạch của chất chuyển hóa LAB chống lại *Aeromonas hydrophila*

Fig.2 thể hiện ảnh hưởng của chất chuyển hóa LAB đối với tỷ lệ sống của cá rô sau khi được thử nghiệm với *Aeromonas hydrophila*. Ghi chú: T1, chất chuyển hóa LAB; T2, đối chứng $\pm$ chỉ dẫn sai số chuẩn. Giá trị nằm trong cùng một hàng và thí nghiệm có chung chữ cái ghi ở trên thông thường là không khác biệt đáng kể, $P > 0,05$.

Fig.3 thể hiện lượng vi khuẩn có thể sống được trong thức ăn tiêu hóa được bởi cá có và không có chất chuyển hóa LAB. Ghi chú: T1, chất chuyển hóa LAB; T2, đối chứng $\pm$ chỉ dẫn sai số chuẩn. Các giá trị nằm trong cùng một hàng và thí nghiệm có chung chữ cái ghi ở trên thông thường là không khác biệt đáng kể, $P > 0,05$.

Fig.4 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng của một phần trình tự của 16S rADN được khuếch đại từ chủng *Lactobacillus plantarum* I-UL4 và bốn chủng *Lactobacillus plantarum* khác được nộp lưu trong GenBank.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế này đề cập đến việc sử dụng các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ probiotic LAB làm chất bổ sung cho thức ăn cho các động vật nuôi trồng thủy sản. Cụ thể hơn, sáng chế này đề cập đến chất bổ sung cho cá có chất lượng được cải thiện, kháng lại các chủng vi khuẩn không mong muốn và quy trình sản xuất các chất chuyển hóa được trộn vào thức ăn cho cá.

Sáng chế này dựa vào nhận biết của các tác giả của sáng chế về sản phẩm thức ăn cho cá được làm giàu chất chuyển hóa có nguồn gốc từ probiotic LAB mà có khả năng làm tăng đáng kể sự đề kháng của cá được nuôi chống lại các vi sinh vật gây bệnh liên quan. Đã được chứng minh rằng việc sử dụng các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ các chủng LAB được phân lập từ thức ăn Malaysia, loài *Lactobacillus*, để cải thiện hiệu quả tăng trưởng, tính miễn dịch và sức khỏe chung của động vật thủy sản;

để kiểm soát các tác nhân gây bệnh ở đường dạ dày ruột bao gồm các tác nhân gây bệnh ở đường dạ dày ruột kháng lại kháng sinh và các bệnh có liên quan của chúng bằng cách làm giảm tỷ lệ xâm nhập và độ nghiêm trọng của các ảnh hưởng sinh lý có hại do sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh kháng lại kháng sinh.

Do đó, sáng chế đề cập đến sản phẩm thức ăn cho cá theo điểm yêu cầu bảo hộ 1. Không bị giới hạn trong lý thuyết, đã được cho rằng các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ probiotic LAB có khả năng làm tăng đáng kể lượng kháng thể ở động vật thủy sản chống lại các vi sinh vật gây bệnh. Sự tăng cường của sản xuất kháng thể làm cho động vật thủy sản đề kháng chống lại tốt hơn với vi sinh vật gây bệnh. Xem ví dụ thực hiện trong bản mô tả này để chi tiết hơn. Được cho rằng là lần đầu tiên chứng minh được rằng các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ probiotic LAB mang lại tác dụng tích cực thông qua việc đánh giá hiệu quả tăng trưởng, tỷ lệ sống sót và tác động bất lợi của tác nhân gây bệnh trong động vật nuôi trồng thủy sản như cá.

Một ưu điểm nữa của sản phẩm thức ăn chứa chất chuyển hóa có nguồn gốc từ probiotic LAB là cải thiện làm gia tăng thêm trọng lượng tăng trưởng và độ dài tăng trưởng của động vật thủy sản. Xem các ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây để biết thêm chi tiết.

Định nghĩa

Trước khi thảo luận về các phương án chi tiết của sáng chế này, phần định nghĩa về các thuật ngữ đặc biệt có liên quan đến các khía cạnh chính của sáng chế được đưa ra.

Thuật ngữ thức ăn hoặc chế phẩm thức ăn nghĩa là hợp chất bất kỳ, dạng chế phẩm, hỗn hợp, hoặc chế phẩm thích hợp để, hoặc dự định để cho động vật ăn vào.

