



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0031967

(51)⁸ A23K 20/142; A23K 10/00

(13) B

(21) 1-2017-03767

(22) 15/03/2016

(86) PCT/KR2016/002586 15/03/2016

(87) WO2016/148488 22/09/2016

(30) 10-2015-0036260 16/03/2015 KR

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/12/2017 357A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) HEO, In Kyung (KR); SON, Sung Kwang (KR); CHOI, Jin Geun (KR); KIM, So Young (KR); SHIN, Yong Uk (KR); LEE, Jae Hee (KR); SUNG, Jin Woo (KR); LEE, Youn Jae (KR); RIM, Jin Seong (KR); JUNG, Jun Young (KR).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM PHỤ GIA THỨC ĂN CHĂN NUÔI VÀ CHẾ PHẨM THỨC ĂN CHĂN NUÔI CHỨA CHẾ PHẨM PHỤ GIA NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có hàm lượng L-methionin cao, và chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi này. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa 60 đến 99,9% khối lượng L-methionin cùng với L-phenylalanin và L-tyrosin, và đề cập đến chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi và chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Methionin là axit amin thiết yếu đối với động vật có vú, và được sử dụng làm nguyên liệu thô để sản xuất thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thực phẩm, dung dịch pha truyền được phẩm và thuốc, v.v.. Methionin có thể được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc phương pháp tổng hợp sinh học.

Trong phương pháp tổng hợp hóa học methionin, D, L-methionin được sản xuất chủ yếu bằng cách thủy phân 5-(β -methylmercaptoethyl)-hydantoin).

Là ví dụ về phương pháp tổng hợp sinh học, patent Mỹ số 7745195 B2 bộc lộ phương pháp trong đó các vi sinh vật thu được bằng cách đột biến cystathionin synthaza trực tiếp sản xuất ra homoxystein hoặc methionin sử dụng H_2S hoặc CH_3SH mà không sử dụng xystein. Ngoài ra, patent Hàn Quốc số 10-0905381 đã bộc lộ quy trình hai bước mà bao gồm bước sản xuất tiền chất L-methionin bằng quy trình lên men vi sinh và bước sản xuất L-methionin bằng phản ứng chuyển hóa nhờ enzym sử dụng tiền chất L-methionin đã được sản xuất làm cơ chất.

Methionin được sản xuất bằng phương pháp hóa học thông thường tồn tại dưới dạng hỗn hợp của D-methionin và L-methionin, và do đó cần phải có quy trình tinh chế tốn kém bổ sung để tách một mình L-methionin ra khỏi hỗn hợp. Trong khi đó, methionin mà được sản xuất trực tiếp bằng các vi sinh vật thông qua phương pháp tổng hợp sinh học có ưu điểm là tồn tại ở dạng L của methionin, nhưng lại có nhược điểm ở chỗ nó được sản xuất với lượng rất nhỏ, khó sản xuất trên quy mô lớn bằng cách lên men, và cũng khó thu được sản phẩm đồng đều bằng cách lên men. Vì lý do này, các chất phụ gia thức ăn chăn nuôi không đắt đỏ thông thường không thể chứa L-methionin làm thành phần chính.

Các tài liệu về tình trạng kỹ thuật

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: US 7745195 B2 (công bố vào ngày 29/06/2010);

Tài liệu sáng chế 2: KR 10-0905381 B1 (công bố vào ngày 30/06/2009).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Do đó, các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu kỹ lưỡng để khắc phục các vấn đề nêu trên, và kết quả là, đã thu được lượng lớn L-methionin bằng cách sản xuất tiền chất L-methionin thông qua quá trình lên men vi sinh và chuyển hóa tiền chất L-methionin thành L-methionin bằng phản ứng enzym. Sau đó, các tác giả sáng chế đã phát triển quy trình tinh chế sản phẩm phản ứng enzym, và đã phát hiện ra rằng quy trình tinh chế được phát triển giúp có thể thu được chế phẩm có chất lượng đồng đều và hàm lượng L-methionin cao và chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm này thể hiện hiệu quả tuyệt vời trên động vật, nhờ đó đã hoàn thiện sáng chế.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có hàm lượng L-methionin cao.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Giải pháp kỹ thuật

Để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa 60 đến 99,90% khối lượng L-methionin, 0,05 đến 5% khối lượng L-phenylalanin và 0,01 đến 3% khối lượng L-tyrosin.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, lượng lớn L-methionin được tạo ra bằng cách sản xuất tiền chất L-methionin thông qua việc lên men vi sinh và chuyển hóa tiền chất L-methionin thành L-

methionin bằng phản ứng enzym, và kết tinh L-methionin sản xuất được. Do đó, thuận lợi là sáng chế đề xuất chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có hàm lượng L-methionin cao, điều này có thể cải thiện dinh dưỡng cho vật nuôi so với các chất phụ gia thức ăn chăn nuôi thông thường, và đề xuất chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có hàm lượng L-methionin cao.

Chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao này có hàm lượng L-methionin gia tăng. Cụ thể là, chế phẩm này có thể chứa L-methionin, L-phenylalanin và L-tyrosin. Ngoài ra, chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao này có thể còn chứa một hoặc nhiều thành phần dinh dưỡng bổ sung ngoài L-methionin, L-phenylalanin và L-tyrosin. Ở đây, các thành phần dinh dưỡng có thể gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin khác (ngoài L-methionin, L-phenylalanin và L-tyrosin), axetat, và ion.

Theo sáng chế, chế phẩm này có thể được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ mà giúp cho chế phẩm chứa lượng lớn L-methionin. Ví dụ, chế phẩm này có thể được sản xuất bằng cách sản xuất L-methionin theo phương pháp sản xuất L-methionin bao gồm quy trình hai bước được bộc lộ trong các sáng chế trong lĩnh vực này, và kết tinh L-methionin sản xuất được, nhưng không chỉ giới hạn ở cách này.

Cụ thể là, phương pháp sản xuất L-methionin gồm quy trình hai bước được bộc lộ trong các patent Hàn Quốc số 10-0905381, 10-0905381, 10-1136289, 10-1117012, 10-1200179, 10-1250651 và các patent tương tự, toàn bộ nội dung của chúng được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Cụ thể hơn là, phương pháp sản xuất L-methionin bao gồm quy trình hai bước gồm các bước sau: (1) nuôi cấy chủng sản xuất tiền chất L-methionin trong môi trường để sản xuất tiền chất L-methionin; và (2) bổ sung kháng nguyên vào tiền chất L-methionin được sản xuất trong bước (1), sau đó là phản ứng enzym để sản xuất L-methionin.

Đầu tiên, tiền chất L-methionin có thể được sản xuất bằng cách nuôi cấy vi sinh vật đột biến hoặc tái tổ hợp, vi sinh vật này có khả năng sản xuất tiền chất này, trong môi trường thích hợp. Cụ thể là, ví dụ về tiền chất L-methionin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, O-axylhomoserin, ví dụ, O-axetylhomoserin, O-sucxinylhomoserin, propionyl homoserin, axetoaxetyl homoserin, cumaroyl homoserin, malonyl homoserin, hydroxymethylglutaryl homoserin, hoặc pimelylhomoserin. Cụ thể hơn là, tiền chất L-methionin có thể là O-axetylhomoserin hoặc O-sucxinylhomoserin. Thậm chí cụ thể hơn nữa là, tiền chất L-methionin có thể là O-axetylhomoserin.

Quy trình nuôi cấy chủng sản xuất tiền chất L-methionin có thể được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp đã biết trong lĩnh vực này, và có thể dễ dàng được điều chỉnh theo loại chủng được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ về phương pháp nuôi cấy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nuôi cấy gián đoạn, nuôi cấy cấp liệu gián đoạn và nuôi cấy liên tục. Nhiều phương pháp nuôi cấy đã được bộc lộ trong bài báo, ví dụ, "Biochemical Engineering" của James M. Lee, trong ấn phẩm Prentice-Hall International Editions, pp 138-176.

Môi trường phải đáp ứng một cách thích hợp các yêu cầu đối với chủng cụ thể. Nhiều môi trường nuôi cấy vi sinh đã được bộc lộ, ví dụ, trong ấn phẩm "Manual of Methods for General Bacteriology" của American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981. Môi trường nuôi cấy có thể chứa các nguồn cacbon, các nguồn nitơ, và các nguyên tố vi lượng khác nhau. Ví dụ về các nguồn cacbon bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hydrat cacbon như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza; các chất béo như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, và dầu dừa; các axit béo như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; các rượu như glyxerol và etanol; và các axit hữu cơ như axit axetic. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng một mình hoặc dưới dạng kết hợp. Ví dụ về các nguồn nitơ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nguồn nitơ hữu cơ như pepton, chất chiết nấm men, nước thịt, chất chiết mạch nha, dịch chiết ngô (corn steep liquor - CSL), và bột đậu; và các nguồn nitơ vô cơ như ure, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni

carbonat, và amoni nitrat. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng một mình hoặc dưới dạng kết hợp. Môi trường có thể còn chứa, làm nguồn phosphat, kali dihydro phosphat, dikali hydro phosphat và các muối chứa natri tương ứng, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Hơn nữa, môi trường có thể chứa muối kim loại như, nhưng không chỉ giới hạn ở, magie sulfat hoặc sắt sulfat. Ngoài ra, các axit amin, các vitamin và các tiền chất thích hợp có thể được bổ sung vào môi trường, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Các môi trường hoặc các tiền chất này có thể được bổ sung vào theo từng mẻ hoặc theo cách liên tục.

