



(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)



1-0032812

(51)⁷ A23K 1/00; A23K 1/18; A23K 1/165

(13) B

(21) 1-2015-00418

(22) 02/08/2013

(86) PCT/EP2013/066254 02/08/2013

(87) WO/2014/020141 06/02/2014

(30) 61/679,084 03/08/2012 US

(45) 25/08/2022 413

(43) 25/08/2015 329A

(73) DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (DK)

Langebrogade 1 P.O. Box 17 DK-1001 Copenhagen K Denmark

(72) ISAKSEN, Mai, Faurschou (DK); BERNARDEAU, Marion (FR); MILLÁN, Luis, Fernando, Romero (GB); KIARIE, Elijah, Gituanjah (US); ARENT, Susan, Lund (DK); NURMINEN, Päivi, Helena (FI); FORSSTEN, Sofia (FI); DAVIS, Mari, Ellen (US); PETRI, Daniel (US); GALBRAITH, Elizabeth, Ann (US).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) CHẾ PHẨM PHỤ GIA DÙNG TRONG THỨC ĂN, PHƯƠNG PHÁP CẢI THIẾN NĂNG SUẤT VÀ BỘ KIT CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn chứa vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM), trong tổ hợp với xylanaza (ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza) và β -glucanaza (và, tùy chọn, enzym phân giải chất xơ khác nữa), trong đó DFM được chọn từ nhóm chỉ bao gồm chủng sản xuất enzym; chủng lên men đường C5; chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn; chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ; hoặc các tổ hợp của chúng. Sáng chế cũng đề cập đến hỗn hợp trộn sẵn chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn và thức ăn chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi bao gồm trộn thành phần thức ăn với DMF, trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza và tùy ý enzym phân giải chất xơ khác nữa.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện các chế phẩm dùng trong thức ăn bằng cách sử dụng vi sinh vật được nuôi trực tiếp đặc hiệu trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza, và chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn chứa vi sinh vật được nuôi trực tiếp trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza này. Sáng chế còn đề cập đến các cách sử dụng và bộ kit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các enzym bổ sung được sử dụng làm chất phụ gia cho thức ăn động vật, đặc biệt là thức ăn cho lợn và gia cầm, như là một biện pháp nhằm cải thiện các đặc tính về sử dụng dưỡng chất và hiệu quả sản xuất. Đã có sẵn các hỗn hợp hòa trộn enzym dùng để cải thiện giá trị dinh dưỡng của các khẩu phần ăn chứa các hạt ngũ cốc, bột đậu tương, bột protein động vật, hoặc thực phẩm có lượng chất xơ cao và các sản phẩm phụ công nghiệp.

Khái niệm vi sinh vật được nuôi trực tiếp (direct fed microbial - DFM) liên quan đến việc cấp các vi sinh vật sống có lợi cho động vật như gà hoặc lợn, sao cho khi được dùng với lượng thích hợp sẽ mang lại lợi ích về sức khỏe cho vật chủ. Vi sinh vật có lợi là một thuật ngữ khác dùng cho loại chất phụ gia thức ăn này. Các vi sinh vật có lợi hoặc DFM đã thể hiện sự cải thiện năng suất động vật trong các nghiên cứu được kiểm soát. DFM bao gồm vi khuẩn được cấp trực tiếp và/hoặc các sản phẩm dựa trên cơ sở nấm men.

Mặc dù các tổ hợp của các DFM với một số enzym đã được dự tính, nhưng sự tương tác giữa các DFM và các enzym chưa được hiểu một cách hoàn toàn. Sáng chế đề cập đến các tổ hợp đặc hiệu mới mà bất ngờ cải thiện đáng kể các đặc tính về hiệu quả sản xuất của động vật.

Áp lực liên tục lên thị trường thức ăn ngũ cốc toàn cầu đã dẫn đến xu hướng trong các ngành công nghiệp chăn nuôi lợn và gia cầm là tìm kiếm các lựa chọn thành phần thay thế có hiệu quả về mặt chi phí như các đồng sản phẩm (các sản phẩm phụ) từ các ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học và xay xát. Tuy nhiên, đặc tính của các thành phần thay thế này là có hàm lượng cao polysaccharit không phải tinh bột (NSP;

chất xơ) mà có giá trị dinh dưỡng thấp đối với động vật không nhai lại vì chúng không tiêu hóa được, làm hạn chế sự hấp thu dưỡng chất của động vật và gây ảnh hưởng tiêu cực đến việc sử dụng năng lượng và dưỡng chất. Theo đó, việc ứng dụng thành công các thành phần xơ thay thế trong khẩu phần ăn của động vật có dạ dày một ngăn sẽ phụ thuộc vào khả năng của các công nghệ trong việc sử dụng hiệu quả năng lượng chứa trong chất xơ trong khẩu phần ăn, hạn chế các rủi ro liên quan đến các tính chất không liên quan đến đặc tính dinh dưỡng của chúng và các lợi ích kinh tế tiềm năng khi được phối chế đúng cách thành khẩu phần ăn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Phát hiện ban đầu của sáng chế là sự phân giải nguyên liệu trong khẩu phần ăn có nguồn gốc từ các hạt nằm trong thành tế bào thực vật mà có lượng polysacarit không phải tinh bột (NSP) cao bởi các xylanaza có thể được tối ưu hóa để cải thiện năng suất động vật khi kết hợp xylanaza và β -glucanaza với một hoặc nhiều hơn vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFMs) đặc hiệu được chọn lọc dựa trên khả năng của chúng trong việc tiêu hóa các hydrat cacbon cấu tạo thành tế bào thực vật và/hoặc khả năng của chúng trong việc sản xuất các axit béo chuỗi ngắn (short chain fatty acid - SCFA) từ các pentoza (ví dụ, các arabinoxylan) được chứa trong phân đoạn NSP của các thành phần trong điều kiện kỵ khí.

Lý do tại sao tổ hợp này lại cải thiện được năng suất là vì sự hòa tan của chất xơ, đặc biệt là hemixenluloza, từ khẩu phần ăn được tối đa hóa trong ống tiêu hóa (gastrointestinal tract - GIT) của động vật. Sự hòa tan của hemixenluloza này không phải là luôn đủ để làm tăng năng suất vì các đường C5 được giải phóng không phải là nguồn năng lượng hiệu quả cho động vật khi chúng được hấp thụ (Savory C., J. Br. J. Nut. 1992, 67: 103-114), nhưng chúng sẽ là nguồn năng lượng hiệu quả hơn khi được chuyển hóa thành các axit béo chuỗi ngắn (SCFA) bởi các vi sinh vật trong GIT hoặc bởi các DFM.

Do đó, giá trị năng lượng từ các sản phẩm thực vật (ví dụ, các đồng sản phẩm (các sản phẩm phụ) của lúa mì, ngô, yến mạch, lúa mạch và ngũ cốc hoặc khẩu phần ăn chứa hạt hỗn hợp mà dễ tiếp cận được đối với các động vật có dạ dày một ngăn) có thể được tối ưu hóa bằng cách kết hợp xylanaza và β -glucanaza và các DFM đặc hiệu mà có thể sản xuất các SCFA từ các pentoza có trong phân đoạn NSP trong điều kiện

ky khí hoặc có thể điều biến các quần thể vi sinh vật trong GIT để làm tăng sự sản xuất SCFA từ các đường được giải phóng. Các DFM có thể đáp ứng cơ chế chuyển hóa của chúng để làm tăng sự thủy phân chất xơ theo cách hiệp đồng trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza. Việc sử dụng các DFM với các enzym phân giải chất xơ có thể mang lại các lợi ích bổ sung và tối đa hóa lợi ích của các carbohydraza.

Các DFM đặc hiệu được chọn lọc dựa trên các hoạt tính enzym của chúng có thể được xem là chuỗi thức ăn vi khuẩn được điều khiển bởi glycan. Các DFM được chọn lọc một cách đặc hiệu được nêu trong bản mô tả này có thể ưu tiên sử dụng các chất xơ trong khẩu phần ăn, là một tính trạng cho phép chúng thực hiện các bước tiêu hóa glycan ban đầu để giải phóng các polysacarit ngắn hơn, dễ hòa tan hơn cho các vi khuẩn khác, ví dụ, các hệ vi sinh vật GIT nội sinh khác. Các DFM đặc hiệu được chọn lọc dựa trên sự chuyển hóa của chúng mà điều chỉnh theo các glycan được giải phóng bởi các enzym (ví dụ, xylanaza và β -glucanaza) để cải thiện hiệu quả của các enzym được nêu trong bản mô tả này và tổ hợp của (các) DFM so với việc sử dụng tổ hợp của các enzym riêng lẻ hoặc việc sử dụng (các) DFM riêng lẻ.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, trong sáng chế này, nguyên liệu trong khẩu phần ăn có nguồn gốc từ các hạt nằm trong thành tế bào thực vật mà giàu các glycan đặc hiệu nguồn, như xenluloza, hemixenluloza và pectin (nguyên liệu thực vật) hoặc các glycosaminoglycan đi vào ruột ngoại biên ở dạng hạt mà bị tấn công bởi các tác nhân phân giải glycan là các DFM đặc hiệu mà có khả năng gắn kết trực tiếp với các hạt không hòa tan này và tiêu hóa các thành phần glycan của chúng. Sau quá trình phân giải ban đầu các hạt chứa glycan này, các mảnh glycan dễ hòa tan hơn có thể được tiêu hóa bởi các tác nhân phân giải glycan thứ cấp có mặt trong manh tràng, mà góp phần giải phóng tập hợp sản phẩm lên men axit béo chuỗi ngắn (SCFA) mà có nguồn gốc từ cả hai loại tác nhân phân giải. Vì các SCFA bắt nguồn từ quá trình lên men hydrat cacbon và/hoặc quá trình lên men protein và quá trình loại nhóm amin bởi hệ vi sinh vật kỵ khí bản địa trong GIT, nên nồng độ SCFA có thể là chỉ số về quần thể sinh vật kỵ khí. SCFA có thể thực sự cung cấp nhiều lợi ích cho động vật chủ, đóng vai trò làm nhiên liệu chuyển hóa cho mô ruột non, cơ, thận, tim, gan và não, và còn tạo ra các tính chất kìm hãm vi khuẩn và diệt vi khuẩn chống lại các sinh vật như *Salmonella* và *E. coli*.

Giá trị dinh dưỡng của chất xơ trong các động vật không nhai lại có thể có nguồn gốc chủ yếu từ quá trình sản xuất các axit béo chuỗi ngắn (SCFA) thông qua quá trình lên men các chất xơ đã được hòa tan hoặc đã được phân giải bằng các enzym phân giải chất xơ có hiệu quả (ví dụ, xylanaza và β -glucanaza, thích hợp là trong tổ hợp với enzym phân giải chất xơ khác nữa). Việc cung cấp xylanaza riêng lẻ không đủ để sử dụng các thành phần xơ trong khẩu phần ăn của động vật (đặc biệt là động vật không nhai lại). Có rất nhiều đặc tính hóa học tồn tại giữa các thành phần thức ăn có nguồn gốc từ thực vật. Việc ứng dụng enzym phụ thuộc vào các đặc tính của nguyên liệu thực vật (thức ăn). Chỉ nhằm ví dụ, trong hạt lúa mì, các arabinoxylan chiếm ưu thế, tuy nhiên trong mì tấm, (là đồng sản phẩm hoặc sản phẩm phụ của quá trình xay xát lúa mì), hàm lượng của β -glucan tăng từ $8 \text{ g}^{-1} \text{ DM}$ (trong hạt) đến vượt quá $26 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$.

Các SCFA có các giá trị năng lượng khác nhau và một số SCFA có thể đóng vai trò làm tiền chất của glucoza và một số SCFA có thể góp phần vào việc duy trì sức khỏe và sự nguyên vẹn của ruột. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các tổ hợp đặc hiệu được nêu trong bản mô tả này ưu tiên chuyển quá trình lên men trong GIT của động vật sang quá trình sản xuất các SCFA có giá trị hơn/hữu dụng hơn như axit butyric và/hoặc axit propionic.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn chứa vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM), trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza, trong đó DFM được chọn từ nhóm chỉ bao gồm chủng sản xuất enzym; chủng lên men đường C5; chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn; chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ; hoặc các tổ hợp của chúng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để:

- i) cải thiện năng suất của đối tượng, hoặc
- ii) cải thiện khả năng tiêu hóa nguyên liệu thô trong thức ăn (ví dụ, khả năng tiêu hóa dưỡng chất, như khả năng tiêu hóa amino axit), hoặc
- iii) cải thiện sự tích trữ nitơ, hoặc
- iv) cải thiện tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (feed conversion ratio - FCR), hoặc
- v) cải thiện sự tăng trọng ở đối tượng, hoặc
- vi) cải thiện hiệu suất thức ăn ở đối tượng, hoặc

vii) dịch chuyển quá trình lên men trong ống tiêu hóa của đối tượng sang quá trình sản xuất axit butyric và/hoặc axit propionic,

phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM), trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza, trong đó DFM được chọn từ nhóm chỉ bao gồm chủng sản xuất enzym; chủng lên men đường C5; chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn; chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ; hoặc các tổ hợp của chúng.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất hỗn hợp trộn sẵn chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế hoặc vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM), xylanaza và β -glucanaza, trong đó DFM được chọn từ nhóm bao gồm chủng sản xuất enzym; chủng lên men đường C5; chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn; chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ; hoặc các tổ hợp của chúng, và ít nhất một vitamin và/hoặc ít nhất một khoáng chất.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thức ăn chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế hoặc hỗn hợp trộn sẵn theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất thức ăn chứa vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM), trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza, trong đó DFM được chọn từ nhóm chỉ bao gồm chủng sản xuất enzym; chủng lên men đường C5; chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn; chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ; hoặc các tổ hợp của chúng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi bao gồm việc trộn lẫn thành phần thức ăn với chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế hoặc hỗn hợp trộn sẵn theo sáng chế.

Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi bao gồm việc trộn lẫn thành phần thức ăn với vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM), trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza, trong đó DFM được chọn từ nhóm chỉ bao gồm chủng sản xuất enzym; chủng lên men đường C5; chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn; chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ; hoặc các tổ hợp của chúng

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất việc sử dụng vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM), trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza, trong đó DFM được chọn từ nhóm chỉ bao gồm chủng sản xuất enzym; chủng lên men đường C5; chủng sản xuất axit béo

chuỗi ngắn; chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ; hoặc các tổ hợp của chúng:

- i) để cải thiện năng suất của đối tượng, hoặc
- ii) để cải thiện khả năng tiêu hóa nguyên liệu thô trong thức ăn (ví dụ, khả năng tiêu hóa dưỡng chất, như khả năng tiêu hóa amino axit), hoặc
- iii) để cải thiện sự tích trữ nitơ), hoặc
- iv) để cải thiện tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR), hoặc
- v) để cải thiện sự tăng trọng ở đối tượng, hoặc
- vi) để cải thiện hiệu suất thức ăn ở đối tượng, hoặc
- vii) để dịch chuyển quá trình lên men trong ống tiêu hóa của đối tượng sang quá trình sản xuất axit butyric và/hoặc axit propionic.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất bộ kit chứa vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM), xylanaza và β -glucanaza, trong đó DFM được chọn từ nhóm chỉ bao gồm chủng sản xuất enzym; chủng lên men đường C5; chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn; chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ; hoặc các tổ hợp của chúng (và ít nhất một vitamin tùy chọn và/hoặc ít nhất một khoáng chất tùy chọn) và hướng dẫn sử dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện các tác dụng của xylanaza và β -glucanaza khi có hoặc không có vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM) *Bacillus* đối với số lượng *Lactobacillus* và *E. coli* trong phân (đơn vị hình thành khuẩn lạc được chuyển đổi sang log/g phân, Log10 cfu/g).

Mô tả chi tiết sáng chế

Tốt hơn là (các) enzym được sử dụng trong sáng chế là enzym ngoại sinh đối với DFM. Nói cách khác, tốt hơn là (các) enzym được thêm vào hoặc được trộn lẫn với DFM.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có ý nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Các ấn phẩm Singleton, *et al.*, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994), và Hale & Marham, *THE HARPER*

COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) cung cấp cho người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này từ điển tổng quát bao gồm nhiều thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này.

Bản mô tả này không bị giới hạn bởi các phương pháp và các nguyên liệu ví dụ được mô tả ở đây, và bất kỳ phương pháp và nguyên liệu nào tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và các nguyên liệu được mô tả ở đây đều có thể được sử dụng trong việc thực hiện hoặc thử nghiệm các phương án của sáng chế. Các khoảng giá trị số bao gồm cả các con số xác định khoảng giá trị này. Trừ khi có quy định khác, các trình tự axit nucleic bất kỳ đều được viết từ trái sang phải theo chiều từ 5' đến 3'; các trình tự amino axit được viết từ trái sang phải theo chiều từ amino đến carboxy, một cách tương ứng.

Các tiêu đề được nêu trong bản mô tả này không làm hạn chế các khía cạnh hoặc các phương án khác của sáng chế, mà có thể có được nhờ viện dẫn đến toàn bộ bản mô tả này. Theo đó, các thuật ngữ được định nghĩa ngay bên dưới được định nghĩa đầy đủ hơn nhờ viện dẫn đến toàn bộ bản mô tả này.