Thuật ngữ "ngành nuôi trồng thủy sản" nên được hiểu theo lĩnh vực này như là việc nuôi các động vật thủy sản ở dưới nước trong đó các động vật thủy sản được nuôi trong các không gian được xác định về mặt vật lý, ví dụ là trong lồng hoặc bể.

Thuật ngữ "probiotic" là thuật ngữ được biết đến nhiều và đề cập đến vi sinh vật mà được tiếp xúc về mặt vật lý (ví dụ, khi được ăn vào) với động vật thủy sản thì nó tạo ra các lợi ích về sức khỏe cho động vật.

Phương pháp tốt nhất để thực hiện sáng chế này

Trước khi mô tả tiếp sáng chế này, nên hiểu rằng sáng chế này không bị giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả, thí dụ tất nhiên là có thể thay đổi. Cũng nên hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ có mục đích là để mô tả các phương án cụ thể, và không nhằm giới hạn sáng chế, bởi vì phạm vi của sáng chế này sẽ được giới hạn bằng yêu cầu bảo hộ kèm theo. Khi đưa ra một khoảng giá trị, nên hiểu rằng mỗi giá trị ở giữa đến một phần mười của giới hạn dưới trừ khi được chỉ ra rõ ràng khác là từ giới hạn trên đến giới hạn dưới của khoảng này và giá trị được nêu khác bất kỳ, hoặc giá trị ở giữa của khoảng được nêu đó, đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Các giới hạn trên và dưới của các khoảng nhỏ hơn này có thể được bao gồm độc lập trong các khoảng nhỏ hơn, và cũng được bao gồm trong sáng chế, tùy theo giới hạn loại trừ cụ thể trong khoảng được nêu ra. Khi khoảng được nêu bao gồm một hoặc cả hai giới hạn, thì các khoảng không bao gồm một hoặc cả hai giới hạn này cũng được nằm trong phạm vi của sáng chế.

Trừ khi được chỉ ra khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế này. Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây có thể cũng được sử dụng trong việc thực hành hoặc thí nghiệm sáng chế này, nhưng hiện tại các phương pháp và nguyên liệu ưu tiên được mô tả dưới đây. Tất cả các công bố được đề cập trong bản mô tả này được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn để bộc lộ và mô tả phương pháp và/hoặc nguyên liệu có liên quan với các công bố được viện dẫn này. Cần lưu ý rằng, như được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít bao gồm các dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ ra rõ ràng khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

i) Loài *Lactobacillus*, được phân lập từ bột sắn hột lên men (*tapai ubi*) được sử dụng trong nghiên cứu này. Các vi khuẩn này được thu từ bộ sưu tập của chúng tôi (phòng kỹ thuật xử lý sinh học, Đại học Putra Malaysia). Chúng LAB được giữ trong canh thang Man Rogosa Sharpe (MRS) ở -20°C . Chúng LAB được làm hồi lại hai lần trong canh thang MRS và được ủ kỵ khí ở 20°C - 40°C trước khi sản xuất chất chuyển hóa LAB. Dịch nuôi cấy qua đêm được tiêm vào canh thang MRS và được ủ kỵ khí qua đêm ở 20°C - 40°C . Chất chuyển hóa được thu thập bằng cách tách các tế bào vi khuẩn bằng quay ly tâm ở 8000 vòng trong 10 phút. Sau đó, chất chuyển hóa được giữ ở 4°C cho đến khi sử dụng. Chất chuyển hóa cũng được làm khô bằng cách phun sương sấy khô.

ii) Trong phương pháp khuếch tán trong lỗ thạch (Tagg và các đồng tác giả, 1976), 10 - 100 μl chất chuyển hóa LAB được nhỏ giọt vào lỗ thạch được đục lỗ trước. Dịch nổi trên bề mặt được cho khuếch tán trong một giờ. Sau đó, đĩa được phủ lên bằng thạch mềm được cấy sinh vật chỉ thị và được ủ ở 30°C - 40°C qua đêm. Sự ức chế được chứng minh bằng sự hình thành vùng trong xung quanh lỗ (**Fig.1**) của chất chuyển hóa UL4 chống lại sinh vật chỉ thị với đường kính trung bình tối thiểu là 1 cm.