Trong quá trình nuôi cấy, các hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, và axit sulfuric có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy theo cách thích hợp để điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy. Hơn nữa, trong quá trình nuôi cấy, chất khử bọt như este polyglycol của axit béo có thể được sử dụng để ức chế sự tạo ra bọt. Ngoài ra, để duy trì môi trường nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí, oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ, không khí) có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy.

Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy thường là từ 20 đến 45 °C, tốt hơn là từ 25 đến 40 °C. Thời gian nuôi cấy có thể được tiếp tục cho đến khi sự sản xuất tiền chất L-methionin đạt đến mức mong muốn. Thời gian nuôi cấy tốt hơn là từ 10 đến 160 giờ, và tốt hơn nữa là từ 15 đến 80 giờ.

Tiếp theo, L-methionin và axit hữu cơ có thể được sản xuất bằng phản ứng chuyển hóa enzym sử dụng tiền chất L-methionin, được sản xuất ra bởi chủng sản xuất tiền chất L-methionin, nguồn lưu huỳnh làm cơ chất, và sử dụng enzym chuyển hóa hoặc chủng chứa enzym chuyển hóa. Enzym chuyển hóa có thể là enzym mà sử dụng nguồn lưu huỳnh làm cơ chất. Cụ thể là, enzym chuyển hóa có thể là enzym có hoạt tính cystathionin synthaza, hoạt tính O-succinylhomoserin sulfhydrylaza hoặc hoạt tính O-axetylhomoserin sulfhydrylaza. Cụ thể hơn là, enzym chuyển hóa có thể là enzym có hoạt tính O-axetylhomoserin sulfhydrylaza. Nguồn lưu huỳnh có thể là nguyên liệu mà cung cấp nguyên tố lưu huỳnh. Cụ thể là, nguồn lưu huỳnh có thể là metyl mercaptan hoặc muối của nó. Cụ thể hơn là, nguồn lưu huỳnh có thể là metyl mercaptan.

Theo một phương án, L-methionin có thể được sản xuất bằng phản ứng enzym sử dụng O-succinylhomoserin hoặc O-axetylhomoserin, được tích tụ bằng sự lên men vi sinh, nguồn lưu huỳnh (như methyl mercaptan) làm cơ chất, và sử dụng enzym như cystathionin gamma synthaza, O-succinylhomoserin sulfhydrylaza hoặc O-axetylhomoserin sulfhydrylaza. Cụ thể là, L-methionin và axetat có thể được sản xuất bằng cách sử dụng O-axetylhomoserin và methyl mercaptan làm cơ chất và sử dụng O-axetylhomoserin sulfhydrylaza.

Các trình tự của các gen mã hóa các enzym có hoạt tính này là dễ dàng có được từ các cơ sở dữ liệu như National Center for Biotechnology (NCBI) và Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

L-methionin được sản xuất bằng phương pháp mô tả trên đây có thể được tách và tinh chế bằng cách kết tinh, nhờ đó tạo ra chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao theo sáng chế.

Cụ thể là, phương pháp kết tinh L-methionin có thể gồm các bước:

a) cô dung dịch phản ứng chứa methionin, tách các tinh thể methionin ra khỏi dung dịch đã cô, và sau đó thu hồi nước cái; và

b) sản xuất các hạt từ các tinh thể methionin đã được tách dưới dạng mầm tinh thể, và làm khô các hạt được tạo ra để thu được bột methionin.

Theo phương án cải biến phương pháp kết tinh, nước cái được tách ra trong bước a) được:

a-1) cô, kết tinh, và trộn với các tinh thể methionin được tách ra trong bước b), sau đó rửa và làm khô; hoặc

a-2) cô, kết tinh, hòa tan và sau đó được bổ sung vào dung dịch phản ứng chứa methionin khác.

Ngoài ra, phương pháp kết tinh có thể còn bao gồm, trước bước a), bước điều chỉnh dung dịch phản ứng chứa methionin đến độ pH bằng 4,0 đến 5,5, và có thể còn bao gồm, sau bước điều chỉnh độ pH, bước lọc hỗn hợp phản ứng chứa methionin qua cacbon hoạt tính.