Các amino axit được đề cập đến trong bản mô tả này bằng cách sử dụng tên của amino axit, là chữ viết tắt gồm ba chữ cái hoặc chữ viết tắt gồm một chữ cái.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "protein" bao gồm protein, polypeptit và peptit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "trình tự amino axit" đồng nghĩa với thuật ngữ "polypeptit" và/hoặc thuật ngữ "protein". Trong một số trường hợp, thuật ngữ "trình tự amino axit" đồng nghĩa với thuật ngữ "peptit". Trong một số trường hợp, thuật ngữ "trình tự amino axit" đồng nghĩa với thuật ngữ "enzym".

Các thuật ngữ "protein" và "polypeptit" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Trong bản mô tả này và trong các yêu cầu bảo hộ, các mã gồm một chữ cái và ba chữ cái thường dùng cho các gốc amino axit có thể được sử dụng. Mã gồm 3 chữ cái dùng cho các amino axit như được định nghĩa theo Ủy ban phối hợp về danh pháp sinh hóa IUPACIUB (JCBN - Joint Commission on Biochemical Nomenclature). Cũng cần phải hiểu rằng polypeptit có thể được mã hóa bởi nhiều hơn một trình tự nucleotit do sự thoái hóa của mã di truyền.

Tất cả các chỉ số phân loại enzym E.C. được đề cập đến trong bản mô tả này có liên quan đến các chỉ số phân loại được nêu trong ấn phẩm Enzyme Nomenclature –

Recommendations (1992) của Hội đồng danh pháp thuộc Liên minh quốc tế về sinh hóa và sinh học phân tử – ISBN 0-12-226164-3.

Các định nghĩa khác về các thuật ngữ có thể xuất hiện trong khắp bản mô tả. Trước khi mô tả các phương án ví dụ chi tiết hơn, cần phải hiểu rằng sáng chế này không bị giới hạn bởi các phương án cụ thể được mô tả, và như vậy, tất nhiên là có thể thay đổi. Cũng cần phải hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không được dự định là làm giới hạn sáng chế, vì phạm vi của sáng chế sẽ chỉ bị giới hạn bởi các yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Khi khoảng giá trị được nêu, cần phải hiểu rằng mỗi giá trị xen giữa, tính đến một phần mười của đơn vị của giới hạn dưới trừ khi ngữ cảnh thể hiện rõ ràng theo cách khác, giữa giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng giá trị đó cũng được bộc lộ một cách cụ thể. Mỗi khoảng giá trị nhỏ hơn nằm giữa bất kỳ giá trị được nêu hoặc giá trị xen giữa bất kỳ trong khoảng được nêu và bất kỳ giá trị được nêu hoặc xen giữa trong khoảng được nêu đó đều được bao hàm trong sáng chế. Các giới hạn trên và giới hạn dưới của các khoảng giá trị nhỏ hơn này có thể được bao hàm hoặc được loại trừ một cách độc lập trong khoảng giá trị này, và mỗi khoảng giá trị mà một trong hai giới hạn, không có giới hạn nào hoặc cả hai giới hạn đều được bao gồm trong các khoảng giá trị nhỏ hơn cũng được bao hàm bởi sáng chế này, không tránh khỏi giới hạn được loại trừ một cách cụ thể bất kỳ trong khoảng giá trị được nêu. Khi khoảng giá trị được nêu bao gồm một hoặc cả hai giới hạn, thì các khoảng giá trị mà loại trừ một trong hai hoặc cả hai giới hạn được bao hàm đó cũng được bao hàm bởi sáng chế này.

Cần phải lưu ý rằng như được sử dụng trong bản mô tả này và trong các yêu cầu bảo hộ đi kèm, dạng số ít "một" bao gồm cả dạng số nhiều, trừ khi ngữ cảnh thể hiện rõ ràng theo cách khác. Do đó, ví dụ, việc đề cập đến "enzym" bao gồm nhiều chất thích hợp như vậy và việc đề cập đến "thức ăn" bao gồm việc đề cập đến một hoặc nhiều hơn thức ăn và các dạng tương đương của chúng đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, và v.v.

Các tài liệu công bố được đề cập đến trong bản mô tả này chỉ được nêu về phần bộc lộ của chúng mà có trước ngày nộp đơn yêu cầu cấp patent này. Không được hiểu là có sự thừa nhận rằng các tài liệu công bố đó cấu thành tình trạng kỹ thuật đối với các yêu cầu bảo hộ đi kèm theo đây.

Các enzym được sử dụng trong sáng chế có thể được sản xuất bởi nuôi cấy rắn hoặc nuôi cấy ngập, bao gồm các quy trình theo mẻ, theo mẻ có cấp liệu và dòng chảy liên tục. Việc nuôi cấy được thực hiện trong môi trường sinh trưởng chứa môi trường muối khoáng nước, các yếu tố sinh trưởng hữu cơ, nguyên liệu cung cấp nguồn cacbon và năng lượng, oxy phân tử, và, tất nhiên, nguyên liệu cấy bắt đầu của một hoặc nhiều hơn loài vi sinh vật cụ thể cần được sử dụng.

DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là chủng sản xuất enzym.

DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là chủng lên men đường C5.

DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn.

DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ.

Chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm các chi sau đây: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* và các tổ hợp của chúng.

Chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ theo sáng chế có thể là ít nhất một chủng được chọn từ chi *Bacillus*, đặc biệt là *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* hoặc *B. pumilus*.

Chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ theo sáng chế có thể là ít nhất một chủng được chọn từ chi *Enterococcus*, đặc biệt là *Enterococcus faecium*.

Chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm: *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *B. subtilis* AGTP BS521, *B. subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *B. subtilis* AGTP BS1069, *B. subtilis* AGTP 944, *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), *Bacillus subtilis* LSSAO1 (NRRL B-50104), *Bacillus subtilis* 3A-P4 (PTA-6506), *Bacillus subtilis* 22C-P1 (PTA-6508), *Bacillus licheniformis* BL21 (NRRL B-50134), *Bacillus subtilis* BS-27 (NRRL B-

50105), *Bacillus subtilis* BS18 (NRRL B-50633), *Bacillus subtilis* 15A-P4 (PTA-6507), *Bacillus subtilis* BS278 (NRRL B-50634), *Bacillus licheniformis* BL842 (NRRL B-50516), *B. pumilus* AGTP BS 1068, *B. pumilus* KX11-1, *Enterococcus faecium* ID7, *Propionibacterium acidipropionici* P169, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698, *Lactobacillus farciminis* CNCM-I-3699, hoặc chủng có tất cả các đặc tính của chúng, thể phát sinh hoặc biến thể bất kỳ của chúng, và các tổ hợp của chúng.

Chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ được sử dụng trong sáng chế tốt hơn là vi khuẩn có thể sống được.

Chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ được sử dụng trong sáng chế có thể là ở dạng nội bào tử.

Xylanaza được sử dụng trong sáng chế tốt hơn là endo-1,4- β -d-xylanaza (E.C. 3.2.1.8).

Theo một số phương án, tốt hơn là xylanaza và β -glucanaza được sử dụng trong tổ hợp với ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa. Enzym phân giải chất xơ (khác nữa) này có thể được chọn từ nhóm bao gồm xenlobiohydrolaza (E.C. 3.2.1.176 và E.C. 3.2.1.91), β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21), β -xylosidaza (E.C. 3.2.1.37), feruloyl esteraza (E.C. 3.1.1.73), α -arabinofuranosidaza (E.C. 3.2.1.55), pectinaza (ví dụ, endopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.15), exopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.67) hoặc pectat lyaza (E.C. 4.2.2.2)), hoặc các tổ hợp của chúng.

Có thể có nhiều hơn một enzym phân giải chất xơ khác nữa một cách thích hợp, thích hợp là nhiều hơn hai, thích hợp là nhiều hơn ba, thích hợp là nhiều hơn bốn, thích hợp là nhiều hơn năm.

Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa DFM trong tổ hợp với xylanaza, β -glucanaza và ít nhất một enzym phân giải khác nữa chuyển quá trình lên men trong ống tiêu hóa của đối tượng sang quá trình sản xuất axit butyric và/hoặc axit propionic một cách thích hợp.

Vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM)

Thuật ngữ “vi sinh vật” được sử dụng trong bản mô tả này theo cách có thể thay thế với “vi sinh vật”.

DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là DFM thích hợp bất kỳ mà là “chủng sản xuất enzym” – như chủng *Bacillus* sản xuất enzym. Để xác định xem liệu DFM có phải là “chủng sản xuất enzym” hay không, thử nghiệm DFM được định nghĩa trong bản mô tả này là “thử nghiệm DFM sản xuất enzym” có thể được sử dụng. DFM được xem là DFM sản xuất enzym nếu nó được xếp loại là DFM sản xuất enzym bằng “thử nghiệm DFM sản xuất enzym” được nêu trong bản mô tả này.

DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là DFM thích hợp bất kỳ mà là “chủng lên men đường C5”. Để xác định xem liệu DFM có phải là “chủng lên men đường C5” hay không, thử nghiệm DFM được định nghĩa trong bản mô tả này là “thử nghiệm DFM lên men đường C5” có thể được sử dụng. DFM được xem là DFM lên men đường C5 nếu nó được xếp loại là lên men đường C5 bằng “thử nghiệm DFM lên men đường C5” được nêu trong bản mô tả này.

DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là DFM thích hợp bất kỳ mà là “chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn (SCFA)”. Để xác định xem liệu DFM có phải là “chủng sản xuất SCFA” hay không, thử nghiệm DFM được định nghĩa trong bản mô tả này là “thử nghiệm DFM sản xuất SCFA” có thể được sử dụng. DFM được xem là DFM sản xuất SCFA nếu nó được xếp loại là sản xuất SCFA bằng “thử nghiệm DFM sản xuất SCFA” được nêu trong bản mô tả này.

DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là DFM thích hợp bất kỳ mà là “chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ”. Để xác định xem liệu DFM có phải là “chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ” hay không, thử nghiệm DFM được định nghĩa trong bản mô tả này là “thử nghiệm DFM thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ” có thể được sử dụng. DFM được xem là DFM thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ nếu nó thúc đẩy hoặc kích thích hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ bằng cách sử dụng thử nghiệm được nêu trong bản mô tả này.

DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là DFM thích hợp bất kỳ mà là “chủng sản xuất enzym”, “chủng lên men đường C5”, “chủng sản xuất SCFA”, “chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ” hoặc các tổ hợp của chúng.

DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là DFM mà là chủng được phân loại là “chủng sản xuất enzym” và/hoặc “chủng lên men đường C5” và/hoặc “chủng sản xuất SCFA” và/hoặc “chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ” một

cách thích hợp. DFM có thể là chủng được phân loại là có nhiều hơn một loại hoạt tính, ví dụ, ít nhất 2, thích hợp là ít nhất 3, thích hợp là cả 4 hoạt tính, ví dụ, hoạt tính sản xuất enzym, hoạt tính lên men đường C5, hoạt tính sản xuất SCFA và/hoặc hoạt tính thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ một cách thích hợp.

Các DFM theo sáng chế mang lại các lợi ích cho động vật được nuôi bằng một lượng lớn các sản phẩm phụ của thực vật có lượng chất xơ cao, như bã chưng cất khô cùng chất hòa tan (DDGS: dried distillers grains with solubles).

Thử nghiệm DFM sản xuất enzym:

Quá trình sàng lọc thông lượng cao đối với các chủng thử nghiệm này được thực hiện bằng cách ria cấy chấm theo cách lặp lại 2 microlít nuôi cấy lỏng lên trên 15,0ml các loại môi trường cơ chất khác nhau đang quan tâm trong các đĩa có chia ô 100x100x15mm. Các hoạt tính xenlulaza, α -amylaza, zeinaza, proteaza đậu tương, esteraza, lipaza và xylanaza được xác định dựa vào sự sử dụng cơ chất đặc hiệu bởi các chủng riêng lẻ. Các thành phần môi trường được sử dụng để thử nghiệm các tính chất sử dụng cơ chất từ hoạt tính enzym của các chủng thu được từ môi trường được mô tả trong bảng 1. Các đĩa thử nghiệm được để khô trong 30 phút sau khi cấy nuôi cấy, và sau đó được ủ ở 32°C trong 24 giờ. Các hoạt tính enzym đối với mỗi chủng được xác định bằng cách đo vùng phân giải cơ chất ở đơn vị milimét, như được thể hiện bởi sự làm trong rìa xung quanh của sự sinh trưởng khuẩn lạc. Các giá trị trung bình từ các đĩa lặp lại được ghi lại.

Bảng 1- Các thành phần môi trường được sử dụng để thử nghiệm các hoạt tính enzym được minh họa bởi các tính chất sử dụng cơ chất của *Bacillus* thu được từ môi trường.

Thử nghiệm trên đĩa	Thành phần môi trường	Các yêu cầu về hiện ảnh khác
α - Amylaza	Thạch chứa dưỡng chất, tinh bột ngô 2%	Dung dịch nhuộm iot 0,05%
Proteaza đậu tương	Thạch chứa dưỡng chất, protein đậu tương đã được tinh chế 2%	Không có; đo vùng làm trong trong môi trường đục

Xenlulaza	amoni sulfat 0,1%, kali phosphat diaxit 0,1%, sản phẩm chiết nấm men 0,1%, Polypepton 1,0%, thạch 1,5%, carboxymetyl xenluloza (CMC) 0,75%	30 phút nhuộm bằng thuốc nhuộm Congo Red 0,05%, sau đó rửa bằng NaCl 1M.
Esteraza/Lipaza	Polypepton 1,0%, thạch 1,5%, sản phẩm chiết nấm men 0,5%, Tween 80 1,5%, tributyrin 1,5%, thuốc nhuộm Victoria Blue B 0,01% (được lọc).	Không có, đo vùng làm trong trong môi trường đục
Zeinaza	Thạch chứa dưỡng chất, zein đã được tinh chế 2%, được hòa tan trong methanol 70%	Không có, đo vùng làm trong trong môi trường đục
Xylanaza	Thạch chứa dưỡng chất, xylan 2%	Không có, đo vùng làm trong trong môi trường đục

Theo một phương án, chủng sản xuất enzym sản xuất một hoặc nhiều hơn hoạt tính enzym sau đây: hoạt tính xenlulaza, hoạt tính α -amylaza, hoạt tính xylanaza, hoạt tính esteraza, hoạt tính lipaza, hoạt tính β -mannanaza, hoạt tính proteaza (ví dụ, zeinaza hoặc hoạt tính proteaza đậu tương) và các tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, tốt hơn là chủng sản xuất enzym sản xuất một hoặc nhiều hơn hoạt tính trong số các hoạt tính enzym sau đây: hoạt tính xenluloza, hoạt tính xylanaza, hoạt tính β -mannanaza, hoặc các tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, DFM sản xuất enzym là chủng được chọn từ nhóm bao gồm các loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* hoặc các hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, tốt hơn là chủng DFM sản xuất enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

Bacillus subtilis AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510),

Bacillus subtilis AGTP BS442 (NRRL B-50542),

Bacillus subtilis AGTP BS521 (NRRL B-50545),

Bacillus subtilis AGTP BS918 (NRRL B-50508),

Bacillus subtilis AGTP BS1013 (NRRL B-50509),

Bacillus pumilus AGTP BS 1068 (NRRL B-50543),

Bacillus subtilis AGTP BS1069 (NRRL B-50544),

Bacillus subtilis AGTP 944 (NRRL B-50548),

Bacillus pumilus AGTP KXII-1 (NRRL B-50546),

Bacillus subtilis 15A-P4 (PTA-6507),

Bacillus subtilis BS 2084 (NRRL B-50013),

Bacillus subtilis LSSAO1 (NRRL B-50104),

Bacillus subtilis 3A-P4 (PTA-6506),

Bacillus subtilis 22C-P1 (PTA-6508),

Bacillus licheniformis BL21 (NRRL B-50134),

Bacillus subtilis BS-27 (NRRL B-50105),

Bacillus subtilis BS18 (NRRL B-50633),

Bacillus subtilis BS278 (NRRL B-50634),

Bacillus licheniformis BL842 (NRRL B-50516).

hoặc thể phát sinh hoặc biến thể bất kỳ của chúng,

và các tổ hợp của chúng.

Chủng sản xuất enzym của DFM có thể là một hoặc nhiều hơn chủng trong số các chủng được mô tả trong US 61/527,371 và US61/526,881, cả hai tài liệu này đều được đưa vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Thử nghiệm DFM lên men đường C5:

Các chủng *Bacillus* được nuôi qua đêm trên các đĩa chứa thạch Tryptic Soy Agar (Difco) ở 32°C, và vi khuẩn sản xuất axit lactic được nuôi qua đêm trên thạch MRS (Difco) trong điều kiện kỵ khí ở 37°C. Môi trường API 50 CHB và API 50 CHL (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Pháp) được cấy chủng bằng nuôi cấy DFM tinh khiết (*Bacillus* hoặc vi khuẩn sản xuất axit lactic, một cách tương ứng) và được cấy lên các băng API 50CH ® theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các băng được ủ ở 32°C (*Bacillus*) hoặc 37°C trong điều kiện kỵ khí (vi khuẩn sản xuất axit lactic) và được theo dõi tại các thời điểm 24 và 48 giờ về các thay đổi màu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đường C5” có nghĩa là đường có 5 cacbon bất kỳ. Các đường C5 có thể được gọi trong bản mô tả này là các pentoza.