iii) Thử nghiệm cho ăn được tiến hành trong 4 tuần. Hai nhóm thí nghiệm bao gồm một nhóm sử dụng chất chuyển hóa LAB (T1) và một nhóm không sử dụng chất chuyển hóa LAB (T2), mỗi nhóm được nhân lên ba lần tuân theo một thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên được thực hiện bằng việc sử dụng bể có kích cỡ giống nhau (dung tích 25L). Tổng số 48 cá rô, với thể trọng từ 17-18 g, được cho thích nghi với môi trường trong 2 tuần trước khi thử nghiệm.

iv) Chất chuyển hóa LAB được làm khô bằng phun sương được pha loãng theo lượng được xác định trước mà tạo ra hoạt tính bacteriocin cao nhất. Dưới các điều kiện vô trùng, sau đó bột được pha loãng được đưa vào thức ăn có bán sẵn trên thị trường. Khối lượng được yêu cầu này được phun nhẹ nhàng vào thức ăn và trộn chậm. Cá được cho ăn chỉ với thức ăn có bán sẵn trên thị trường được dùng làm đối chứng. Cá được cho ăn tùy ý hai lần hàng ngày. Tất cả các con cá được cân mỗi tuần để đánh giá hiệu quả tăng trưởng dưới dạng trọng lượng tăng thêm, tỷ lệ tăng trưởng cụ thể (SGR)

và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (feed conversion ratio - FCR). Sự hấp thu thức ăn được ghi chép lại hàng ngày (**Bảng 1**). Trọng lượng cơ thể tăng cao hơn đáng kể ($P < 0,05$) trong T1 so với đối chứng cũng là xu hướng tương tự được thấy đối với tỷ lệ tăng trưởng cụ thể, trong đó tỷ lệ tăng trưởng cho nhóm T1 là có ý nghĩa thống kê. T1 cũng có FCR thấp nhất, chỉ ra rằng cá được cho ăn với chất chuyển hóa LAB có khả năng chuyển hóa thức ăn vào mô của cá hiệu quả.

Bảng 1: Hiệu quả tăng trưởng của cá được cho ăn với chất chuyển hóa LAB

Thông số	T1	T2
trọng lượng tăng thêm (g)	$7,7^a \pm 0,01$	$5,5^b \pm 0,01$
tỷ lệ tăng trưởng cụ thể (% trên ngày)	$1,35^a \pm 0,01$	$1,01^b \pm 0,01$
FCR (tỷ lệ chuyển hóa thức ăn)	$1,63^a \pm 0,05$	$1,89^b \pm 0,01$

Ghi chú: T1, chất chuyển hóa LAB; T2, đối chứng $\pm$ chỉ ra sai số chuẩn). Các giá trị trong cùng một hàng và thí nghiệm có chữ ghi ở trên thông thường là khác biệt không đáng kể, $P > 0,05$.

Đối với nghiên cứu miễn dịch học, máu được lấy từ tĩnh mạch đuôi của cá rô được gây mê mỗi tuần. Máu được bảo quản qua đêm ở 4°C và huyết thanh được thu thập bằng quay ly tâm ở 1000 vòng trong 20 phút trước khi được bảo quản ở -80°C . Các mức kháng thể được xác định từ các cá được tạo miễn dịch bằng ELISA gián tiếp (Takemura, 1993). Các đĩa ELISA 96 lỗ được phủ qua đêm ở 4°C bằng chất chuyển hóa LAB với nồng độ của lượng được xác định trước mà tạo ra hoạt tính cao nhất là 100 μl dung dịch đệm phủ (15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH 9,6) trên một lỗ. Sau đó, các đĩa được rửa ba lần bằng nước muối đệm photphat chứa 0,05% (v/v) Tween-20 (PBS-T). Sau đó, lỗ được phong bế bằng 250 μl BSA 1% (w/v) trong PBS trên một lỗ trong 2 giờ ở 22°C . Sau khi rửa ba lần bằng PBS-T, thêm huyết thanh cá rô được pha