Theo một phương án, để thu được chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao theo sáng chế, dung dịch phản ứng chứa L-methionin, thu được bằng phản ứng chuyển hóa nhờ

enzym, được cô cho đến khi nồng độ methionin trong dung dịch phản ứng đạt đến 150 đến 200 g/L. Cách khác, dung dịch phản ứng chứa L-methionin được chuẩn độ đến độ pH bằng 4,0 đến 5,5 bằng cách bổ sung axit sulfuric, và sau đó cô. Sau khi cô, các tinh thể methionin được tách ra bằng cách sử dụng thiết bị tách tinh thể, và nước cái (mother liquor - ML) còn lại được thu hồi. Các tinh thể methionin được tách ra được sử dụng làm mầm tinh thể, và nước cái được phun và làm khô trên các mầm tinh thể trong thiết bị tạo hạt để tạo ra bột, nhờ đó thu được chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao. Hàm lượng L-methionin trong chế phẩm chứa L-methionin thu được theo cách này có thể khoảng từ 60 đến 70% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Theo phương án khác, để thu được chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao theo sáng chế, dung dịch phản ứng chứa L-methionin, thu được bằng phản ứng chuyển hóa nhờ enzym, được cô cho đến khi nồng độ methionin trong dung dịch phản ứng đạt đến 150 đến 200 g/L. Cách khác, dung dịch phản ứng chứa L-methionin được chuẩn độ đến độ pH bằng 4,0 đến 5,5 bằng cách bổ sung axit sulfuric, và sau đó cô. Sau khi cô, các tinh thể sơ cấp được tách ra khỏi dung dịch được cô bằng thiết bị tách tinh thể, và nước cái còn lại được thu hồi. Nước cái thu hồi được cô cho đến khi nồng độ methionin trong đó đạt đến 150 đến 200 g/L, và các tinh thể thứ cấp được tách ra từ nước cái được cô. Các tinh thể sơ cấp và các tinh thể thứ cấp thu được được trộn với nhau, rửa và làm khô, nhờ đó thu được chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao. Hàm lượng L-methionin trong chế phẩm chứa L-methionin thu được theo cách này có thể khoảng từ 80 đến 95% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Theo phương án khác nữa, để thu được chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao theo sáng chế, dung dịch phản ứng chứa L-methionin, thu được bằng phản ứng chuyển hóa nhờ enzym, được chuẩn độ đến độ pH bằng 4,0 đến 5,5 bằng cách bổ sung axit sulfuric. Sau đó, cacbon hoạt tính được bổ sung vào dung dịch phản ứng với lượng từ 0,5 đến 2% khối lượng tính trên khối lượng của methionin, và hỗn hợp được khuấy ở 50 °C trong 1 đến 2 giờ, và sau đó được lọc để loại bỏ cacbon hoạt tính và các tạp chất. Dịch lọc được cô cho đến khi

nồng độ của methionin trong đó đạt đến 150 đến 200 g/L. Các tinh thể methionin sơ cấp được tách ra từ dịch lọc được cô bằng thiết bị tách tinh thể. Nước cái còn lại được cô lại cho đến khi nồng độ của methionin trong đó đạt đến 150 đến 200 g/L, nhờ đó thu được các tinh thể thứ cấp. Các tinh thể thứ cấp thu được được hòa tan và bổ sung vào dung dịch phản ứng chứa L-methionin khác, nhờ đó thu được chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao. Hàm lượng L-methionin trong chế phẩm chứa L-methionin thu được theo cách này có thể khoảng từ 95 đến 99,90% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Hàm lượng L-methionin trong chế phẩm theo sáng chế, thu được bằng cách tách và tinh chế như được mô tả trên đây, có thể là từ 60% khối lượng đến 99,90% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm. Theo một phương án, chế phẩm có thể chứa khoảng 60% khối lượng đến 70% khối lượng L-methionin. Theo phương án khác, chế phẩm có thể chứa khoảng 80% khối lượng đến 95% khối lượng L-methionin. Theo phương án khác nữa, chế phẩm có thể chứa khoảng 95% khối lượng đến 99,90% khối lượng L-methionin.

Cụ thể là, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có hàm lượng L-methionin cao, thu được bằng phương pháp tinh chế như nêu trên, có thể chứa 60 đến 99,90% khối lượng L-methionin, 0,05 đến 5% khối lượng L-phenylalanin và 0,01 đến 3% khối lượng L-tyrosin.

Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có hàm lượng L-methionin cao có thể còn chứa 0,01 đến 13% khối lượng các axit amin khác ngoài L-methionin, L-phenylalanin và L-tyrosin, trong đó các axit amin khác này có thể là một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm glutamat, homoserin, và O-axetylhomoserin.