Các đường C5 bao gồm D-arabinoza, L-arabinoza, D-riboza, D-xyloza và L-xyloza.

Theo một phương án, chủng lên men đường C5 của DFM được chọn từ nhóm bao gồm:

Bacillus subtilis 15A-P4 (PTA-6507)

Bacillus subtilis AGTP BS918 (NRRL B-50508)

Bacillus subtilis BS 2084 (NRRL B-50013)

Bacillus subtilis LSSAO1 (NRRL B-50104)

Enterococcus faecium ID7

Lactobacillus lactis DJ6 (PTA 6102)

Lactococcus lactis ID7 (PTA 6103),

hoặc các tổ hợp của chúng.

Thử nghiệm DFM sản xuất axit béo chuỗi ngắn (SCFA):

Nguyên liệu cấy 1% thể tích/thể tích của nuôi cấy trong 48 giờ của DFM được sử dụng để cấy chủng các ống loại 10 ml chứa môi trường lỏng natri lactat (NLB: Sodium Lactate Broth) đã được biến đổi (natri lactat 1%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO; trypton 1%; Oxoid Ltd., Hampshire, Anh, sản phẩm chiết nấm men 0,5%; Oxoid Ltd. và KH_2PO_4 0,5%), không có natri lactat và được bổ sung lượng tương xứng (1% trọng lượng/thể tích) của một trong số chín hydrat cacbon khác nhau (lactat, glucoza, galactoza, arabinoza, sucroza, tinh bột, xyloza, xenlobioza, fructoza; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Các nuôi cấy được nuôi trong điều kiện kỵ khí ở 32°C, và sau 0, 24, 48, và 72 giờ ủ, các ống lặp lại hai lần được ly tâm với tốc độ 5000 x g trong 10 phút và môi trường lỏng đã dùng được thu lại từ mỗi nuôi cấy. Sự sản xuất các axit béo chuỗi ngắn trong môi trường lỏng đã dùng được đo bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Các mẫu 1 ml lặp lại hai lần của môi trường lỏng nuôi cấy đã dùng được lấy ra từ mỗi ống đựng mẫu và được trộn với 10 ml H_2SO_4 0,005M. Ba ml của mỗi mẫu đã được pha loãng được lọc qua màng lọc loại 0,2 micron vào các lọ HPLC và được đậy nắp. Các mẫu được phân tích về axetat, lactat, axit propionic, và axit butyric bằng môđun tách Waters 2695 (Milford, Ma) bằng cách sử dụng cột 300 X 7,8 mm Bio-Rad (Hercules, CA) Aminex HPX-87H. Tất cả các chất phân tích đều được phát hiện bằng thiết bị phát hiện Waters 2410 RI.

Theo một phương án, chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn (SCFA) có thể là *Propionibacterium acidipropionici* P169.

Theo một phương án khác, chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn (SCFA) có thể là *Enterococcus faecium* ID7.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “axit béo chuỗi ngắn” bao gồm các axit béo dễ bay hơi cũng như axit lactic.

Theo một phương án, SCFA có thể được chọn từ nhóm bao gồm: axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit isobutyric, axit valeric, axit isovaleric, axit 2-methylbutyric và axit lactic.

Theo một phương án, SCFA có thể là axit butyric.

Thử nghiệm DFM thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ:

Thử nghiệm trong chuồng được thực hiện để xác định các tác dụng của DFM đối với gà giò so với đối chứng không có DFM. Các mẫu được thu lại vào các ngày 11 và 42 của thử nghiệm. Vào mỗi ngày lấy mẫu, một con gà được thu lại từ mỗi chuồng để có tổng số là tám con gà cho mỗi phương án xử lý. Các con gà bị giết và toàn bộ ống tiêu hóa (GIT) từ dưới mề đến đường nối ruột hồi-manh tràng được thu lại từ mỗi con gà. Các mẫu manh tràng từ mỗi con gà được cắt mở ra và sản phẩm tiêu hóa và mô manh tràng được thu lại vào túi Whirl-Pak và được nghiền nhỏ trong 99 ml pepton 0,1% với tốc độ là 7,0 nhịp/giây trong 60 giây để giải phóng các tế bào vi khuẩn liên quan đến niêm mạc từ mô manh tràng. Các lượng nhỏ của dung dịch đã được nghiền nhỏ chứa vi khuẩn từ niêm mạc manh tràng và sản phẩm tiêu hóa được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được lưu giữ ở -20°C đến khi phân tích tiếp. Hệ gen ADN được phân lập từ 250 µl của mỗi mẫu bằng cách chiết bằng phenol clorofom và được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit Roche Applied Science High Pure PCR Template Purification Kit (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). ADN từ hai con gà cho mỗi phương án xử lý được gộp lại với lượng bằng nhau và được gửi để xác định trình tự dựa vào sự giải phóng pyrophosphat dưới dạng mẫu đơn lẻ, tạo ra bốn mẫu cho mỗi phương án xử lý từ mỗi độ tuổi. Việc xác định trình tự dựa vào sự giải phóng pyrophosphat đối với đơn vị siêu sao chép FLX được mã hóa bằng thẻ gắn của vi khuẩn được thực hiện như được mô tả trước đó (Dowd, *et al* BMC Microbiol. 2008 Jul 24;8:125). Vùng V1-V3 của gen 16S rARN được khuếch đại trong mỗi mẫu đã được gộp lại bằng cách sử dụng các đoạn mồi 28 F (5'-GAGTTTGATCNTGGCTCAG) và 519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG). Các dữ liệu xác định trình tự dựa vào sự giải phóng pyrophosphat được xử lý và được phân

tích bằng cách sử dụng đường dẫn phần mềm Qiime v.1.4.0. Nói ngắn gọn, các dữ liệu trình tự thô được sàng lọc và được cắt gọn dựa trên cơ sở chất lượng. Tất cả các trình tự đều được cắt gọn đến 350 cặp bazơ. Các trình tự được nhóm và được gán vào các đơn vị phân loại di truyền bởi các mẫu riêng lẻ dựa trên cơ sở các trình tự mã vạch. Các đoạn môi và các thẻ gắn mã vạch được lấy ra khỏi các trình tự này và các trình tự ribosom không phải của vi khuẩn được lấy ra. Các trình tự được nhóm lại thành các đơn vị phân loại di truyền (OTU: operational taxonomic unit) với độ tương tự là 97% bằng cách sử dụng Uclust. Sau đó, các trình tự đại diện từ mỗi OTU được sắp hàng bằng cách sử dụng PyNAST và sự phân loại được gán bằng cách so sánh trình tự với các trình tự gen 16S rARN vi khuẩn đã biết trong cơ sở dữ liệu SILVA bằng cách sử dụng bộ phân loại RDP. Việc lấy mẫu ngẫu nhiên của các trình tự được thực hiện để chuẩn hóa từng mẫu sao cho số lượng trình tự giống nhau được phân tích. Việc phân tích bằng phân tích phương sai (ANOVA) được sử dụng để xác định xem liệu hệ vi sinh vật phân giải chất xơ (đơn vị phân loại) bất kỳ có bị ảnh hưởng đáng kể bởi việc xử lý hay không.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hệ vi sinh vật phân giải chất xơ” có nghĩa là nhóm vi sinh vật có khả năng xử lý các polysacarit thực vật phức tạp nhờ khả năng tổng hợp các enzym phân giải xenluloza và phân giải hemixenluloza của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “nội sinh” có nghĩa là có mặt trong (hoặc khởi nguồn trong) GIT của đối tượng (ví dụ, động vật). Nói cách khác, hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ không phải là DFM. Hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ không được bổ sung vào thức ăn của đối tượng.

Tốt hơn là chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ được sử dụng trong sáng chế chứa vi sinh vật có thể sống được. Tốt hơn là chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ chứa vi khuẩn có thể sống được hoặc nấm men có thể sống được hoặc nấm có thể sống được.

Theo một phương án được ưu tiên, chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ chứa vi khuẩn có thể sống được.

Thuật ngữ “vi sinh vật có thể sống được” có nghĩa là vi sinh vật có hoạt tính chuyển hóa hoặc có khả năng biệt hóa.

Theo một phương án, chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ có thể là vi khuẩn hình thành bào tử và do đó, thuật ngữ DFM có thể bao gồm hoặc chứa bào tử, ví dụ, bào tử vi khuẩn. Do đó, theo một phương án, thuật ngữ “vi sinh vật có thể sống được” như được sử dụng trong bản mô tả này có thể bao gồm bào tử vi sinh vật, như nội bào tử hoặc bào tử đính.

Theo một phương án khác, chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế không bao gồm hoặc không chứa bào tử vi sinh vật, ví dụ, nội bào tử hoặc bào tử đính.

Vi sinh vật có thể là vi sinh vật có trong tự nhiên hoặc nó có thể là vi sinh vật được biến nạp. Vi sinh vật cũng có thể là tổ hợp của các vi sinh vật thích hợp.

Theo một số khía cạnh, chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ theo sáng chế có thể là một hoặc nhiều hơn vi sinh vật trong số các vi sinh vật sau đây: vi khuẩn, nấm men hoặc nấm.

Tốt hơn là chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ theo sáng chế là vi sinh vật có lợi.

Trong sáng chế, thuật ngữ vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM) bao gồm vi khuẩn được cấp trực tiếp, nấm men được cấp trực tiếp, nấm được cấp trực tiếp và các tổ hợp của chúng.

Tốt hơn là chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ là vi khuẩn được cấp trực tiếp.

Thích hợp là chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ có thể bao gồm vi khuẩn từ một hoặc nhiều hơn chi trong số các chi sau đây: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* và các tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ có thể là chủng được chọn từ chi *Bacillus*.

Theo một phương án, chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ có thể được chọn từ *Bacillus* spp sau đây: các chủng *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. brevis*, *B. alkalophilus*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis* và *B. lentus*.

Theo ít nhất một số phương án, (các) chủng *B. subtilis* là *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *B. subtilis* AGTP BS521, *B. subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *B. subtilis* AGTP BS1069, *B. subtilis* AGTP 944.

Theo ít nhất một số phương án, (các) chủng *B. subtilis* là *Bacillus subtilis* 15A-P4 (PTA-6507), LSSA01 (NRRL B-50104).

Theo ít nhất một số phương án, chủng *B. pumilus* là *B. pumilus* AGTP BS 1068 hoặc *B. pumilus* KX11-1.

Các chủng 3A-P4 (PTA-6506), 15A-P4 (PTA-6507) và 22C-P1 (PTA-6508) đã có sẵn công khai từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC: American Type Culture Collection). Các chủng 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 (NRRL-B-50104); BS27 (NRRL B-50105) đã có sẵn công khai từ bảo tàng giống phục vụ nghiên cứu nông nghiệp (NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection). Chủng *Bacillus subtilis* LSSA01 đôi khi được gọi là *B. subtilis* 8. Các chủng này được mô tả trong US 7, 754, 469 B2.

Danisco USA, Inc. có địa chỉ tại Waukesha, Wisconsin, Mỹ đã nộp lưu theo Hiệp ước Budapest các mẫu sinh học nộp lưu nêu dưới đây với Bảo tàng giống phục vụ nghiên cứu nông nghiệp (NRRL) với ngày nộp lưu ban đầu và số hiệu truy nhập được nêu chi tiết dưới đây:

Nộp lưu		Ngày nộp lưu
<i>Bacillus subtilis</i> AGTP BS3BP5	NRRL B-50510	13/05/2011
<i>Bacillus subtilis</i> AGTP BS442	NRRL B-50542	04/08/2011
<i>Bacillus subtilis</i> AGTP BS521	NRRL B-50545	04/08/2011
<i>Bacillus subtilis</i> AGTP BS918	NRRL B-50508	13/05/2011
<i>Bacillus subtilis</i> AGTP BS1013	NRRL B-50509	13/05/2011
<i>Bacillus subtilis</i> AGTP BS1069	NRRL B-50544	04/08/2011
<i>Bacillus subtilis</i> AGTP 944	NRRL B-50548	11/08/2011
<i>Bacillus pumilus</i> AGTP BS1068	NRRL B-50543	04/08/2011
<i>Bacillus pumilus</i> AGTP KXII-1	NRRL B-50546	05/08/2011
<i>Bacillus subtilis</i> BS18	NRRL B-50633	09/01/2012
<i>Bacillus subtilis</i> BS278	NRRL B-50634	09/01/2012
<i>Bacillus licheniformis</i> BL842	NRRL B-50516	20/05/2011

Danisco USA, Inc. có địa chỉ tại Waukesha, Wisconsin, Mỹ đã ủy quyền cho DuPont Nutrition Biosciences ApS có địa chỉ tại Langebrogade 1, PO Box 17, DK-1001, Copenhagen K, Đan Mạch để viện dẫn đến các nguyên liệu sinh học đã được nộp lưu này trong đơn yêu cầu cấp patent này và đã đưa ra sự đồng ý không hạn chế và không thể thay đổi đối với nguyên liệu đã được nộp lưu có sẵn công khai.

AgTech Products, Inc. có địa chỉ tại W227 N752 Westmound Drive, Waukesha, WI 53186, Mỹ đã nộp lưu theo Hiệp ước Budapest mẫu sinh học nộp lưu nêu dưới đây với Bảo tàng giống phục vụ nghiên cứu nông nghiệp (NRRL) với ngày nộp lưu ban đầu và số hiệu truy nhập được nêu chi tiết dưới đây:

<i>Bacillus licheniformis</i> BL21	NRRL B-50134	15/04/2008
------------------------------------	--------------	------------

AgTech Products, Inc đã ủy quyền cho DuPont Nutrition Biosciences ApS có địa chỉ tại Langebrogade 1, PO Box 17, DK-1001, Copenhagen K, Đan Mạch để viện dẫn đến nguyên liệu sinh học đã được nộp lưu này trong đơn yêu cầu cấp patent này và đã đưa ra sự đồng ý không hạn chế và không thể thay đổi đối với nguyên liệu đã được nộp lưu có sẵn công khai.

Bảng nêu dưới đây nêu tóm tắt khả năng sản xuất enzym của các chủng được chọn bằng “thử nghiệm DFM sản xuất enzym” nêu trên:

Tóm tắt về hoạt tính enzym của các chủng vi sinh vật được nuôi trực tiếp thích hợp.^a

Bảng 2. Các hoạt tính xenlulaza, xylanaza, và β -mannanaza của các chủng *Bacillus*.

Tên phân lập	CMCaza (Xenlulaza)	Xylanaza	β -Mannanaza ¹
BS27	0,0	4,0	3,0
BL21	3,0	0,0	2,5
BL842	1,0	0,0	2,5
BS18	3,0	3,0	3,5
15AP4	4,0	2,0	2,5
22CP1	3,0	5,0	2,0
3AP4	4,0	2,5	1,5
BS278	4,0	3,0	1,0
LSSAO1	3,5	4,0	3,3
BS2084	4,0	3,0	1,0
BS3BP5	3,3	3,0	N/A
BS442	1,8	2,5	2,0
BS521	6,0	4,0	2,0
BS918	4,0	5,5	3,3
BS1013	6,5	4,0	2,5
BP1068	3,0	6,0	4,5
BS1069	4,0	4,0	2,5
944	6,5	3,5	1,0
KXII-1	2,5	5,0	N/A

¹Mannanaza (ví dụ, β -mannanaza) là tên được đặt cho lớp enzym mà có thể thủy phân các liên kết 1,4- β -D-glycosidic của β -mannan, galactomannan và glucomannan thành các oligosacarit mannan và mannoza, nhờ đó phá vỡ mannan chứa hemixenluloza, là một trong số các thành phần chính của thành tế bào thực vật. β -mannanaza là endo-1,4- β -D-mannanaza (E.C. 3,2,1,78).

Thích hợp là chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ được sử dụng trong sáng chế có thể là chủng được chọn từ chi *Propionibacterium*. Theo một phương án, DFM được sử dụng trong sáng chế có thể được chọn từ loài *Propionibacterium acidipropionici*.

Theo một phương án, DFM được sử dụng trong sáng chế là *Propionibacterium acidipropionici* P169.

AgTech Products, Inc. có địa chỉ tại W227 N752 Westmound Dr. Waukesha, WI 53186, Mỹ đã nộp lưu vào ngày 28/07/2003 theo Hiệp ước Budapest *Propionibacterium acidipropionici* P169 với Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC), Manassas, VA 20110-2209, Mỹ với số hiệu truy nhập PTA-5271. *Propionibacterium acidipropionici* P169 được nêu tham khảo trong Patent Mỹ đã được cấp bằng số US6,951,643B2 và có sẵn công khai từ ATCC.

Theo một phương án, chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ được sử dụng trong sáng chế có thể là chủng từ chi *Enterococcus*.

Theo một phương án, DFM được sử dụng trong sáng chế có thể được chọn từ loài *Enterococcus faecium*.

Theo một phương án, DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là *Enterococcus faecium* ID7.

Lactococcus lactis ID7 (sau đó được phân loại lại là *Enterococcus faecium* ID7) được nộp lưu vào ngày 22/06/2004 theo Hiệp ước Budapest với tên gọi là *Lactococcus lactis* ID7 với Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC), Manassas, VA 20110-2209, Mỹ với số hiệu truy nhập PTA-6103. *Lactococcus lactis* ID7 (sau đó được phân loại lại là *Enterococcus faecium* ID7) được nêu tham khảo trong Patent Mỹ đã được cấp bằng số US7,384,628 và có sẵn công khai từ ATCC. Khi “*Enterococcus faecium* ID7” được sử dụng trong bản mô tả này, cần phải hiểu rằng tên của sinh vật này có thể thay thế với “*Lactococcus lactis* ID7” mà được nộp lưu với số hiệu truy nhập PTA-6103. *Enterococcus faecium* ID7 cũng có sẵn công khai từ Danisco Animal Nutrition, Đan Mạch.