loãng với tỷ lệ 1:4 trong PBS (100 μ l trên một lỗ) vào và ủ trong 3 giờ ở 22°C. Sau khi rửa ba lần bằng PBS-T, các đĩa được thêm 100 μ l IgM kháng cá rô liên hợp với củ cải ngựa (1:54) (Aquatic Diagnostics Ltd) trên mỗi lỗ và ủ trong 1 giờ ở 22°C. Sau khi rửa, phản ứng được tiến triển bằng việc thêm cơ chất tetramethylbenzidin dihydroclorua (TMB)/H₂O₂ vào và ủ thêm trong 10 phút ở 22°C. Phản ứng được hoàn thành bằng việc thêm 50 μ l H₂SO₄ 2M trên mỗi lỗ. Mật độ quang được đo ở 450nm bằng thiết bị đọc ELISA (Anthos Zenyth 340 Microplate Reader) (**Bảng 2**). Trong 4 tuần cho ăn với chất chuyển hóa LAB qua đường miệng, mức kháng thể trong huyết thanh cá tăng lên. Nhóm đối chứng đã cho thấy có đáp ứng yếu hoặc không có đáp ứng. Mức kháng thể tăng lên được phát hiện thấy ở tuần thứ hai 2 sau khi cá được cho ăn với chất chuyển hóa LAB qua đường miệng, và mức kháng thể đạt được tối đa ở tuần thứ ba. Tuy nhiên, mức kháng thể bị giảm nhẹ sau tuần thứ ba, nhưng cao hơn nhiều so với đối chứng.

Bảng 2: Việc sản xuất kháng thể trong cá rô được cho ăn với chất chuyển hóa LAB.

Tuần	OD _{450nm}	
	T1	T2
	0,25 ^a $\pm$ 0,00	
0	0,37 ^a $\pm$ 0,01	0,27 ^a $\pm$ 0,01
1	0,80 ^a $\pm$ 0,06	0,32 ^a $\pm$ 0,03
2	1,14 ^a $\pm$ 0,01	0,52 ^b $\pm$ 0,05

Ghi chú: T1, chất chuyển hóa LAB; T2; đối chứng $\pm$ sai số chuẩn chỉ ra.

Các giá trị trong cùng một hàng và thí nghiệm có chữ ghi ở trên thông thường là khác biệt không đáng kể, $P > 0,05$.

vi) Sau 4 tuần thử nghiệm việc cho ăn, mỗi nhóm được tiêm 0,1ml chứa chủng gây bệnh *Aeromonas hydrophila* với nồng độ 10⁸ CFU/ml. Tỷ lệ cá chết được ghi chép và được loại bỏ hàng ngày trong 10 ngày. Nguyên nhân chết được xác định bằng việc nuôi cấy thận của cá mắc bệnh vì *A. hydrophila*. Trong suốt thời kỳ thí nghiệm, cá được nuôi như thường lệ (**Fig.2**). Cá được gây miễn dịch với chất chuyển hóa LAB có

tỷ lệ bảo vệ 100% và không có tỷ lệ chết đã được ghi chép lại so với các nhóm đối chứng. Tỷ lệ sống trong T1 là có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với T2.

vii) Phân tích đường ruột tiêu hóa được thực hiện trên các mẫu bao gồm các ruột được cắt từ cá sống sót từ mỗi nhóm được điều trị. Sau đó, các mẫu được đồng nhất hóa với 1ml dung dịch nước muối vô khuẩn sử dụng máy đập mẫu vi sinh. Sau đó thực hiện pha loãng theo loạt 10 lần (từ 10^{-1} đến 10^{-8}) trong ba mẫu và 100 μ l dung dịch pha loãng thích hợp được phủ lên trên thạch xanh metylen eozin (Eosin Methylene Blue - EMB), thạch đỏ phenol tinh bột glutamat (Glutamate Starch Phenol - GSP) và thạch de Man, Rogosa và Sharp (MRS) cho chủng vi khuẩn Enterobacteriaceae, *A. hydrophila* và lượng LAB tương ứng. Các đĩa được ủ qua đêm ở 30°C cho đến khi các khuẩn lạc có thể nhìn thấy (**Fig.3**). Lượng vi khuẩn Enterobacteriaceae và *A. hydrophila* có thể sống được trong T1 thấp hơn so với trong T2. Trong khi, lượng LAB trong T1 cao nhất và trong T2 là thấp nhất.

viii) Thực phẩm cho cá được sản xuất theo cách tương ứng với Ví dụ ở trên và hỗn hợp thu được trong chế phẩm dưới đây tính theo phần trăm trọng lượng của hỗn hợp (Bảng 3):