Hàm lượng glutamat trong chế phẩm có thể là từ 0,01 đến 11% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Hàm lượng homoserin trong chế phẩm có thể là từ 0,01 đến 1% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Hàm lượng của O-axetylhomoserin trong chế phẩm có thể là từ 0,01 đến 1% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Hơn nữa, chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao này có thể còn chứa 0,01 đến 20%

khối lượng ion.

Ngoài ra, chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao này có thể còn chứa axetat với lượng lớn hơn 0% khối lượng nhưng nhỏ hơn 2% khối lượng.

Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có hàm lượng L-methionin cao theo sáng chế có thể thu được bằng cách tách và tinh chế L-methionin thông qua bước kết tinh như được mô tả trên đây, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Mặc dù không được mô tả trên đây, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể còn chứa các thành phần dinh dưỡng khác.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Hàm lượng chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi trong chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và có thể được điều chỉnh đến mức thích hợp tùy thuộc vào loại, độ tuổi và tình trạng của con vật mà chế phẩm được cho sử dụng. Cụ thể là, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm thức ăn chăn nuôi.

Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có hàm lượng L-methionin cao theo sáng chế có thể được đưa vào chế phẩm thức ăn chăn nuôi thông thường, và có thể được cấp cho, ví dụ, gia súc, lợn, cừu, gia cầm và các loài tương tự. Đối với việc này, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được trộn với các thành phần thức ăn chăn nuôi thông thường, và có thể, nếu cần, được phối chế thành dạng viên.

Các thành phần thức ăn chăn nuôi thông thường gồm, ví dụ, ngô, đại mạch, yến mạch, đậu nành, bột cá, cám, dầu đậu nành, các khoáng chất, các nguyên tố vi lượng, các axit amin, và các vitamin.

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với sự tham chiếu đến các ví dụ. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không được dự tính là để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sự lên men của chủng sản xuất tiền chất L-methionin

Trong ví dụ này, môi trường nuôi cấy trong thùng lên men được sử dụng để sản xuất tiền chất L-methionin. Để sản xuất lượng lớn tiền chất methionin (O-axetylhomoserin) sử dụng chủng E. coli KCCM-10568 (patent Hàn Quốc số 10-0905381), là chủng sản xuất O-axetylhomoserin, làm chủng sản xuất tiền chất methionin, môi trường nuôi cấy trong thùng lên men dung tích 5L được sử dụng. Cụ thể là, chủng này được cấy truyền lên môi trường đĩa LB chứa chất kháng sinh và được nuôi cấy qua đêm ở 31 °C. Sau đó, khuẩn lạc duy nhất được cấy truyền vào 10mL môi trường LB chứa chất kháng sinh và nuôi cấy ở 31 °C trong 5 giờ. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được pha loãng 100 lần trong bình Erlenmeyer dung tích 1000mL chứa 200mL môi trường giống tiền chất methionin, sau đó nuôi cấy ở điều kiện 31 °C và khuấy 200 vòng/phút trong thời gian 3 đến 10 giờ. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được cấy truyền vào thùng lên men dung tích 5L và nuôi cấy bằng phương pháp lên men cấp liệu gián đoạn trong thời gian 50 đến 100 giờ. Thành phần của môi trường lên men đối với môi trường nuôi cấy chính được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Thành phần của môi trường lên men để sản xuất tiền chất methionin

Thành phần	Môi trường giống	Môi trường chính	Môi trường cấp liệu
Glucosa (g/L)	10,1	40	600
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0,5	4,2	
Chất chiết nấm men (g/L)	10	3,2	
KH ₂ PO ₄	3	3	8
Amoni sulfat (g/L)		6,3	
NH ₄ Cl (g/L)	1		
NaCl (g/L)	0,5		
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (g/L)	5,07		
DL-Methionin (g/L)		0,5	0,5
L-Isoleucin (g/L)	0,05	0,5	0,5
L-Threonin (g/L)		0,5	0,5

Ví dụ 2: Phản ứng chuyển hóa methionin

Sản phẩm lên men được sản xuất trong ví dụ 1 được lọc bằng cách lọc qua màng để tách môi trường chứa O-axetylhomoserin ra khỏi tế bào. Chất lỏng mà đi qua màng 0,1µm, tức là, chất lỏng còn lại sau khi tách tế bào, được gọi là phần thấm qua, và bùn tế bào được gọi là phần giữ lại.

Nước khử ion được bổ sung vào phần giữ lại để thu hồi O-axetylhomoserin còn lại trong phần giữ lại.

Đối với phần thấm qua, methyl mercaptan và O-axetylhomoserin sulfhydrylaza hoặc O-axetylhomoserin sulfhydrylaza thu được từ *Rhodobacter sphaeroides* (Patent Hàn Quốc số 10-1250651) làm enzym để chuyển hóa thành L-methionin được bổ sung, sau đó là phản ứng chuyển hóa nhờ enzym sử dụng enzym có hoạt tính O-axetylhomoserin sulfhydrylaza hoặc chủng chứa enzym này.