Theo một phương án, chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ được sử dụng trong sáng chế có thể là chủng từ chi *Lactobacillus*.

Theo một phương án, chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ có thể được chọn từ *Lactobacillus* spp sau đây: *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbreuckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* và *Lactobacillus jensenii*, và các tổ hợp của any của chúng.

Theo một phương án, DFM có thể được chọn từ một hoặc nhiều hơn chủng trong số các chủng sau đây: *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698 và *Lactobacillus farciminis* CNCM-I-3699. Các chủng này đã được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia (CNCM: Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) 25, Rue du Docteur Roux, F75724 Paris Cedex 15, Pháp vào ngày 08/12/2006 bởi Sorbial, Route de Spay 72700 Allonnes, Pháp và tất cả các quyền và lợi ích liên quan đến các mẫu nộp lưu sau đó được chuyển giao cho Danisco France SAS có địa chỉ tại 20, Rue de Brunel, 75017 Paris, Pháp.

Danisco France SAS đã ủy quyền cho DuPont Nutrition Biosciences ApS có địa chỉ tại Langebrogade 1, PO Box 17, DK-1001, Copenhagen K, Đan Mạch để viện dẫn đến các nguyên liệu sinh học đã được nộp lưu này trong đơn yêu cầu cấp patent này và đã đưa ra sự đồng ý không hạn chế và không thể thay đổi đối với nguyên liệu đã được nộp lưu có sẵn công khai.

Theo ít nhất một số phương án, DFM có thể được chọn từ *Lactobacillus lactis* DJ6 (PTA 6102) và/hoặc *Lactococcus lactis* ID7 (PTA 6103).

AgTech Products, Inc. có địa chỉ tại W227 N752 Westmound Drive, Waukesha, WI 53186, Mỹ đã nộp lưu theo Hiệp ước Budapest các mẫu sinh học nộp

lưu nêu dưới đây với Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC), Manassas, VA 20110-2209, Mỹ với ngày nộp lưu ban đầu và số hiệu truy nhập được nêu chi tiết dưới đây:

<i>Lactobacillus lactis</i> DJ6	PTA 6102	22/06/2004
<i>Lactococcus lactis</i> ID7	PTA 6103	22/06/2004

AgTech Products, Inc. đã ủy quyền cho DuPont Nutrition Biosciences ApS có địa chỉ tại Langebrogade 1, PO Box 17, DK-1001, Copenhagen K, Đan Mạch để viện dẫn đến các nguyên liệu sinh học đã được nộp lưu này trong đơn yêu cầu cấp patent này và đã đưa ra sự đồng ý không hạn chế và không thể thay đổi đối với nguyên liệu đã được nộp lưu có sẵn công khai.

Theo ít nhất một phương án, nhiều hơn một chủng trong số (các) chủng được nêu trong bản mô tả này được kết hợp lại.

Do đó, chủng sản xuất enzym và/hoặc chủng lên men đường C5 và/hoặc chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn và/hoặc chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ được sử dụng trong sáng chế có thể là tổ hợp của ít nhất hai, thích hợp là ít nhất ba, thích hợp là ít nhất bốn chủng DFM được nêu trong bản mô tả này, ví dụ, các chủng DFM được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *B. subtilis* AGTP BS521, *B. subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *B. subtilis* AGTP BS1069, *B. subtilis* AGTP 944, *B. pumilus* AGTP BS 1068, *B. pumilus* KX11-1, *Propionibacterium* P169, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698 hoặc *Lactobacillus farciminis* CNCM-I-3699.

Theo một phương án, tốt hơn là DFM có thể là một hoặc nhiều hơn chủng thuộc nhóm bao gồm *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *B. subtilis* AGTP BS521, *B. subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *B. subtilis* AGTP BS1069, *B. subtilis* AGTP 944, *B. pumilus* AGTP BS 1068, *B. pumilus* KX11-1 và tổ hợp của chúng.

Thể phát sinh hoặc biến thể *Bacillus*, *Lactobacillus* hoặc *Propionibacterium* bất kỳ cũng được bao hàm và hữu dụng trong các phương pháp được mô tả và được yêu cầu bảo hộ trong đơn này.

Theo một số phương án, các chủng biến thể *Bacillus* có tất cả các đặc tính của *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *B. subtilis* AGTP BS521, *B. subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *B. subtilis* AGTP BS1069, *B. subtilis* AGTP 944, *B. pumilus* AGTP BS 1068 hoặc *B. pumilus* KX11-1

cũng được bao hàm và hữu dụng trong các phương pháp được mô tả và được yêu cầu bảo hộ trong đơn này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “biến thể” có độ đồng nhất của các trình tự di truyền là ít nhất 80% với các chủng đã được bộc lộ khi được phân tích phản ứng chuỗi polymeraza - ADN đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD-PCR). Mức độ của độ đồng nhất của các trình tự di truyền có thể thay đổi. Theo một số phương án, biến thể có độ đồng nhất của các trình tự di truyền là ít nhất 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các chủng đã được bộc lộ khi được phân tích RAPD-PCR.

Sáu đoạn môi mà có thể được sử dụng để phân tích RAPD-PCR bao gồm các đoạn môi nêu dưới đây:

Đoạn môi 1 (5'-GGTGCGGGAA-3'), đoạn môi 2 (5'-GTTTCGCTCC-3'), đoạn môi 3 (5'-GTAGACCCGT-3'), đoạn môi 4 (5'-AAGAGCCCGT-3'), đoạn môi 5 (5'-AACGCGCAAC-3'), đoạn môi 6 (5'-CCCGTCAGCA-3'). Phân tích RAPD có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bộ Ready-to-Go™ RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences, Thụy Điển), được thiết kế dưới dạng các hỗn hợp phản ứng được trộn sẵn, được phân phối sẵn để thực hiện việc phân tích RAPD.

Vi khuẩn được cấp trực tiếp được sử dụng trong sáng chế có thể là thuộc cùng một kiểu (chi, loài và chủng) hoặc có thể bao gồm hỗn hợp của các chi, loài và/hoặc chủng.

Tốt hơn là, DFM được sử dụng trong sáng chế là vi sinh vật thường được công nhận là an toàn và, tốt hơn là được phê chuẩn bởi GRAS.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng biết được các loài và hoặc các chủng đặc hiệu của các vi sinh vật từ các chi được nêu trong bản mô tả này, mà được sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm và/hoặc nông nghiệp và thường được xem là thích hợp cho sự tiêu thụ của động vật.

Tốt hơn là, DFM được sử dụng trong sáng chế là DFM thích hợp cho sự tiêu thụ của động vật.

Thuận lợi là, khi sản phẩm là thức ăn hoặc chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn, DFM có thể sống được cần phải vẫn có hiệu quả qua ngày "hạn chót" hoặc ngày "hết hạn" thông thường của sản phẩm mà trong thời gian đó thức ăn hoặc chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn được chào bán bởi người bán lẻ. Độ dài của thời gian

mong muốn và thời hạn sử dụng thông thường sẽ thay đổi giữa các loại thức ăn chăn nuôi và người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng thời hạn sử dụng sẽ thay đổi theo loại thức ăn chăn nuôi, kích thước của thức ăn chăn nuôi, nhiệt độ bảo quản, điều kiện chế biến, nguyên liệu bao gói và thiết bị bao gói.

Theo một số phương án, quan trọng là DFM phải có tính dung chịu đối với nhiệt, tức là có tính chịu nhiệt. Điều này là đặc biệt quan trọng trong trường hợp thức ăn được tạo viên. Do đó, theo một phương án, DFM có thể là vi sinh vật chịu nhiệt, như vi khuẩn chịu nhiệt, bao gồm, ví dụ, *Bacillus* spp.

Theo một số phương án, có thể ưu tiên nếu DFM là vi khuẩn tạo bào tử, như *Bacilli*, ví dụ, *Bacillus* spp. Các *Bacillus* có khả năng tạo các nội bào tử ổn định khi điều kiện sinh trưởng không thuận lợi và có tính kháng rất cao đối với nhiệt, độ pH, độ ẩm và các chất khử trùng.

Thích hợp là, DFM không phải là vi sinh vật đã bị làm bất hoạt.

Theo một phương án, DFM có thể là vi sinh vật có thể sống được hoặc không thể sống được mà được sử dụng ở dạng đã được phân lập hoặc đã được bán phân lập. DFM có thể được sử dụng trong tổ hợp cùng với hoặc không cùng với môi trường sinh trưởng mà nó được nuôi cấy trong đó.

Theo một phương án, DFM có khả năng tạo ra các đơn vị hình thành khuẩn lạc khi được nuôi trên môi trường thích hợp. Môi trường thích hợp này có thể chứa (hoặc bao gồm) thức ăn hoặc thành phần cấu tạo thức ăn.

Theo một phương án, DFM không có khả năng tạo ra các đơn vị hình thành khuẩn lạc khi được nuôi trên môi trường thích hợp. Môi trường thích hợp này có thể chứa (hoặc bao gồm) thức ăn hoặc thành phần cấu tạo thức ăn.

Không phụ thuộc vào việc liệu DFM có khả năng hay không có khả năng tạo ra các đơn vị hình thành khuẩn lạc khi được nuôi trên môi trường thích hợp – các tế bào này có thể vẫn có hoạt tính chuyển hóa (ví dụ, ngay cả khi chúng không thể phân chia).

Theo một phương án, DFM có thể được dùng ở dạng tế bào không thể sống được.

Theo một phương án, DFM có thể được dùng ở dạng tế bào có thể sống được.

DFM có thể được định liều một cách thích hợp.

Thích hợp là liều lượng của DFM trong thức ăn có thể nằm từ khoảng 1×10^3 CFU/g thức ăn đến khoảng 1×10^9 CFU/g thức ăn, thích hợp là nằm từ khoảng 1×10^4 CFU/g thức ăn đến khoảng 1×10^8 CFU/g thức ăn, thích hợp là nằm từ khoảng $7,5 \times 10^4$ CFU/g thức ăn đến khoảng 1×10^7 CFU/g thức ăn.

Theo một phương án, DFM được định liều trong thức ăn chăn nuôi với lượng lớn hơn khoảng 1×10^3 CFU/g thức ăn, thích hợp là lớn hơn khoảng 1×10^4 CFU/g thức ăn, thích hợp là lớn hơn khoảng $7,5 \times 10^4$ CFU/g thức ăn.

Thích hợp là liều lượng của DFM trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn có thể nằm từ khoảng 1×10^5 CFU/g chế phẩm đến khoảng 1×10^{13} CFU/g chế phẩm, thích hợp là nằm từ khoảng 1×10^6 CFU/g chế phẩm đến khoảng 1×10^{12} CFU/g chế phẩm, thích hợp là nằm từ khoảng $3,75 \times 10^7$ CFU/g chế phẩm đến khoảng 1×10^{11} CFU/g chế phẩm.

Theo một phương án, DFM được định liều trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn với lượng lớn hơn khoảng 1×10^5 CFU/g chế phẩm, thích hợp là lớn hơn khoảng 1×10^6 CFU/g chế phẩm, thích hợp là lớn hơn khoảng $3,75 \times 10^7$ CFU/g chế phẩm.

Theo phương án được ưu tiên, DFM có thể được định liều trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn với lượng nằm từ khoảng 5×10^7 đến khoảng 1×10^9 CFU/g, thích hợp là với lượng nằm từ khoảng 1×10^8 đến khoảng 5×10^8 CFU/g chế phẩm.

Theo phương án được ưu tiên khác, DFM có thể được định liều trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn với lượng nằm từ khoảng 5×10^3 đến khoảng 5×10^5 U/g, thích hợp là với lượng nằm từ khoảng 1×10^4 đến khoảng 1×10^5 CFU/g chế phẩm.

Enzym phân giải chất xơ

DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với ít nhất một xylanaza và ít nhất một β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa).

β -glucanaza hoặc endo-glucanaza là tên được đặt cho lớp enzym mà có thể thủy phân các liên kết (1,3)- β -D-glycosidic và/hoặc (1,4)- β -D-glycosidic của (1,4)- β -glucan, (1,3;1,4)- β -glucan và xenluloza thành các oligosacarit glucoza và glucoza, nhờ đó phá vỡ xenluloza và hemixenluloza, là các thành phần chính của thành tế bào thực vật.

β -glucanaza được sử dụng trong sáng chế có thể là β -glucanaza bất kỳ có bán trên thị trường.

Theo một phương án, β -glucanaza là endoglucanaza, ví dụ, endo-1,4- β -D-glucanaza (được phân loại là E.C. 3.2.1.4).

Thích hợp là, β -glucanaza được sử dụng trong sáng chế có thể là β -glucanaza từ *Bacillus*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Thermomyces*, *Fusarium* và *Penicillium*.

Theo một phương án, enzyme phân giải chất xơ có thể là β -glucanaza được sản xuất từ một hoặc nhiều hơn vật chủ trong số các vật chủ biểu hiện được chọn từ nhóm bao gồm: *Bacillus lentus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Humicola insolens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus aculeatus*.

Theo một phương án, enzyme phân giải chất xơ có thể là một hoặc nhiều hơn sản phẩm trong số các sản phẩm thương mại nêu dưới đây, sản phẩm này chứa ít nhất là enzyme phân giải chất xơ β -glucanaza:

Econase® GT hoặc Econase® BG (có sẵn từ AB Vista), Rovabio Excel® (có sẵn từ Adisseo), Endofeed® DC và Amylofeed® (có sẵn từ Andres Pinaluba S.A.), AveMix® XG10 (từ Aveve), Natugrain®, Natugrain®TS, hoặc Natugrain® TS/L (có sẵn từ BASF), Avizyme® 1210, Avizyme® SX, Grindazym® GP, Grindazym® GV, Porzyme® 8100, Porzyme® 9102, Porzyme® tp100, AXTRA® XB, Avizyme® 1100, Avizyme® 1110, Avizyme® 1202, Porzyme® sf hoặc Porzyme® SP (có sẵn từ Danisco Animal Nutrition), Bio-Feed Plus®, Ronozyme A®, Ronozyme VP® hoặc Roxazyme G2® (có sẵn từ DSM), Hostazym C® (có sẵn từ Huvepharma), Kemzyme W Dry hoặc Kemzyme W Liquid (có sẵn từ Kemin), Biogalactosidase BL (có sẵn từ Kerry Ingredients), Safizyme G (có sẵn từ Le Saffre), hoặc Feedlyve AGL (có sẵn từ Lyven).

Theo một phương án, β -glucanaza có thể được nhận từ Axtra®XB.

β -glucanaza có thể được định liều với lượng thích hợp bất kỳ.

Theo một phương án, β -glucanaza được sử dụng trong sáng chế có thể có mặt trong thức ăn chăn nuôi với lượng nằm từ khoảng 50 BGU/kg thức ăn đến khoảng 50000 BGU/kg thức ăn, thích hợp là nằm từ khoảng 100 BGU/kg thức ăn đến khoảng 1000 BGU/kg thức ăn.

B-glucanaza được sử dụng trong sáng chế có thể có mặt trong thức ăn chăn nuôi với lượng nằm từ khoảng 75BGU/kg thức ăn đến khoảng 400BGU/kg thức ăn, thích hợp là nằm từ khoảng 150BGU/kg thức ăn đến khoảng 200 BGU/kg thức ăn.

Theo một phương án, β -glucanaza có mặt trong thức ăn chăn nuôi với lượng nhỏ hơn 1000BGU/kg thức ăn, thích hợp là nhỏ hơn khoảng 500BGU/kg thức ăn, thích hợp là nhỏ hơn 250 BGU/kg thức ăn.

Theo một phương án, β -glucanaza có mặt trong thức ăn chăn nuôi với lượng lớn hơn 75BGU/kg thức ăn, thích hợp là lớn hơn 100BGU/kg thức ăn.

Thích hợp là, β -glucanaza có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn với lượng nằm từ khoảng 150BGU/g chế phẩm đến khoảng 3000 BGU/g chế phẩm, thích hợp là với lượng nằm từ khoảng 300BGU/g chế phẩm đến khoảng 1500 BGU/g chế phẩm.

Theo một phương án, β -glucanaza có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn với lượng nhỏ hơn 5000 BGU/g chế phẩm, thích hợp là với lượng nhỏ hơn 4000 BGU/g chế phẩm, thích hợp là với lượng nhỏ hơn 3000 BGU/g chế phẩm, thích hợp là với lượng nhỏ hơn 2000 BGU/g chế phẩm.

Theo một phương án, β -glucanaza có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn với lượng lớn hơn 50 BGU/g chế phẩm, thích hợp là với lượng lớn hơn 100 BGU/g chế phẩm, thích hợp là với lượng lớn hơn 125 BGU/g chế phẩm.

Theo một số phương án, hoạt tính của β -glucanaza có thể được tính toán bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (BGU)” được nêu trong bản mô tả này.