Bảng 3: Phần trăm chế phẩm của khẩu phần ăn của cá

Thành phần	%
Protein thô	30 – 40
Chất béo thô	3 - 5
Chất ẩm	10-12
Bột chất chuyển hóa	0,1 – 0,5

Danh mục trình tự

<110> Universiti Putra Malaysia

<120> SẢN PHẨM THỨC ĂN CHO CÁ CHỨA CHẤT CHUYỂN HÓA CÓ
NGUỒN GỐC TỪ CHỦNG PROBIOTIC

<130> SK/PCT0017/UPM/09

<160> 5

<170> Phiên bản patentln 3.4

<210> 1

<211> 562

<212> ADN

<213> *Lactobacillus plantarum*

<220>

<221> dấu hiệu hỗn tạp

<223> Chủng *Lactobacillus plantarum* I-UL4

<400> 1

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact	60
ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct	120
aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggctatcac	180
ttttggatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggg 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 tcaggatttg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag	480
cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg	540
caggcggttt ttaagtctg at	562

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sản phẩm thức ăn cho cá chứa chủng vi khuẩn probiotic, trong đó chủng vi khuẩn là chủng *Lactobacillus plantarum* I-UL4 và được nộp lưu dưới số truy nhập 36838 ở BIOTEC Culture Collection, để sử dụng trong việc làm giảm lượng *A. hydrophila* trong phân cá.
2. Sản phẩm thức ăn cho cá theo điểm 1, trong đó thức ăn cho cá chứa các chất chuyển hóa được tạo ra từ chủng *Lactobacillus plantarum* I-UL4.
3. Sản phẩm thức ăn cho cá theo điểm 2, trong đó các chất chuyển hóa bao gồm các bacterioxin, vitamin B và các axit hữu cơ, như axit formic, axit axetic và axit lactic.
4. Sản phẩm thức ăn cho cá theo điểm 1, trong đó thức ăn cho cá chứa các chất chuyển hóa với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,5% trọng lượng khô.
5. Sản phẩm thức ăn cho cá theo các điểm từ 2 - 4, trong đó các chất chuyển hóa được sử dụng làm chất phụ gia hoặc chất bổ sung vào thức ăn.
6. Sản phẩm thức ăn cho cá theo điểm 1, trong đó thức ăn cho cá có khả năng tạo ra sự gia tăng tăng trưởng của động vật từ 20% đến 50% và có khả năng làm gia tăng tỷ lệ sống ít nhất là 80%.
7. Sản phẩm thức ăn cho cá theo điểm 1, trong đó thức ăn cho cá có khả năng làm giảm lượng vi khuẩn enterobacteriaceae và *A. hydrophila* trong phân cá và gia tăng lượng LAB trong phân cá.

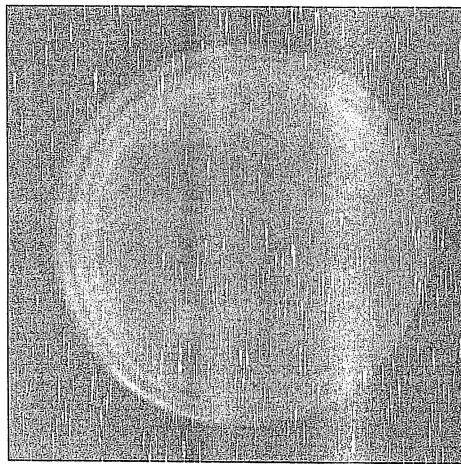


Fig. 1. Thử nghiệm khuếch tán chất chuyển hóa LAB chống lại *Aeromonas hydrophila* trong lỗ thạch

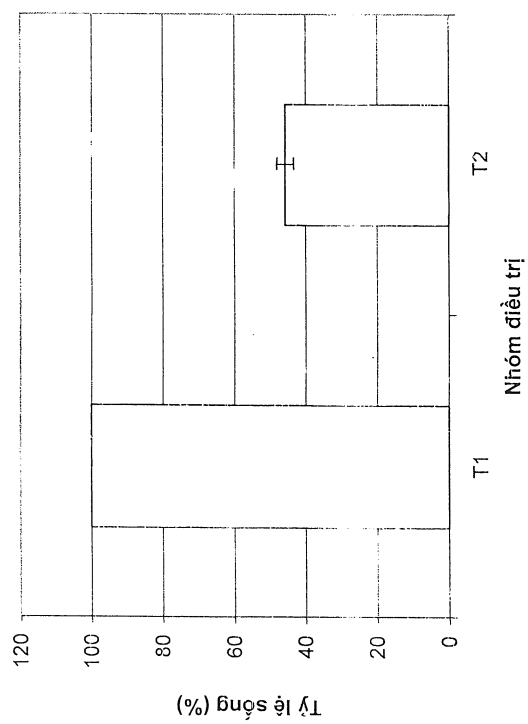


Fig. 2. Tác dụng của chất chuyển hóa LAB trên tỷ lệ sống của tilapia sau khi được thử thách với *Aeromonas hydrophila*