Trong quá trình phản ứng, nồng độ của O-axetylhomoserin còn lại được đo, và phản ứng chuyển hóa nhờ enzym được thực hiện trong 6 giờ bằng cách cung cấp methyl mercaptan. Nếu nồng độ của O-axetylhomoserin không đo được, phản ứng được chấm dứt.

Ví dụ 3: Quy trình kết tinh L-methionin

Để thu được chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao, dung dịch phản ứng chứa methionin điều chế được trong ví dụ 2 được kết tinh. Sử dụng phương pháp kết tinh được mô tả trong ví dụ này, có thể thu được chế phẩm chứa methionin với lượng 60,00% khối lượng đến 99,90% khối lượng.

(1) Phương pháp kết tinh A

Dung dịch phản ứng chứa methionin thu được trong ví dụ 2 được cô cho đến khi nồng độ của methionin trong dung dịch phản ứng đạt đến 150 đến 200 g/L. Các tinh thể methionin được tách ra khỏi dung dịch đã được cô bằng thiết bị tách tinh thể, và nước cái (ML) còn lại được thu hồi. Các tinh thể methionin được tách ra được sử dụng làm mầm tinh thể, và nước cái được phun và làm khô trên các mầm tinh thể này trong thiết bị tạo hạt, nhờ đó thu được chế phẩm chứa methionin dạng bột.

Các thành phần và hàm lượng của chúng trong chế phẩm chứa methionin thu được theo phương pháp này được thể hiện trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Thành phần	Hàm lượng (% khối lượng)
L-Methionin	60-70
Axetat	0-1
Ion	13-19
Phenylalanin	0,05-4,5
Tyrosin	0,02-2,5
Glutamat	0,5-11
Homoserin	0,05-1
O-Axetylhomoserin	0,1-1

(2) Phương pháp kết tinh B

Dung dịch phản ứng chứa methionin thu được trong ví dụ 2 được cô hoặc được chuẩn độ đến độ pH bằng 4,0 đến 5,5 bằng cách bổ sung axit sulfuric và sau đó cô. Dung dịch phản ứng được cô cho đến khi nồng độ của methionin trong đó đạt đến 150 đến 200 g/L. Các tinh thể sơ cấp được tách ra bằng thiết bị tách tinh thể, và nước cái còn lại được thu hồi. Nước cái, mà từ đó các tinh thể sơ cấp đã được tách ra, được cô cho đến khi nồng độ của methionin trong đó đạt đến 150 đến 200 g/L, nhờ đó thu được các tinh thể thứ cấp. Các tinh thể sơ cấp và các tinh thể thứ cấp được trộn với nhau, rửa và làm khô, nhờ đó thu được chế phẩm chứa methionin dạng bột.

Các thành phần và hàm lượng của chúng trong chế phẩm chứa methionin thu được theo phương pháp này được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Thành phần	Hàm lượng (% khối lượng)
L-Methionin	80-95
Axetat	0-1

Ion	0,5-5,5
Phenylalanin	0,05-4
Tyrosin	0,01-2
Glutamat	0,05-5,5
Homoserin	0,05-1
O-Axetylhomoserin	0,1-1

(3) Phương pháp kết tinh B

Dung dịch phản ứng chứa methionin thu được trong ví dụ 2 được chuẩn độ đến độ pH bằng 4,0 đến 5,5 bằng cách bổ sung axit sulfuric. Sau đó, cacbon hoạt tính được bổ sung vào dung dịch phản ứng với lượng từ 0,5 đến 2% khối lượng tính trên khối lượng của methionin, và hỗn hợp được khuấy ở 50 °C trong 1 đến 2 giờ, và sau đó được lọc để loại bỏ cacbon hoạt tính và các tạp chất. Dịch lọc được cô cho đến khi nồng độ của methionin trong đó đạt đến 150 đến 200 g/L. Các tinh thể methionin được tách ra từ dịch lọc đã được cô bằng thiết bị tách tinh thể. Nước cái còn lại sau khi tách các tinh thể được cô lần nữa để thu các tinh thể thứ cấp. Các tinh thể thứ cấp thu được được hòa tan và bổ sung vào dung dịch phản ứng chứa L-methionin khác mà đã được chuẩn độ đến độ pH bằng 4,0 đến 5,5, sau đó dung dịch phản ứng thu được được đem thực hiện quy trình nêu trên.