Theo một phương án, β -glucanaza được sử dụng trong sáng chế có thể có hoạt tính β -glucanaza như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (CMC U/g)” được nêu trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “enzym phân giải chất xơ” có thể bao gồm một hoặc nhiều hơn enzym phân giải chất xơ trong số các enzym phân giải chất xơ sau đây: xylanaza (ví dụ, endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8) hoặc 1,4 β -xylosidaza (E.C. 3.2.1.37)), β -glucanaza (E.C. 3.2.1.4), xenlobiohydrolaza (E.C. 3.2.1.176 và E.C. 3.2.1.91), β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21), feruloyl esteraza (E.C. 3.1.1.73), α -arabinofuranosidaza (E.C. 3.2.1.55), pectinaza (ví dụ, endopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.15), exopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.67) hoặc pectat lyaza (E.C. 4.2.2.2)), hoặc các tổ hợp của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “enzym phân giải chất xơ khác nữa” có thể bao gồm một hoặc nhiều hơn enzym phân giải chất xơ trong số các enzym phân giải chất xơ sau đây: xenlobiohydrolaza (E.C. 3.2.1.176 và E.C. 3.2.1.91), β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21), β -xylosidaza (E.C. 3.2.1.37), feruloyl esteraza (E.C. 3.1.1.73), α -arabinofuranosidaza (E.C. 3.2.1.55), pectinaza (ví dụ, endopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.15), exopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.67) hoặc pectat lyaza (E.C. 4.2.2.2)), hoặc các tổ hợp của chúng.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng “enzym phân giải chất xơ khác nữa” có thể bao gồm nhiều enzym phân giải chất xơ khác nữa.

Theo một phương án, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với ít nhất một xylanaza, ít nhất một β -glucanaza và ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa.

Theo một phương án khác, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với ít nhất một xylanaza, ít nhất một β -glucanaza và hai (hoặc ít nhất là hai) enzym phân giải chất xơ khác nữa.

Theo một phương án khác, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với ít nhất một xylanaza, ít nhất một β -glucanaza và ba (hoặc ít nhất là ba) enzym phân giải chất xơ khác nữa.

Theo một phương án khác, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với ít nhất một xylanaza, ít nhất một β -glucanaza và bốn (hoặc ít nhất là bốn) enzym phân giải chất xơ khác nữa.

Theo một phương án, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với môi trường lỏng hoặc sản phẩm lên men ở trạng thái rắn chứa hoạt tính hoặc các hoạt tính enzym có thể đo được theo sáng chế.

Theo một phương án, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với các enzym theo sáng chế, các enzym này ở dạng đã được phân lập hoặc đã được tinh chế.

Theo một phương án, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với các enzym theo sáng chế, các enzym này là các enzym ngoại sinh đối với DFM trong chế phẩm (ví dụ, nếu DFM là chủng sản xuất enzym).

Tốt hơn là, (các) enzym phân giải chất xơ có mặt trong thức ăn chăn nuôi với lượng nằm từ khoảng 0,05 đến 5 g protein enzym trong mỗi hệ mét (MT: metric ton) thức ăn (hoặc mg/kg).

Thích hợp là, từng enzym phân giải chất xơ có thể có mặt trong thức ăn chăn nuôi với lượng nằm từ khoảng 0,05 đến 5 g protein enzym trong mỗi hệ mét (MT) thức ăn (hoặc mg/kg).

Thích hợp là, toàn bộ enzym phân giải chất xơ có mặt trong thức ăn chăn nuôi với lượng nằm từ khoảng 0,05 đến 5 g protein enzym trong mỗi hệ mét (MT) thức ăn (hoặc mg/kg).

Tốt hơn là, (các) enzym phân giải chất xơ có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn (hoặc hỗn hợp trộn sẵn) với lượng nằm từ khoảng 0,05 đến 100 mg protein/g chế phẩm (ví dụ, với tổng lượng bao gồm trong khẩu phần ăn nằm trong khoảng từ 50 đến 1000g/MT).

Thích hợp là, từng enzym phân giải chất xơ có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn (hoặc hỗn hợp trộn sẵn) với lượng nằm từ khoảng 0,05 đến 100 mg protein/g chế phẩm (ví dụ, với tổng lượng bao gồm trong khẩu phần ăn nằm trong khoảng từ 50 đến 1000g/MT).

Thích hợp là, toàn bộ enzym phân giải chất xơ có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn (hoặc hỗn hợp trộn sẵn) với lượng nằm từ khoảng 0,05 đến 100 mg protein/g chế phẩm (ví dụ, với tổng lượng bao gồm trong khẩu phần ăn nằm trong khoảng từ 50 đến 1000g/MT).

Theo phương án được ưu tiên, enzym phân giải chất xơ (ví dụ, từng enzym phân giải chất xơ hoặc toàn bộ enzym phân giải chất xơ) có thể có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn (hoặc hỗn hợp trộn sẵn) với lượng nằm từ khoảng 50 đến khoảng 700 g/MT thức ăn. Thích hợp là, enzym phân giải chất xơ (ví dụ, từng enzym phân giải chất xơ hoặc toàn bộ enzym phân giải chất xơ) có thể có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn (hoặc hỗn hợp trộn sẵn) với lượng nằm từ khoảng 100 đến khoảng 500 g/MT thức ăn.

Theo một phương án, (các) enzym phân giải chất xơ khác nữa được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) xenlobiohydrolaza (E.C. 3.2.1.176 và E.C. 3.2.1.91).

Theo một phương án khác, (các) enzym phân giải chất xơ khác nữa được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21).

Thích hợp là, enzym phân giải chất xơ khác nữa có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) xenlobiohydrolaza (E.C. 3.2.1.176 và E.C. 3.2.1.91), β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21) hoặc các tổ hợp của chúng.

Theo một phương án khác, (các) enzym phân giải chất xơ khác nữa được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) β -xylosidaza (E.C. 3.2.1.37).

Theo một phương án, (các) enzym phân giải chất xơ được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) feruloyl esteraza (E.C. 3.1.1.73).

Theo một phương án khác, enzym phân giải chất xơ khác nữa được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) α -arabinofuranosidaza (E.C. 3.2.1.55).

Theo một phương án khác, nữa (các) enzym phân giải chất xơ khác nữa được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) pectinaza (ví dụ, endopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.15), exopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.67) hoặc pectat lyaza (E.C. 4.2.2.2)).

Theo phương án được ưu tiên, (các) enzym phân giải chất xơ khác nữa được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) một hoặc nhiều hơn (thích hợp là hai hoặc hai hoặc nhiều hơn hai, thích hợp là ba) pectinaza được chọn từ nhóm bao gồm: endopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.15), exopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.67) và pectat lyaza (E.C. 4.2.2.2).

Theo một phương án, (các) enzym phân giải chất xơ khác nữa được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) xenlobiohydrolaza (E.C. 3.2.1.176 và E.C. 3.2.1.91), β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21), β -xylosidaza (E.C. 3.2.1.37), feruloyl esteraza (E.C. 3.1.1.73), α -arabinofuranosidaza (E.C. 3.2.1.55), và/hoặc pectinaza (ví dụ, endopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.15), exopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.67) hoặc pectat lyaza (E.C. 4.2.2.2)).

Sáng chế đề xuất tổ hợp của ít nhất một xylanaza, với ít nhất một β -glucanaza và ít nhất DFM đặc hiệu được nêu trong bản mô tả này.

Theo phương án được ưu tiên, ít nhất một xylanaza, ít nhất một β -glucanaza và ít nhất DFM đặc hiệu được nêu trong bản mô tả này có thể được kết hợp với enzym phân giải chất xơ khác nữa được nêu trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề xuất tổ hợp của ít nhất một xylanaza và ít nhất một β -glucanaza, với ít nhất hai, như ít nhất ba hoặc ít nhất bốn hoặc ít nhất năm, enzym phân giải chất xơ khác nữa và ít nhất DFM đặc hiệu được nêu trong bản mô tả này.

Xylanaza là tên được đặt cho lớp mà phân giải polysacarit beta-1,4-xylan mạch thẳng thành xyloza, nhờ đó phá vỡ hemixenluloza, là một trong số các thành phần chính của thành tế bào thực vật.

Xylanaza được sử dụng trong sáng chế có thể là xylanaza có bán trên thị trường bất kỳ.

Thích hợp là, xylanaza có thể là endo-1,4- β -d-xylanaza (được phân loại là E.C. 3.2.1.8).

Theo một phương án, tốt hơn là xylanaza là endoxylanaza, ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza. Chỉ số phân loại cho endo-1,4- β -d-xylanaza là E.C. 3.2.1.8.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất DFM trong tổ hợp với endoxylanaza, ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza, và enzym khác.

Tất cả các chỉ số phân loại enzym E.C. được đề cập đến trong bản mô tả này có liên quan đến các chỉ số phân loại được nêu trong ấn phẩm Enzyme Nomenclature – Recommendations (1992) của Hội đồng danh pháp thuộc Liên minh quốc tế về sinh hóa và sinh học phân tử – ISBN 0-12-226164-3.

Thích hợp là, xylanaza được sử dụng trong sáng chế có thể là xylanaza từ *Bacillus* hoặc *Trichoderma*.

Theo một phương án, xylanaza có thể là xylanaza chứa (hoặc bao gồm) trình tự amino axit được thể hiện trong bản mô tả này là SEQ ID No. 1, xylanaza chứa (hoặc bao gồm) trình tự amino axit được thể hiện trong bản mô tả này là SEQ ID No. 2 hoặc xylanaza chứa (hoặc bao gồm) trình tự amino axit được thể hiện trong bản mô tả này là SEQ ID No. 3 (FveXyn4), xylanaza từ *Trichoderma reesei*, Econase XT™ hoặc Rovabio Excel™.

Theo một phương án, xylanaza có thể là xylanaza trong Axtra XAP® hoặc Avizyme 1502® hoặc AxtraXB™, cả hai sản phẩm này đều có bán trên thị trường từ Danisco A/S.

Theo một phương án được ưu tiên, xylanaza được sử dụng trong sáng chế có thể là một hoặc nhiều hơn xylanaza trong số các xylanaza trong một hoặc nhiều hơn sản phẩm thương mại trong số các sản phẩm thương mại nêu dưới đây:

Tên thương mại ®	Công ty	Loại xylanaza	Nguồn xylanaza
Allzyme PT	Alltech	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Aspergillus Niger</i>
Amylofeed	Andrés Pinaluba S.A	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Aspergillus Niger (phoenicis)</i>
Avemix 02 CS	Aveve	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma reesei</i>
AveMix XG 10	Aveve, NL	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma reesei</i>
Avizyme 1100	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Avizyme 1110	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Avizyme 1202	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Avizyme 1210	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Avizyme 1302	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Avizyme 1500	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Avizyme 1502	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Avizyme 1505	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Avizyme SX	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>

Axtra XAP	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Axtra XB	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Belfeed MP100	Beldem	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Bacillus subtilis</i>
Biofeed Combi	Novozymes A/S	endo-1,4- β -xylanaza	Được sản xuất ở <i>Aspergillus oryzae</i> mang gen từ <i>Thermomyces lanuginosis</i> và <i>Aspergillus aculeatus</i>
Biofeed Plus	DSM	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Humicola insolens</i>
Biofeed Wheat	Novozymes A/S	endo-1,4- β -xylanaza	Được sản xuất ở <i>Aspergillus oryzae</i> mang gen từ <i>Thermomyces lanuginosis</i>
Danisco Glycosidase (TPT/L)	Danisco Animal Nutrition	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma reesei</i>
Danisco Xylanase	Danisco	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma reesei</i>
Econase Wheat Plus	ABenzymes/ABVista	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma reesei</i>
Econase XT	ABVista	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma reesei</i>
Endofeed® DC	Andres Pintaluba S.A.	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Aspergillus Niger</i>
Feedlyve AXC	Lyven	endo-1,4- β -xylanaza	<i>Trichoderma koningii</i>
Feedlyve	Lyven	endo-1,4- β -	<i>Trichoderma</i>

AXL		xylanaza	<i>longibrachiatum</i>
Grindazym GP	Danisco	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Aspergillus Niger</i>
Grindazym GV	Danisco	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Aspergillus Niger</i>
Hostazym X	Huvepharma	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Kemzyme Plus Dry	Kemin	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma viride</i>
Kemzyme Plus Chất lỏng	Kemin	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma viride</i>
Kemzyme W Dry	Kemin	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma viride</i>
Kemzyme W Liquid	Kemin	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma viride</i>
Natugrain	BASF	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Natugrain TS Plus	BASF	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Aspergillus Niger</i>
Natugrain Wheat	BASF	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Aspergillus Niger</i>
Natugrain® TS/L	BASF	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Aspergillus Niger</i>
Natuzyme	Bioproton	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum /Trichoderma reesei</i>
Nutraxe Xyla	Nutrex	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Bacillus subtilis</i>
Porzyme 8100	Danisco	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Porzyme 8300	Danisco	endo-1,4- β -	<i>Trichoderma</i>

		xylanaza	<i>longibrachiatum</i>
Porzyme 9102	Danisco	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma</i> <i>longibrachiatum</i>
Porzyme 9310/Avizyme 1310	Danisco	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma</i> <i>longibrachiatum</i>
Porzyme tp100	Danisco	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma</i> <i>longibrachiatum</i>
Ronozyme AX	DSM	endo-1,4- β - xylanaza	Gen <i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i> được biểu hiện ở <i>Aspergillus oryzae</i>
Ronozyme WX	DSM/Novozymes	endo-1,4- β - xylanaza	Gen <i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i> được biểu hiện ở <i>Aspergillus oryzae</i>
Rovabio Excel	Adisseo	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Penicillium funiculosum</i>
Roxazyme G2	DSM/Novozymes	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma</i> <i>longibrachiatum</i>
Safizym X	Le Saffre	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma</i> <i>longibrachiatum</i>
Xylanase	Lyven	endo-1,4- β - xylanaza	<i>Trichoderma</i> <i>longibrachiatum</i>

Theo một phương án, xylanaza có thể là xylanaza chứa (hoặc bao gồm) trình tự polypeptit được thể hiện trong bản mô tả này là SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, hoặc SEQ ID No. 12; hoặc biến thể, thể tương đồng, mảnh hoặc thể phát sinh của chúng mà có độ đồng nhất là ít nhất 75% (như độ đồng nhất là ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98% hoặc 99%) với SEQ ID No. 1

hoặc SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, hoặc SEQ ID No. 12; hoặc trình tự polypeptit mà chứa SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, hoặc SEQ ID No. 12 với đột biến thể bảo toàn của ít nhất một trong số các amino axit.

Theo một phương án, xylanaza có thể chứa trình tự polypeptit được thể hiện trong bản mô tả này là SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 hoặc SEQ ID No. 3, hoặc biến thể, thể tương đồng, mảnh hoặc thể phát sinh của chúng mà có độ đồng nhất là ít nhất 98,5% (ví dụ, ít nhất 98,8 hoặc 99 hoặc 99,1 hoặc 99,5%) với SEQ ID No. 1 hoặc SEQ ID No. 2 hoặc SEQ ID No. 3

SEQ ID No. 1:

mklssflytaslvaa*IPTAIEPRQAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIK*
ADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNFSGFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWH
SQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTL
RKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGM
VPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSKVKEVAITELDI
RTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKP
AYTAVVNALR

SEQ ID No. 2:

*IPTAIEPRQAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIK*ADFGAVTPEN
SGKWDATEPSQGKFNFSGFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNI
NDKATLTKVIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNV
GNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQ
GV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSKVKEVAITELDIRTAPANDYAT
VTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAVVNAL
R

SEQ ID No. 3:

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDA
TEPSQGKFNFSGFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATL
TKVIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYV
GIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGI

GSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACL
NVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAVVNALR

SEQ ID No. 4:

mklsflytaslvaa*IP**TA**EPR*QASDSINKLIKNGKLYYGTTIDPNLLGVAKDTAIIKA
DFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNFSGFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVVHWS
QLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTNVVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLR
KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKL YINDYSLDSGSASKVTKGMV
PSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAITELDIR
TAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKA
AYTAVVNALR

SEQ ID No. 5:

IPTAIEPRQASDSINKLIKNGKLYYGTTIDPNLLGVAKDTAIIKADFGAVTPEN
 SGKWDATEPSQGKFNFSGFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNI
 NDKATLTKVIENHVTNVVGRYKGGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVF
 GNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQ
 GVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSQGVKEVAITELDIRTAPANDYAT
 VTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKAA YTA VVNAL
 R

SEQ ID No. 6:

QASDSINKLIKNGKGLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDA
TEPSQGKFNFSGFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNNDKATL
TKVIENHVTNNVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYV
GIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGI
GSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACL
NVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKAAYTAVVNALR

SEQ ID No. 7:

mvsfkyflaasalgalaAPVEVEESSWFNETALHEFAERAGTPSSTGWNNGYYYSFW
TDNGGTVNYQNGNGGSYSVQWKDTGNFVGGKGWNPGSARTINYSGSFNPSG
NAYLTVYGWTTNPLVEYYIVENYGTYNPGNGGTYRGSVYSDGANYNIYTAT
RYNAPSIEGDKTFTQYWSVRQSKRTGGTVTTANHFNAWAQLGMSLGTHNYQ
IVATEGYQSSGSSSITVY

SEQ ID No. 8:

APVEVEESSWFNETALHEFAERAGTPSSTGWNNGYYSFWTDNGGTVNYQN
 GNGGSYSVQWKDTGNFVGGKGWNPGSARTINYSGSFNPSGNAYLTVYGWTT
 NPLVEYYIVENYGTYNPGNGGTYRGSVYSDGANYNIYTATRYNAPSIEGDKT
 FTQYWSVRQSKRTGGTVTTANHFNAWAQLGMSLGTHNYQIVATEGYQSSGS
 SSITVY

SEQ ID No. 9:

AGTPSSTGWNNGYYSFWTDNGGTVNYQNGNGGSYSVQWKDTGNFVGGK
 GWNPGSARTINYSGSFNPSGNAYLTVYGWTTNPLVEYYIVENYGTYNPGNGG
 TYRGSVYSDGANYNIYTATRYNAPSIEGDKTFTQYWSVRQSKRTGGTVTTAN
 HFNAWAQLGMSLGTHNYQIVATEGYQSSGSSSITVY

SEQ ID No. 10:

MVSFTSLAAVSAVTGVMALPSAQPVDGMSVVERDPPTNVLDKRTQPTTGTS
 GGYYSFWTDTPNSVTYTNGNGGQFSMQWSGNGNHVGGKGWMPGTSRTIKY
 SGSYNPNGNSYLA VYGWTRNPLIEYYIVENFGTYNPSSGGQKKGEVNVDGSVYD
 IYVSTRVNAPSIDGNKTFQQYWSVRRNKRSSGSVNTGAHFQAWKNVGLNLGTHD
 YQILAVEGYSSGSASMTVSQ

SEQ ID No. 11:

*LPSAQPVDGMSVVERDPPTNVLDKRTQPTTGTS*GGYYFSFWTDTPNSVTYTNG
 NGGQFSMQWSGNGNHVGGKGWMPGTSRTIKYSGSYNPNGNSYLA VYGWTR
 NPLIEYYIVENFGTYNPSSGGQKKGEVNVDGSVYDIYVSTRVNAPSIDGNKTF
 QQYWSVRRNKRSSGSVNTGAHFQAWKNVGLNLGTHDYQILAVEGYSSGSA
 SMTVSQ

SEQ ID No. 12:

TQPTTGTSGGYYFSFWTDTPNSVTYTNGNGGQFSMQWSGNGNHVGGKGWM
 PGTSRTIKYSGSYNPNGNSYLA VYGWTRNPLIEYYIVENFGTYNPSSGGQKKG
 EVNVDGSVYDIYVSTRVNAPSIDGNKTFQQYWSVRRNKRSSGSVNTGAHFQA
 WKNVGLNLGTHDYQILAVEGYSSGSASMTVSQ

Tốt hơn là, xylanaza có mặt trong thức ăn chăn nuôi với lượng nằm từ khoảng 500XU/kg đến khoảng 16000XU/kg thức ăn, tốt hơn nữa là nằm từ khoảng 750XU/kg thức ăn đến khoảng 8000XU/kg thức ăn, và thậm chí tốt hơn nữa là nằm từ khoảng 1000XU/kg thức ăn đến khoảng 4000XU/kg thức ăn.

Theo một phương án, xylanaza có mặt trong thức ăn chăn nuôi với lượng lớn hơn khoảng 500XU/kg thức ăn, thích hợp là lớn hơn khoảng 600XU/kg thức ăn, thích hợp là lớn hơn khoảng 700XU/kg thức ăn, thích hợp là lớn hơn khoảng 800XU/kg thức ăn, thích hợp là lớn hơn khoảng 900XU/kg thức ăn, thích hợp là lớn hơn khoảng 1000XU/kg thức ăn.

Theo một phương án, xylanaza có mặt trong thức ăn chăn nuôi với lượng nhỏ hơn khoảng 16000XU/kg thức ăn, thích hợp là nhỏ hơn khoảng 8000XU/kg thức ăn, thích hợp là nhỏ hơn khoảng 7000XU/kg thức ăn, thích hợp là nhỏ hơn khoảng 6000XU/kg thức ăn, thích hợp là nhỏ hơn khoảng 5000XU/kg thức ăn, thích hợp là nhỏ hơn khoảng 4000XU/kg thức ăn.

Tốt hơn là, xylanaza có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn với lượng nằm từ khoảng 100XU/g đến khoảng 320000XU/g chế phẩm, tốt hơn nữa là nằm từ khoảng 300XU/g chế phẩm đến khoảng 160000XU/g chế phẩm, và thậm chí tốt hơn nữa là nằm từ khoảng 500XU/g chế phẩm đến khoảng 50000 XU/g chế phẩm, và thậm chí tốt hơn nữa là nằm từ khoảng 500XU/g chế phẩm đến khoảng 40000 XU/g chế phẩm.

Theo một phương án, xylanaza có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn với lượng lớn hơn khoảng 100XU/g chế phẩm, thích hợp là lớn hơn khoảng 200XU/g chế phẩm, thích hợp là lớn hơn khoảng 300XU/g chế phẩm, thích hợp là lớn hơn khoảng 400XU/g chế phẩm, thích hợp là lớn hơn khoảng 500XU/g chế phẩm.

Theo một phương án, xylanaza có mặt trong chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn với lượng nhỏ hơn khoảng 320000XU/g chế phẩm, thích hợp là nhỏ hơn khoảng 160000XU/g chế phẩm, thích hợp là nhỏ hơn khoảng 50000XU/g chế phẩm, thích hợp là nhỏ hơn khoảng 40000XU/g chế phẩm, thích hợp là nhỏ hơn khoảng 30000XU/g chế phẩm.

Hoạt tính xylanaza có thể được biểu diễn bằng đơn vị xylanaza (XU) được đo như được mô tả trong “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (XU)” được nêu trong bản mô tả này. Xem thêm ấn phẩm Bailey, M.J. Biely, P. and Poutanen, K., Journal of Biotechnology, Volume 23, (3), May 1992, 257-270, phần mô tả của ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, thích hợp là enzym được phân loại bằng cách sử dụng chỉ số phân loại E.C. nêu trên, và chỉ số phân loại E.C. này biểu thị enzym có hoạt tính đó

khi được thử nghiệm trong “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (XU)” được nêu trong bản mô tả này để xác định 1 XU.

Theo một phương án, xylanaza được sử dụng trong sáng chế có thể có hoạt tính xylanaza như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (ABX U/g)” được nêu trong bản mô tả này.

Hoạt tính enzym và thử nghiệm

Theo một phương án, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn có thể chứa DFM trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza.

Theo một phương án, hoạt tính xylanaza có thể được tính toán bằng “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (XU)” được nêu trong bản mô tả này.

Theo một phương án khác hoạt tính β -glucanaza có thể được tính toán bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (BGU)” được nêu trong bản mô tả này.

Thích hợp là, DFM trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza có thể được định liều như được thể hiện trong bảng dưới đây:

	Liều lượng thành phần cấu tạo cho mỗi g hoặc cho mỗi kg thức ăn chăn nuôi cuối cùng
Hoạt tính xylanaza (ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza)	500-16000 XU/kg (tốt hơn là 2500-4000 XU/kg)
Hoạt tính β -glucanaza	50-5000 BGU/kg (tốt hơn là 200-400 BGU/kg)
DFM	1×10^4 - 1×10^9 CFU/g (tốt hơn là 5×10^4 - 5×10^8 CFU/g)

Hoạt tính enzym được biểu diễn bằng đơn vị có thể được tính toán cho từng enzym như được mô tả trong các phần nêu trên.

Theo một số phương án, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn có thể chứa DFM trong tổ hợp với xylanaza, β -glucanaza và enzym phân giải chất xơ khác nữa được nêu trong bản mô tả này.

Thích hợp là, DFM, xylanaza, β -glucanaza và enzym phân giải chất xơ khác nữa có thể được định liều như được thể hiện trong bảng dưới đây:

	Liều lượng thành phần cấu tạo cho mỗi g hoặc cho mỗi kg thức ăn chăn nuôi cuối cùng
Hoạt tính xylanaza (ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza)	500-16000 (tốt hơn là 2500-4000 XU/kg)
Hoạt tính β -glucanaza	100-2500 CMC U/kg (tốt hơn là 800-1000 CMC U/kg)
DFM	1×10^3 - 1×10^9 CFU/g (tốt hơn là 5×10^4 - 5×10^8 CFU/g)
Enzym phân giải chất xơ khác nữa (ví dụ, là xylanaza khác và beta-glucosidaza)	>800 ABX U/kg (tốt hơn là >1200 ABX U/kg) >500 pNPG U/kg (tốt hơn là >800 pNPG U/kg)

Theo một phương án, tốt hơn là thức ăn chăn nuôi chứa các thành phần nêu dưới đây:

Xylanaza với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 1000 XU/kg đến 5000 XU/kg (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 2000 XU/kg đến 4500 XU/kg) thức ăn;

β -glucanaza với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 100 BGU/kg đến 4000 BGU/kg (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 150 BGU/kg đến 3000 BGU/kg); và

DFM được nêu trong bản mô tả này với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 50000 CFU/g đến 200000 CFU/g (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 70000 CFU/g đến 175000 CFU/g) thức ăn.

Theo một phương án khác, tốt hơn là thức ăn chăn nuôi chứa các thành phần nêu dưới đây:

Xylanaza với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 1000 XU/kg đến 5000 XU/kg (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 2000 XU/kg đến 4500 XU/kg) thức ăn;

β -glucanaza với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 100 BGU/kg đến 4000 BGU/kg (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 150 BGU/kg đến 3000 BGU/kg); và

DFM được nêu trong bản mô tả này với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 37500 CFU/g đến 100000 CFU/g (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 37500 CFU/g đến 75000 CFU/g) thức ăn.

Theo một phương án khác, tốt hơn là thức ăn chăn nuôi chứa các thành phần nêu dưới đây:

Xylanaza với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 1000 XU/kg đến 5000 XU/kg (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 2000 XU/kg đến 4500 XU/kg) thức ăn;

β -glucanaza với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 200 đến 2000 CMC U/kg (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 500 đến 1500 CMC U/kg) thức ăn;

DFM được nêu trong bản mô tả này với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 50000 CFU/g đến 200000 CFU/g (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 70000 CFU/g đến 175000 CFU/g) thức ăn; và

hỗn hợp enzym phân giải chất xơ khác nữa chứa từ ít nhất 800 đến 3500 ABX U/kg (thích hợp là từ ít nhất 1000 đến 2750 ABX U/g) thức ăn và từ 500 đến 3000 pNPG U/kg (thích hợp là từ ít nhất 600 đến 2000 pNPG U/kg) thức ăn.

Theo một phương án khác, tốt hơn là thức ăn chăn nuôi chứa các thành phần nêu dưới đây:

xylanaza với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 1000 XU/kg đến 5000 XU/kg (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 2000 XU/kg đến 4500 XU/kg) thức ăn;

β -glucanaza với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 200 đến 2000 CMC U/kg (thích hợp là lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 500 đến 1500 CMC U/kg) thức ăn;

DFM được nêu trong bản mô tả này với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 37500 CFU/g đến 100000 CFU/g (thích hợp là với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất là 37500 CFU/g đến 75000 CFU/g) thức ăn; và

hỗn hợp enzym phân giải chất xơ khác nữa chứa từ ít nhất 800 đến 3500 ABX U/kg (thích hợp là từ ít nhất 1000 đến 2750 ABX U/g) thức ăn và từ 500 đến 3000 pNPG U/kg (thích hợp là từ ít nhất 600 đến 2000 pNPG U/kg) thức ăn.

Theo một phương án, DFM có thể được định liều theo số đơn vị xylanaza có mặt trong chế phẩm. Theo một phương án, DFM có thể được định liều nằm trong

khoảng từ $6,25 \times 10^1$ CFU DFM: 1 XU enzym đến 2×10^9 CFU DFM: 1 XU enzym; tốt hơn là nằm trong khoảng từ $1,88 \times 10^4$ CFU DFM: 1 XU enzym đến $1,0 \times 10^7$ CFU DFM: 1 XU enzym. DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza.

Theo một phương án khác, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với xylanaza, β -glucanaza và enzym phân giải chất xơ khác nữa. Theo phương án được ưu tiên, enzym phân giải chất xơ khác nữa có thể là β -glucosidaza.

Theo một phương án, xylanaza được sử dụng trong sáng chế có thể có hoạt tính xylanaza như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (ABX U/g)” được nêu trong bản mô tả này.

Theo một phương án khác, β -glucanaza được sử dụng trong sáng chế có thể có hoạt tính β -glucanaza như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (CMC U/g)” được nêu trong bản mô tả này.

Theo một phương án khác nữa, β -glucosidaza được sử dụng trong sáng chế có thể có hoạt tính β -glucosidaza như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucosidaza (pNPG U/g)” được nêu trong bản mô tả này.

Theo một phương án, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza, trong đó xylanaza và β -glucanaza có các hoạt tính được thể hiện trong các bảng nêu dưới đây:

	Khoảng giá trị hoạt tính tính bằng đơn vị/g của từng hoạt tính enzym trong chế phẩm
Hoạt tính xylanaza (ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza)	1500-6000 ABX U/g ¹
Hoạt tính β -glucanaza	500-4000 CMC U/g ²

	Khoảng giá trị hoạt tính tính bằng đơn vị/g của từng hoạt tính enzym trong chế phẩm
Hoạt tính xylanaza (ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza)	2000-6000 ABX U/g ¹ (tốt hơn là >3000 ABX u/g)
Hoạt tính β -glucanaza	1000-3500 CMC U/g ² (tốt hơn là khoảng

	2000-2600) CMC u/g)
--	---------------------

¹ một đơn vị ABX được định nghĩa là lượng enzym cần để tạo ra 1 μmol đường lượng đường khử xyloza trong mỗi phút ở 50°C và độ pH=5,3.

² một đơn vị CMC của hoạt tính giải phóng 1 μmol đường khử (được biểu diễn dưới dạng đường lượng glucoza) trong một phút ở 50°C và độ pH=4,8.

Theo phương án được ưu tiên, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với xylanaza, β -glucanaza và β -glucosidaza, trong đó xylanaza, β -glucanaza và β -glucosidaza có các hoạt tính được thể hiện trong các bảng nêu dưới đây:

	Khoảng giá trị hoạt tính tính bằng đơn vị/g của từng hoạt tính enzym trong chế phẩm
Hoạt tính xylanaza (ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza)	1500-6000 ABX U/g ¹
Hoạt tính β -glucanaza	500-4000 CMC U/g ²
Hoạt tính β -glucosidaza	200-3500 pNPG U/g ³

	Khoảng giá trị hoạt tính tính bằng đơn vị/g của từng hoạt tính enzym trong chế phẩm
Hoạt tính xylanaza (ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza)	2000-6000 ABX U/g ¹ (tốt hơn là >3000 ABX U/g)
Hoạt tính β -glucanaza	1000-3500 CMC U/g ² (tốt hơn là khoảng 2000-2600) CMC U/g)
Hoạt tính β -glucosidaza	300-3000 pNPG U/g ³ (tốt hơn là >2000 pNPG U/g)

¹ một đơn vị ABX được định nghĩa là lượng enzym cần để tạo ra 1 μmol đường lượng đường khử xyloza trong mỗi phút ở 50°C và độ pH=5,3.

² một đơn vị CMC của hoạt tính giải phóng 1 μmol đường khử (được biểu diễn dưới dạng đường lượng glucoza) trong một phút ở 50°C và độ pH=4,8.

³ một đơn vị pNPG chỉ 1 μmol nitro-phenol được giải phóng từ para-nitrophenyl-B-D-glucopyranosit trong mỗi phút ở 50°C và độ pH=4,8.

Theo một phương án, xylanaza và β -glucanaza được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) lớn hơn khoảng 3000 ABX u/g hoạt tính xylanaza và khoảng 2000 đến 2600 CMC u/g hoạt tính β -glucanaza, một cách tương ứng.

Thích hợp là, xylanaza, β -glucanaza và β -glucosidaza được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) lớn hơn khoảng 3000 ABX u/g hoạt tính xylanaza, khoảng 2000 đến 2600 CMC u/g hoạt tính β -glucanaza và lớn hơn khoảng 2000 pNPG u/g hoạt tính β -glucosidaza, một cách tương ứng.

Theo một phương án, xylanaza được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) ít nhất 2000 ABX u/g hoạt tính xylanaza (thích hợp là ít nhất 2500 ABX u/g hoạt tính, thích hợp là ít nhất 3000 ABX u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (ABX U/g)”.

Thích hợp là, xylanaza được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) từ khoảng 2000 đến khoảng 5000 ABX u/g hoạt tính xylanaza (thích hợp là từ ít nhất khoảng 2500 đến khoảng 4000 ABX u/g hoạt tính, thích hợp là từ ít nhất khoảng 3000 đến khoảng 4000 ABX u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (ABX U/g)”.

Theo một phương án khác, β -glucanaza được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) ít nhất 1000 CMC u/g hoạt tính β -glucanaza (thích hợp là ít nhất 1500 CMC u/g hoạt tính, thích hợp là ít nhất 2000 CMC u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (CMC U/g)”.

Thích hợp là, β -glucanaza được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) từ khoảng 600 đến khoảng 4000 CMC u/g hoạt tính β -glucanaza (thích hợp là từ ít nhất khoảng 1000 đến khoảng 3000 CMC u/g hoạt tính, thích hợp là từ ít nhất khoảng 1500 đến khoảng 2600 CMC u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (CMC U/g)”.