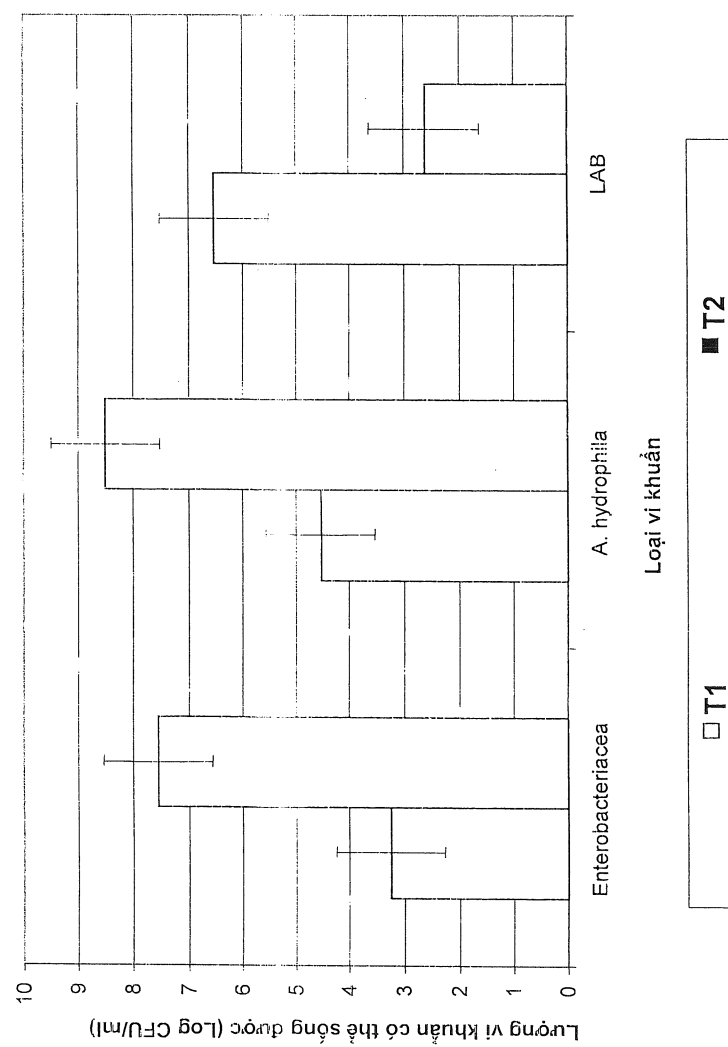


Fig. 3. Lượng vi khuẩn có thể sống được trong đường tiêu hóa của cá được nuôi với và không có chất chuyển hóa LAB.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
UL4	ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAACCGGGGGATAACACCTGGA										
AB112083	A.....										
D79210											
EF536363											
NC004567											
	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
UL4	AACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGCGGTATTAGCTAGATGGTGGGGT										
AB112083	T.....										
D79210											
EF536363											
NC004567											
	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
UL4	AACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA										
AB112083											
D79210											
EF536363											
NC004567											
	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
UL4	CAATGG-ACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATACTGAGAGTAAGTGTTCAGGTATT										
AB112083											
D79210											
EF536363	G.....										
NC004567											
	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
UL4	GACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCCGGATTATTGGCCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGT										
AB112083	G.....										
D79210	G.....										
EF536363	G.....										
NC004567	G.....										
	560										
UL4	TTTTTAAGTCTGAT										
AB112083											
D79210											
EF536363											
NC004567											

Fig. 4 Sự xấp hàng của một phần chuỗi 16S rADN được khuếch đại từ chủng *Lactobacillus plantarum* I-UL4 và bốn chủng khác *Lactobacillus plantarum* được ký gửi ở GenBank.