Các thành phần và hàm lượng của chúng trong chế phẩm chứa methionin thu được theo phương pháp này được thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Thành phần	Hàm lượng (% khối lượng)
L-Methionin	95,00-99,90
Axetat	0-1
Ion	0,01-0,2
Phenylalanin	0,05-1
Tyrosin	0,01-1
Glutamat	0,01-1
Homoserin	0,01-0,8

O-Axetylhomoserin	0,0-0,5
-------------------	---------

Ví dụ 4: Kiểm tra tác dụng của chế phẩm chứa methionin

Để kiểm tra tác dụng của chế phẩm chứa methionin thu được trong ví dụ 3, thử nghiệm cho ăn được thực hiện. Trong ví dụ này, chế phẩm có hàm lượng L-methionin cao (dưới đây gọi là L-Met), thu được bằng phương pháp kết tinh C được mô tả trong ví dụ 3, được sử dụng. Để làm đối chứng, chế phẩm chứa D,L-methionin (được sản xuất bằng quy trình hóa học và có độ tinh khiết 99,99% hoặc cao hơn; dưới đây gọi là D,L-Met) được sử dụng.

(1) Tác dụng của chế phẩm chứa L-methionin trên gà mái thời kỳ đẻ trứng 25 tuần tuổi

Các con gà mái thời kỳ đẻ trứng được xử lý bằng một trong số L-Met và D,L-Met để kiểm tra tác dụng của chế phẩm chứa L-methionin đối với trứng.

Thiết kế thử nghiệm

- gà mái thời kỳ đẻ trứng 25 tuần tuổi;
- L-Met hoặc D,L-Met được bổ sung vào khẩu phần ăn cơ bản (basal diet - BD) với lượng 0,1% khối lượng và 0,2% khối lượng.

Bảng 5: Thành phần khẩu phần ăn cơ bản

Thành phần	Hàm lượng (%)
Ngô	50
Lúa mì	7
Cám lúa mì	3
Bột đậu tương	26
Các thành phần khác	14

Bảng 6: Kết quả

Đơn vị %	Tốc độ đẻ trứng (%)	Khối lượng quả trứng (g/quả trứng)	Khối lượng trứng (g/ngày/con gà)
----------	---------------------	------------------------------------	----------------------------------

BD		100,0	100,0	100,0
L-Met	0,1%	103,6	104,1	107,8
	0,2%	104,9	104,4	109,7
DL-Met	0,1%	101,9	102,7	104,6
	0,2%	104,6	102,7	107,4
Phần trăm đối với L-Met so với phần trăm đối với DL-Met	0,1%	101,6	101,3	103,1
	0,2%	100,3	101,7	102,1

Như có thể thấy từ kết quả trong bảng 6 trên đây, nhóm đối chứng được xử lý bằng D,L-Met và nhóm được xử lý bằng L-Met đều thể hiện tác dụng tốt hơn đối với trứng so với nhóm được xử lý bằng khẩu phần ăn cơ bản. Kết quả so sánh giữa nhóm được xử lý bằng L-Met và nhóm được xử lý bằng D,L-Met chỉ ra rằng tốc độ đẻ trứng và khối lượng trứng của nhóm được xử lý bằng L-Met gia tăng khoảng 1% và khối lượng trứng của nhóm được xử lý bằng L-Met gia tăng khoảng 2 đến 3%.

Điều này gợi ý rằng việc bổ sung L-Met tạo ra tác dụng tích cực cho gà mái thời kỳ đẻ trứng so với việc bổ sung D,L-Met.

(2) Tác dụng của chế phẩm chứa L-methionin ở lợn con

Để kiểm tra tác dụng của chế phẩm chứa L-methionin đối với lợn con, các con lợn con được xử lý bằng một trong số L-Met và D,L-Met, và sau đó mức tăng trọng trung bình hàng ngày được so sánh giữa nhóm được xử lý bằng L-Met và nhóm được xử lý bằng D,L-Met.

Thiết kế thử nghiệm

- Các con lợn con;
- L-Met hoặc D,L-Met được bổ sung vào khẩu phần ăn cơ bản (basal diet - BD) với lượng 0,05% khối lượng và 0,11% khối lượng.

Bảng 7: Thành phần khẩu phần ăn cơ bản

Thành phần	Hàm lượng (%)
------------	---------------

Ngô	60,7
SBM	3,0
Protein huyết tương	11,0
Bột whey	20,0
Mỡ	1,0
Cát	
Tinh bột ngô	0,5
Các thành phần khác	3,8

Bảng 8: Kết quả

ADG (kg/ngày)	Khẩu phần ăn cơ bản	DL-Met bổ sung (%)		L-Met bổ sung (%)	
		0,05	0,11	0,05	0,11
0-7 ngày	100,0	151,6	159,1	171,1	201,9
14-21 ngày	100,0	120,6	126,9	125,3	132,2

*ADG: mức tăng trọng trung bình hàng ngày (average daily gain).