Theo một phương án khác, β -glucosidaza được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm hoặc bao gồm) ít nhất 300 pNPG u/g hoạt tính β -glucosidaza (thích hợp là ít nhất 500 pNPG u/g hoạt tính, thích hợp là ít nhất 1000 pNPG u/g hoạt tính hoặc thích hợp là ít nhất 2000 pNPG u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucosidaza (pNPG U/g)”.

Thích hợp là, β -glucosidaza được sử dụng trong sáng chế có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) từ khoảng 200 đến khoảng 4000 pNPG u/g hoạt tính β -glucosidaza (thích hợp là từ ít nhất khoảng 300 đến khoảng 3000 pNPG u/g hoạt tính, thích hợp là từ ít nhất khoảng 1000 đến khoảng 3000 pNPG u/g hoạt tính hoặc thích hợp là từ ít nhất khoảng 2000 đến khoảng 3000 pNPG u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucosidaza (pNPG U/g)”.

Thích hợp là, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza chứa (hoặc về cơ bản bao gồm hoặc bao gồm) ít nhất 2000 ABX u/g hoạt tính xylanaza (thích hợp là ít nhất 2500 ABX u/g hoạt tính, thích hợp là ít nhất 3000 ABX u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (ABX U/g)”; và ít nhất 1000 CMC u/g hoạt tính β -glucanaza (thích hợp là ít nhất 1500 CMC u/g hoạt tính, thích hợp là ít nhất 2000 CMC u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (CMC U/g)”.

Thích hợp là, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với xylanaza, β -glucanaza và β -glucosidaza chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) ít nhất 2000 ABX u/g hoạt tính xylanaza (thích hợp là ít nhất 2500 ABX u/g hoạt tính, thích hợp là ít nhất 3000 ABX u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (ABX U/g)”; và ít nhất 1000 CMC u/g hoạt tính β -glucanaza (thích hợp là ít nhất 1500 CMC u/g hoạt tính, thích hợp là ít nhất 2000 CMC u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (CMC U/g)”; và ít nhất 300 pNPG u/g hoạt tính β -glucosidaza (thích hợp là ít nhất 500 pNPG u/g hoạt tính, thích hợp là ít nhất 1000 pNPG u/g hoạt tính hoặc thích hợp là ít nhất 2000 pNPG u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucosidaza (pNPG U/g)”.

Theo một phương án, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) từ khoảng 2000 đến khoảng 5000 ABX u/g hoạt tính xylanaza (thích hợp là từ ít nhất khoảng 2500 đến khoảng 4000 ABX u/g hoạt tính, thích hợp là từ ít nhất khoảng 3000 đến khoảng 4000 ABX u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (ABX U/g)”; và từ khoảng 600 đến khoảng 4000 CMC u/g hoạt tính β -glucanaza (thích hợp là từ ít nhất khoảng 1000 đến khoảng 3000 CMC u/g hoạt tính,

thích hợp là từ ít nhất khoảng 1500 đến khoảng 2600 CMC u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (CMC U/g)”.

Thích hợp là, DFM được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong tổ hợp với xylanaza, β -glucanaza và β -glucosidaza chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) từ khoảng 2000 đến khoảng 5000 ABX u/g hoạt tính xylanaza (thích hợp là từ ít nhất khoảng 2500 đến khoảng 4000 ABX u/g hoạt tính, thích hợp là từ ít nhất khoảng 3000 đến khoảng 4000 ABX u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính xylanaza (ABX U/g)”; từ khoảng 600 đến khoảng 4000 CMC u/g hoạt tính β -glucanaza (thích hợp là từ ít nhất khoảng 1000 đến khoảng 3000 CMC u/g hoạt tính, thích hợp là từ ít nhất khoảng 1500 đến khoảng 2600 CMC u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (CMC U/g)”; và từ khoảng 200 đến khoảng 4000 pNPG u/g hoạt tính β -glucosidaza (thích hợp là từ ít nhất khoảng 300 đến khoảng 3000 pNPG u/g hoạt tính, thích hợp là từ ít nhất khoảng 1000 đến khoảng 3000 pNPG u/g hoạt tính hoặc thích hợp là từ ít nhất khoảng 2000 đến khoảng 3000 pNPG u/g hoạt tính) như được xác định bằng “thử nghiệm hoạt tính β -glucosidaza (pNPG U/g)”.

“Thử nghiệm hoạt tính xylanaza (XU)”

Hoạt tính xylanaza có thể được biểu diễn bằng đơn vị xylanaza (XU) được đo ở độ pH=5,0 với AZCL-arabinoxylan (arabinoxylan lúa mì được liên kết ngang với azurin (azurine-crosslinked wheat arabinoxylan), viên nén Xylazyme 100 mg, Megazyme) làm cơ chất. Quá trình thủy phân bằng endo-(1-4)- β -D-xylanaza (xylanaza) tạo ra các mảnh đã được nhuộm hòa tan trong nước, và tốc độ giải phóng của chúng (sự tăng độ hấp thụ ở 590 nm) có thể có liên quan trực tiếp đến hoạt tính enzym. Đơn vị xylanaza (XU) được xác định dựa vào enzym tiêu chuẩn (Danisco Xylanase, có sẵn từ Danisco Animal Nutrition) ở điều kiện phản ứng tiêu chuẩn, là 40 °C, thời gian phản ứng là 10 phút trong đệm McIlvaine, độ pH=5,0.

Hoạt tính xylanaza của enzym tiêu chuẩn được xác định là lượng của các nhóm kết thúc của đường khử được giải phóng từ cơ chất xylan lúa mì spelt-yến mạch trong mỗi phút ở độ pH=5,3 và 50°C. Các nhóm kết thúc của đường khử phản ứng với axit 3,5-dinitrosalixylic và sự tạo thành sản phẩm phản ứng có thể được đo dưới dạng sự tăng độ hấp thụ ở 540 nm. Hoạt tính enzym được định lượng dựa vào đường chuẩn của xyloza (đương lượng đường khử). Một đơn vị xylanaza (XU) là lượng enzym tiêu

chuẩn mà giải phóng 0,5 μmol đương lượng đường khử trong mỗi phút ở độ pH=5,3 và 50°C.

“Thử nghiệm hoạt tính xylanaza (ABX U/g)”

Hoạt tính xylanaza có thể được biểu diễn bằng đơn vị xylanaza gỗ phong axit (ABX U: acid birchwood xylanase unit) được đo ở độ pH=5,3 với 4-O methyl glucuronoxylan gỗ phong làm cơ chất. Hút bằng pipet 1,8 ml dung dịch cơ chất 4-O methyl glucuronoxylan gỗ phong 1% vào mỗi ống thử nghiệm. Ủ trong 10 đến 15 phút, để cho cân bằng ở 50°C. Hút bằng pipet 0,2 ml dịch pha loãng enzym bằng cách sử dụng pipet chuyển dịch dương (positive displacement pipette) hoặc dạng tương đương. Lắc xoáy để trộn. Ủ mỗi mẫu ở 50°C trong chính xác là 5 phút. Thêm 3 ml dung dịch muối natri của axit 3,5-nitrosalixylic (DNS) 1% và trộn. Đậy phần trên của các ống thử nghiệm bằng nắp để ngăn không cho bay hơi. Đặt các ống thử nghiệm trong bể đun sôi trong chính xác là 5 phút. Làm nguội các ống thử nghiệm trong 10 phút trong bể nước đá/nước. Ủ ống thử nghiệm trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Chuyển các thành phần trong ống thử nghiệm sang cuvet và đo tại 540 nm dựa vào nước đã được khử ion. Hiệu chỉnh độ hấp thụ đối với màu của nền bằng cách trừ mẫu trắng enzym tương ứng. Hoạt tính enzym được định lượng dựa vào đường chuẩn của xyloza (đương lượng đường khử).

Một đơn vị ABX được định nghĩa là lượng enzym cần để tạo ra 1 μmol đương lượng đường khử xyloza trong mỗi phút ở 50°C và độ pH=5,3.

“Thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (CMC U/g)”

Hoạt tính β -glucanaza có thể được biểu diễn bằng đơn vị CMC được đo ở độ pH=4,8 với muối carboxymethyl xenluloza natri (CMC) làm cơ chất. Hút bằng pipet 1 ml dung dịch muối carboxymethyl xenluloza natri (CMC) 1% (được điều chế bằng đệm natri axetat 0,05M) vào các ống đựng mẫu và mẫu trắng. Ủ các ống trong bể nước 50°C trong 10 phút. Hút bằng pipet 1 ml dịch pha loãng enzym vào các thời điểm cách nhau 15 giây vào các ống đựng mẫu. Trộn các ống sau mỗi lần thêm vào. Sau 10 phút, thêm 3 ml muối natri của axit 3,5-dinitrosalixylic (DNS) 1% theo thứ tự và thời gian giống như khi cho enzym vào các ống đựng mẫu. Thêm 3 ml DNS vào các ống đựng mẫu trắng. Sau khi thêm DNS vào, chuyển các ống thử nghiệm sang giá đựng khác không ở trong bể nước 50°C. Thêm 1 ml enzym đã được pha loãng vào các mẫu trắng tương ứng. Đóng nắp ống và đun sôi trong chính xác là 5 phút. Lấy ra khỏi

bể nước 100°C và đặt vào bể nước đá trong 10 phút. Để ở nhiệt độ trong phòng trong 10 đến 15 phút. Chuyển sang cuvet loại 3 ml. Từng mẫu được đọc ở 540 nm dựa vào nước đã được khử ion bằng cách sử dụng mẫu chất thử trắng để để chuẩn hóa thiết bị đo khối phổ về giá trị 0. Hoạt tính enzym được định lượng dựa vào đường chuẩn của glucoza (đương lượng đường khử).

Một đơn vị CMC của hoạt tính giải phóng 1 μmol đường khử (được biểu diễn dưới dạng đương lượng glucoza) trong một phút ở 50°C và độ pH=4,8.

“Thử nghiệm hoạt tính β -glucanaza (BGU)”

Hoạt tính beta-glucanaza có thể được biểu diễn bằng đơn vị beta-glucanaza (BGU) được đo ở độ pH=5,0 với AZCL-glucan (β -glucan lúa mạch đã được liên kết ngang với azurin (azurine-cross linked barley β -glucan), viên nén Glucazyme 100 mg, Megazyme) làm cơ chất. Quá trình thủy phân bằng beta-glucanaza tạo ra các mảnh đã được nhuộm hòa tan, và tốc độ giải phóng của chúng (sự tăng độ hấp thụ ở 590 nm) có thể có liên quan trực tiếp đến hoạt tính enzym. Đơn vị beta-glucanaza (BGU) được xác định dựa vào enzym tiêu chuẩn (Multifect BGL, có sẵn từ Danisco Animal Nutrition) ở điều kiện phản ứng tiêu chuẩn, là 50 °C, thời gian phản ứng là 10 phút trong đệm axetat 0,1M, độ pH=5,0.

Hoạt tính beta-glucanaza của enzym tiêu chuẩn được xác định là lượng của các nhóm kết thúc của đường khử được giải phóng từ cơ chất glucan lúa mạch trong mỗi phút ở độ pH=5,0 và 50°C. Các nhóm kết thúc của đường khử phản ứng với axit 3,5-dinitrosalixylic và sự tạo thành sản phẩm phản ứng có thể được đo dưới dạng sự tăng độ hấp thụ ở 540 nm. Hoạt tính enzym được định lượng dựa vào đường chuẩn của glucoza (đương lượng đường khử). Một đơn vị beta-glucanaza (BGU) là lượng enzym tiêu chuẩn mà giải phóng 2,4 μmol đương lượng đường khử trong mỗi phút ở độ pH=5,0 và 50°C.

“Thử nghiệm hoạt tính β -glucosidaza (pNPG U/g)”

Hoạt tính β -glucosidaza có thể được biểu diễn bằng đơn vị pNPG được đo ở độ pH=4,8 với para-nitrophenyl-B-D-glucopyranosit (pNPG) làm cơ chất. Hút bằng pipet 1 ml dung dịch nitrophenyl-beta-D-glucopyranosit (pNPG) 3% (được điều chế bằng đệm natri axetat 0,05M) vào các ống thử nghiệm lặp lại hai lần cho mỗi mẫu và đối chứng. Đặt vào bể nước 50°C trong 5 phút. Thêm 200 μl đối chứng hoặc mẫu vào các ống lặp lại hai lần tương ứng của chúng tại các thời điểm cách nhau từ 15 đến 30 giây.

Thêm 200 μ l đệm natri axetat vào ống đựng mẫu chất thử trắng. Lắc xoáy từng ống sau khi thêm mẫu vào. Ủ các ống trong chính xác là 10 phút. Sau 10 phút ủ, thêm 500 μ l dung dịch natri cacbonat 1M vào để làm dừng phản ứng. Lắc xoáy từng ống sau khi thêm và đặt ống trong giá đựng bên ngoài bể nước. Thêm 10 ml nước milli-Q vào mỗi ống và lắc xoáy để trộn. Nồng độ của 4-nitrophenol được đo bằng cách đọc từng mẫu ở 400 nm bằng cách sử dụng mẫu chất thử trắng để chuẩn hóa thiết bị đo khối phổ về giá trị 0.

Một đơn vị pNPG chỉ 1 μ mol nitro-phenol được giải phóng từ para-nitrophenyl-B-D-glucopyranosit trong mỗi phút ở 50°C và độ pH=4,8.

Ưu điểm

Sự tương tác của các DFM với xylanaza và β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa) rất phức tạp và không bị ràng buộc bởi lý thuyết, rất bất ngờ là các tác giả sáng chế có thể nhận thấy sự gia tăng sản xuất các axit béo chuỗi ngắn trong GIT của động vật.

Tổ hợp của các DFM đặc hiệu được nêu trong bản mô tả này với ít nhất một xylanaza và ít nhất một β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa) được phát hiện thấy là có ưu điểm đặc biệt trong thức ăn chăn nuôi và/hoặc ở đối tượng được cho ăn thức ăn chăn nuôi mà có lượng sản phẩm phụ dạng xơ cao (ví dụ, từ các ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học và xây xát).

Bất ngờ phát hiện ra rằng giá trị dinh dưỡng và khả năng tiêu hóa của thức ăn chăn nuôi chứa lượng đáng kể (đôi khi là từ 30 đến 60%) của các sản phẩm phụ dạng xơ (có hàm lượng polysacarit không phải tinh bột, ví dụ, chất xơ, cao) có thể được cải thiện đáng kể, giống như năng suất và sự tăng trọng của đối tượng được cho ăn thức ăn chăn nuôi này.

Một ưu điểm của sáng chế là sự cải thiện tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) được quan sát thấy nhờ sử dụng tổ hợp theo sáng chế.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, sự phân giải nguyên liệu trong khẩu phần ăn có nguồn gốc từ các hạt nằm trong thành tế bào thực vật mà chứa lượng polysacarit không phải tinh bột (NSP) cao bởi các xylanaza có thể được tối ưu hóa để cải thiện năng suất động vật khi kết hợp xylanaza (ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza) với một hoặc nhiều hơn β -glucanaza (và, tùy chọn, trong tổ hợp với một hoặc nhiều hơn enzym phân giải chất xơ khác nữa (ví dụ, xenlobiohydrolaza (E.C. 3.2.1.176 và E.C.

3.2.1.91), β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21), β -xylosidaza (E.C. 3.2.1.37), feruloyl esteraza (E.C. 3.1.1.73), α -arabinofuranosidaza (E.C. 3.2.1.55), pectinaza (ví dụ, endopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.15), exopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.67) hoặc pectat lyaza (E.C. 4.2.2.2)), hoặc các tổ hợp của chúng)) và một hoặc nhiều hơn vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM) đặc hiệu được chọn lọc dựa trên khả năng của chúng trong việc sản xuất các enzym và/hoặc khả năng của chúng trong việc sản xuất các axit béo chuỗi ngắn (SCFA) từ các pentoza có trong phân đoạn NSP trong điều kiện kỵ khí và/hoặc khả năng của chúng trong việc thúc đẩy các quần thể vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ trong GIT của đối tượng và/hoặc khả năng của chúng trong việc phân giải các đường C5.

Lý do tại sao tổ hợp này lại cải thiện được năng suất là vì sự hòa tan của chất xơ, đặc biệt là hemixenluloza, từ khẩu phần ăn được tối đa hóa trong ống tiêu hóa (GIT) của động vật. Sự hòa tan của hemixenluloza này không phải là luôn đủ để làm tăng năng suất vì các đường C5 được giải phóng không phải là nguồn năng lượng hiệu quả cho động vật khi chúng được hấp thụ (Savory C.J. Br. J. Nut. 1992, 67: 103-114), nhưng chúng sẽ là nguồn năng lượng hiệu quả hơn khi được chuyển hóa thành các axit béo chuỗi ngắn (SCFA) bởi các vi sinh vật trong GIT hoặc bởi các DFM.