Như có thể thấy từ kết quả trong bảng 8 trên đây, kết quả so sánh mức tăng trọng trung bình hàng ngày giữa nhóm lợn con được xử lý bằng khẩu phần ăn cơ bản và nhóm lợn con được xử lý bằng D,L-Met hoặc L-Met chỉ ra rằng mức tăng trọng trung bình hàng ngày gia tăng khoảng lên tới 60% trong nhóm được xử lý bằng D,L-Met và khoảng lên tới 100% ở nhóm được xử lý bằng L-Met. Hơn nữa, kết quả so sánh mức tăng trọng trung bình hàng ngày giữa nhóm được xử lý bằng D,L-Met và nhóm được xử lý bằng L-Met chỉ ra rằng mức tăng trọng trung bình hàng ngày của nhóm được xử lý bằng L-Met là cao hơn khoảng từ 5 đến 40% so với nhóm được xử lý bằng D,L-Met.

(3) Tác dụng của chế phẩm chứa L-methionin ở gà thịt

Để kiểm tra tác dụng của chế phẩm chứa L-methionin đối với gà thịt, các con gà thịt được xử lý bằng một trong số L-Met và D,L-Met, và sau đó tỷ số mức tăng trọng trên lượng thức ăn (tỷ số G: F) được so sánh giữa các con gà thịt.

Thiết kế thử nghiệm

- gà thịt 1 ngày tuổi (ross308);

- L-Met hoặc D,L-Met được bổ sung vào khẩu phần ăn cơ bản (basal diet - BD) với lượng 0,1% khối lượng, 0,2% khối lượng và 0,3% khối lượng.

Bảng 9: Thành phần khẩu phần ăn cơ bản

Thành phần	Hàm lượng (%)
Ngô vàng	59
Bột đậu tương	34
Các thành phần khác	7

Bảng 10: Kết quả

Tỷ số mức tăng trọng/lượng thức ăn	BD (%)	DL-Met bổ sung (%)			L-Met bổ sung (%)			Phần trăm đối với L-Met so với phần trăm đối với DL-Met		
		0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
0-7 ngày	100,0	102,0	101,2	102,0	102,8	106,1	106,1	100,8	104,8	104,0
7-14 ngày	100,0	111,9	112,7	114,1	113,9	114,8	115,8	101,8	101,9	101,5
14-21 ngày	100,0	116,1	118,1	118,6	116,7	122,1	124,7	100,6	103,4	105,2
0-21 ngày	100,0	112,8	113,9	114,7	113,9	117,4	119,2	101,0	103,1	103,9

Như có thể thấy từ kết quả trong bảng 10 trên đây, tỷ số mức tăng trọng trên lượng thức ăn gia tăng ở tất cả các nhóm được xử lý bằng hỗn hợp khẩu phần ăn cơ bản với L-Met hoặc DL-Met. Kết quả so sánh tỷ số mức tăng trọng trên lượng thức ăn giữa nhóm được xử lý bằng L-Met và nhóm được xử lý bằng D,L-Met chỉ ra rằng nhóm được xử lý bằng L-Met thể hiện sự gia tăng cao về tỷ số mức tăng trọng trên lượng thức ăn là 0,5% đến 5% trong suốt thời kỳ thử nghiệm, và cũng thể hiện sự gia tăng cao về tỷ số mức tăng trọng trên lượng thức ăn là khoảng 1 đến 4% thậm chí ở giai đoạn sau quá trình thử nghiệm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa L-methionin với lượng 60 đến 99,90% khối lượng, L-phenylalanin với lượng 0,05 đến 5% khối lượng và L-tyrosin với lượng 0,01 đến 3% khối lượng, nhưng không chứa metanol.
2. Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa các axit amin khác ngoài L-methionin, L-phenylalanin và L-tyrosin với lượng 0,01 đến 13% khối lượng.
3. Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 2, trong đó các axit amin khác này gồm glutamat, và hàm lượng glutamat trong chế phẩm là từ 0,01 đến 11% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm.
4. Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 2, trong đó các axit amin khác này gồm homoserin, và hàm lượng homoserin trong chế phẩm là từ 0,01 đến 1% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm.
5. Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 2, trong đó các axit amin khác này gồm O-axetylhomoserin, và hàm lượng O-axetylhomoserin trong chế phẩm là từ 0,01 đến 1% khối lượng tính trên tổng khối lượng của chế phẩm.
6. Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa ion với lượng 0,01 đến 20% khối lượng.
7. Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa axetat với lượng lớn hơn 0% khối lượng nhưng nhỏ hơn 2% khối lượng.
8. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.