Do đó, giá trị năng lượng từ các sản phẩm thực vật (ví dụ, các đồng sản phẩm (các sản phẩm phụ) của lúa mì, ngô, yến mạch, lúa mạch và ngũ cốc hoặc khẩu phần ăn chứa hạt hỗn hợp mà dễ tiếp cận được đối với các động vật có dạ dày một ngăn) có thể được tối ưu hóa bằng cách kết hợp xylanaza (ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza) và β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xenlobiohydrolaza (E.C. 3.2.1.176 và E.C. 3.2.1.91), β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21), β -xylosidaza (E.C. 3.2.1.37), feruloyl esteraza (E.C. 3.1.1.73), α -arabinofuranosidaza (E.C. 3.2.1.55), pectinaza (ví dụ, endopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.15), exopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.67) hoặc pectat lyaza (E.C. 4.2.2.2)), hoặc các tổ hợp của chúng)) và các DFM đặc hiệu mà có thể sản xuất các SCFA từ các pentoza có trong phân đoạn NSP trong điều kiện kỵ khí và/hoặc có thể điều biến các quần thể vi sinh vật trong GIT để làm tăng sự sản xuất SCFA từ các đường được giải phóng và/hoặc có thể sử dụng các đường C5. Các DFM có thể thay đổi thích nghi cơ chế chuyển hóa của chúng để làm tăng sự thủy phân chất xơ theo cách hiệp đồng trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất

một enzym phân giải chất xơ khác nữa). Việc sử dụng các DFM mà có thể sản xuất các enzym (phân giải chất xơ) có thể mang lại các lợi ích bổ sung và tối đa hóa các lợi ích của các enzym được thêm vào.

Các DFM đặc hiệu được chọn lọc dựa trên các hoạt tính enzym của chúng có thể được xem là chuỗi thức ăn vi khuẩn được điều khiển bởi glycan. Các DFM được chọn lọc một cách đặc hiệu được nêu trong bản mô tả này có thể ưu tiên sử dụng các chất xơ trong khẩu phần ăn, là một tính trạng cho phép chúng thực hiện các bước tiêu hóa glycan ban đầu để giải phóng các polysacarit ngắn hơn, dễ hòa tan hơn cho các vi khuẩn khác, ví dụ, các hệ vi sinh vật GIT nội sinh khác. Các DFM đặc hiệu được chọn lọc dựa trên sự chuyển hóa của chúng mà điều chỉnh theo các glycan được giải phóng bởi các enzym (ví dụ, xylanaza và β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa)) để cải thiện hiệu quả của các enzym được nêu trong bản mô tả này và tổ hợp của (các) DFM so với việc sử dụng tổ hợp của các enzym riêng lẻ hoặc việc sử dụng (các) DFM riêng lẻ.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, trong sáng chế, nguyên liệu trong khẩu phần ăn có nguồn gốc từ các hạt nằm trong thành tế bào thực vật mà giàu các glycan đặc hiệu nguồn, như xenluloza, hemixenluloza và pectin (nguyên liệu thực vật) hoặc các glycosaminoglycan đi vào ruột ngoại biên ở dạng hạt mà bị tấn công bởi các tác nhân phân giải glycan là các DFM đặc hiệu mà có khả năng gắn kết trực tiếp với các hạt không hòa tan này và tiêu hóa các thành phần glycan của chúng. Sau quá trình phân giải ban đầu các hạt chứa glycan này, các mảnh glycan dễ hòa tan hơn có thể được tiêu hóa bởi các tác nhân phân giải glycan thứ cấp có mặt trong manh tràng, mà góp phần giải phóng tập hợp sản phẩm lên men axit béo chuỗi ngắn (SCFA) mà có nguồn gốc từ cả hai loại tác nhân phân giải. Vì các SCFA bắt nguồn từ quá trình lên men hydrat cacbon và/hoặc quá trình lên men protein và quá trình loại nhóm amin bởi hệ vi sinh vật kỵ khí bản địa trong GIT, nên nồng độ SCFA có thể là chỉ số về quần thể sinh vật kỵ khí. SCFA có thể thực sự cung cấp nhiều lợi ích cho động vật chủ, đóng vai trò làm nhiên liệu chuyển hóa cho mô ruột non, cơ, thận, tim, gan và não, và còn tạo ra các tính chất kìm hãm vi khuẩn và diệt vi khuẩn chống lại các sinh vật như *Salmonella* và *E. coli*.

Giá trị dinh dưỡng của chất xơ trong động vật không nhai lại có thể có nguồn gốc chủ yếu từ quá trình sản xuất các axit béo chuỗi ngắn (SCFA) thông qua quá trình

lên men các chất xơ đã được hòa tan hoặc đã được phân giải bằng các enzym phân giải chất xơ có hiệu quả (ví dụ, xylanaza và β -glucanaza và/hoặc enzym phân giải chất xơ khác nữa được nêu trong bản mô tả này). Việc cung cấp xylanaza riêng lẻ không đủ để sử dụng các thành phần xơ trong khẩu phần ăn của động vật (đặc biệt là động vật không nhai lại). Có rất nhiều đặc tính hóa học tồn tại giữa các thành phần thức ăn có nguồn gốc từ thực vật. Việc ứng dụng enzym phụ thuộc vào các đặc tính của nguyên liệu thực vật (thức ăn). Chỉ nhằm ví dụ, trong hạt lúa mì, các arabinoxylan chiếm ưu thế, tuy nhiên, trong mì tấm, (là đồng sản phẩm (sản phẩm phụ) của quá trình xay xát lúa mì), hàm lượng của β -glucan tăng từ $8 \text{ g}^{-1} \text{ DM}$ (trong hạt) đến vượt quá $26 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$. Hỗn hợp enzym chứa phức hợp của xylanaza và β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa) có thể cải thiện giá trị dinh dưỡng của thức ăn chăn nuôi có lượng khẩu phần ăn dựa trên cơ sở (các) đồng sản phẩm ((các) sản phẩm phụ) cao.

Các SCFA có các giá trị năng lượng khác nhau và một số SCFA có thể đóng vai trò làm tiền chất của glucoza và một số SCFA có thể góp phần vào việc duy trì sức khỏe và sự nguyên vẹn của ruột. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các tổ hợp đặc hiệu được nêu trong bản mô tả này ưu tiên chuyển quá trình lên men trong GIT của động vật sang quá trình sản xuất SCFA có giá trị hơn/hữu dụng hơn.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các NSP có thể được phân giải một cách hiệu quả bởi tổ hợp của DFM theo sáng chế và xylanaza và β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa). Ngoài ra, đã phát hiện ra rằng tổ hợp đặc hiệu này giải phóng các đường C5 mà thường chỉ có giá trị dinh dưỡng bên lề đối với động vật. Tuy nhiên, nhờ sử dụng các tổ hợp được yêu cầu bảo hộ trong đơn này, có thể khiến cho các vi sinh vật trong GIT (hoặc DFM theo sáng chế) hoặc hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ (mà được kích thích bởi các tổ hợp (của DFM) theo sáng chế) chuyển hóa các đường C5 này thành các thành phần hữu dụng và có giá trị dinh dưỡng, đó là các axit béo chuỗi ngắn. Các axit béo chuỗi ngắn này có thể được sử dụng bởi động vật. Do đó, hệ này cải thiện giá trị dinh dưỡng của thức ăn chăn nuôi cho động vật.

Thuận lợi là, tổ hợp của vi sinh vật được nuôi trực tiếp, xylanaza và β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa) được nêu trong bản mô tả này bất ngờ làm tăng sự phân giải chất xơ trong chế phẩm phụ gia

dùng trong thức ăn, hỗn hợp trộn sẵn, thức ăn hoặc thức ăn chăn nuôi, dẫn đến sự cải thiện năng suất của đối tượng. Cụ thể, tổ hợp theo sáng chế cải thiện khả năng tiêu hóa nguyên liệu thô trong thức ăn, dẫn đến sự tăng độ sinh khả dụng của dưỡng chất (ví dụ, khả năng tiêu hóa dưỡng chất) và năng lượng có thể chuyển hóa được trong đó.

Chế phẩm của DFM với các enzym

DFM theo sáng chế và các enzym có thể được phối chế theo cách thích hợp bất kỳ để đảm bảo rằng chế phẩm này chứa các DFM có thể sống được và các enzym có hoạt tính.

Theo một phương án, DFM và các enzym có thể được phối chế dưới dạng bột khô hoặc viên cốm.

Bột khô hoặc viên cốm có thể được sản xuất bằng các cách đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, như trong thiết bị trộn các vi thành phần.

Theo một số phương án, DFM và/hoặc (các) enzym có thể được bao, ví dụ, được bao nang. Thích hợp là, DFM và các enzym có thể được phối chế trong cùng một lớp bao hoặc được bao nang trong cùng một viên nang. Theo cách khác, một hoặc hai hoặc ba hoặc bốn enzym trong số các enzym có thể được phối chế trong cùng một lớp bao hoặc được bao nang trong cùng một viên nang và DFM có thể được phối chế trong lớp bao riêng biệt với một hoặc nhiều hơn hoặc tất cả các enzym. Theo một số phương án, như khi DFM có khả năng tạo ra các nội bào tử, DFM có thể được cung cấp mà không có bất kỳ lớp bao nào. Trong các trường hợp này, các nội bào tử DFM có thể được trộn lẫn theo cách đơn giản với một hoặc hai hoặc ba hoặc bốn enzym. Trong trường hợp nêu sau, các enzym có thể được bao, ví dụ, được bao nang, ví dụ, một hoặc nhiều hơn hoặc tất cả các enzym có thể được bao, ví dụ, được bao nang. Các enzym có thể được bao nang dưới dạng các hỗn hợp (tức là chứa một hoặc nhiều hơn, hai hoặc nhiều hơn hai, ba hoặc nhiều hơn ba hoặc tất cả) chứa các enzym hoặc chúng có thể được bao nang một cách riêng biệt, ví dụ, dưới dạng các enzym riêng lẻ. Theo một phương án được ưu tiên, cả bốn enzym có thể được bao, ví dụ, được bao nang, cùng nhau.

Theo một phương án, lớp bao bảo vệ các enzym khỏi nhiệt và có thể được xem là lớp bảo vệ chống nhiệt.

Theo một phương án, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn được phối chế thành bột khô hoặc viên cốm như được mô tả trong WO2007/044968 (được gọi là viên cốm TPT), tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, DFM (ví dụ, các nội bào tử DFM) có thể được pha loãng bằng cách sử dụng chất pha loãng, như bột tinh bột, đá vôi hoặc chất tương tự.

Theo một phương án khác, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn có thể được phối chế bằng cách cấp, ví dụ, phun, (các) enzym lên trên cơ chất mang, như, ví dụ, lúa mì đã được nghiền nhỏ.

Theo một phương án, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế có thể được phối chế dưới dạng hỗn hợp trộn sẵn. Chỉ nhằm ví dụ, hỗn hợp trộn sẵn có thể chứa một hoặc nhiều hơn thành phần thức ăn, như một hoặc nhiều hơn khoáng chất và/hoặc một hoặc nhiều hơn vitamin.

Theo một phương án, DFM và/hoặc các enzym được sử dụng trong sáng chế được phối chế với ít nhất một chất mang có thể chấp nhận về mặt sinh lý được chọn từ ít nhất một trong số các chất: maltodextrin, đá vôi (canxi cacbonat), xyclodextrin, lúa mì hoặc thành phần lúa mì, sucroza, tinh bột, Na_2SO_4 , hoạt thạch, PVA, sorbitol, benzoat, sorbiat, glyxerol, sucroza, propylen glycol, 1,3-propan diol, glucoza, paraben, natri clorua, xitrat, axetat, phosphat, canxi, metabisulfit, format và các hỗn hợp của chúng.

Bao gói

Theo một phương án, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn và/hoặc hỗn hợp trộn sẵn và/hoặc thức ăn hoặc thức ăn chăn nuôi theo sáng chế được bao gói.

Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn và/hoặc hỗn hợp trộn sẵn và/hoặc thức ăn hoặc thức ăn chăn nuôi được bao gói trong túi, như túi giấy.

Theo phương án thay thế, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn và/hoặc hỗn hợp trộn sẵn và/hoặc thức ăn hoặc thức ăn chăn nuôi có thể được đóng kín trong vật chứa. Vật chứa thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng.

Sản phẩm phụ

Ngành công nghiệp thức ăn động vật đã thấy sự gia tăng cho ăn các sản phẩm phụ, ví dụ, từ quá trình chế biến nhiên liệu sinh học, cho động vật (nâng dạng thức ăn động vật này từ 0-10% đến cực điểm hiện tại là 30-60%). Các tiết kiệm về chi phí cho



khẩu phần ăn này là một cơ hội lớn cho ngành công nghiệp để tiết kiệm chi phí cho lượng thức ăn đầu vào, nhưng cũng đi kèm với nhiều thách thức. Các sản phẩm phụ thường là các sản phẩm có lượng chất xơ cao (ví dụ, chất xơ chiếm ít nhất khoảng 40%). Do đó, việc bao gồm sản phẩm phụ có lượng chất xơ cao (ví dụ, DDGS) có thể có tác động tiêu cực đối với hiệu suất tăng trưởng của động vật và các đặc tính của thịt xẻ. Ngoài các tác động tiêu cực đối với sự sinh trưởng của động vật và chất lượng của thịt xẻ, các thay đổi về khả năng tiêu hóa đường chất có các tác động đối với việc xử lý, lưu giữ và phân hủy phân (ví dụ, phân lợn).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sản phẩm phụ” có nghĩa là nguyên liệu thực vật dạng xơ bất kỳ, ví dụ, sản phẩm phụ mà chứa chất xơ với lượng là ít nhất khoảng 20% hoặc 30%).

Theo một phương án, thuật ngữ sản phẩm phụ có nghĩa là sản phẩm phụ bất kỳ của nguyên liệu thức ăn có lượng chất xơ cao.

Theo một phương án, sản phẩm phụ được đề cập đến trong bản mô tả này có thể được chọn từ một hoặc nhiều hơn sản phẩm trong số các sản phẩm sau đây: bột mầm ngô, cám ngô, bột ngô nghiền, bột gluten ngô, bã chưng cất khô cùng chất hòa tan (DDGS), bã chưng cất khô (DDG), bột gluten, phụ phẩm lúa mì hạt lớn, mì tấm hoặc các tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi theo sáng chế chứa sản phẩm phụ dạng xơ như bột mầm ngô, cám ngô, bột ngô nghiền, bột gluten ngô, bã chưng cất khô cùng chất hòa tan (DDGS), bã chưng cất khô (DDG), bột gluten, phụ phẩm lúa mì hạt lớn, mì tấm hoặc các tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, đối tượng mà được cho dùng tổ hợp của DFM, xylanaza và β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa) theo sáng chế hoặc chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế, còn được cho ăn thức ăn chăn nuôi chứa sản phẩm phụ dạng xơ như bột mầm ngô, cám ngô, bột ngô nghiền, bột gluten ngô, bã chưng cất khô cùng chất hòa tan (DDGS), bã chưng cất khô (DDG), bột gluten, phụ phẩm lúa mì hạt lớn, mì tấm hoặc các tổ hợp của chúng.

Phá vỡ hoặc phân giải

Enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) theo sáng chế hoặc như được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng để phá vỡ (phân giải) arabinoxylan không hòa tan (AXinsol) hoặc arabinoxylan hòa tan (AXsol) hoặc các tổ hợp của chúng, hoặc phân

giải các sản phẩm của AXinsol. Thuật ngữ “phá vỡ” hoặc “phân giải” đồng nghĩa với thuật ngữ “thủy phân”.

Polysacarit không phải tinh bột (NSP)

Phần chính của các thành phần thức ăn thực vật phổ biến bao gồm các hydrat cacbon, khiến cho các hydrat cacbon trở thành một yếu tố mang tính quyết định trong quá trình sản xuất động vật. Ngoài các dưỡng chất có thể tiêu hóa tốt, như tinh bột và đường, phân đoạn hydrat cacbon có nguồn gốc từ thực vật bao gồm các thành phần (xơ) không tiêu hóa được, như xenluloza, hemixenluloza, pectin, beta-glucan và lignin.

Tất cả các thành phần có khả năng tiêu hóa kém, ngoại trừ lignin, được phân loại là nhóm được gọi trong bản mô tả này là polysacarit không phải tinh bột (NSP). Phân đoạn NSP đã được biết rõ về các tác động kháng dinh dưỡng mà nó có thể tạo ra.

Theo một phương án, thuật ngữ chất xơ có thể được sử dụng theo cách có thể thay thế với thuật ngữ NSP.

Trong nhóm NSP, bản thân hemixenluloza là phân nhóm dị thể chủ yếu được tạo thành bởi xylan, arabinan, galatan, glucan và mannan. Arabinoxylan là phân đoạn NSP chủ yếu trong một số nguyên liệu thức ăn trong số các nguyên liệu thức ăn thô quan trọng nhất, bao gồm lúa mì và ngô.

Arabinoxylan (AX)

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “arabinoxylan” (AX) có nghĩa là polysacarit bao gồm khung xylan (các đơn vị xyloza được liên kết ở vị trí 1, 4) với L-arabinofuranoza (L-arabinoza ở dạng vòng có 5 nguyên tử) được gắn ngẫu nhiên bởi các liên kết $1\alpha \rightarrow 2$ và/hoặc $1\alpha \rightarrow 3$ vào các đơn vị xyloza trong khắp chuỗi. Arabinoxylan là hemixenluloza được phát hiện thấy ở cả thành tế bào sơ cấp và thứ cấp của thực vật. Arabinoxylan có thể được tìm thấy trong cám của các hạt như lúa mì, bắp (ngô), lúa mạch đen, và lúa mạch.

Arabinoxylan (AX) được phát hiện thấy là kết hợp chặt chẽ với thành tế bào thực vật, nơi mà nó đóng vai trò làm chất gắn kết liên kết các khối cấu tạo khác nhau của mô và thành tế bào thực vật, tạo ra cho nó cả độ cứng và độ bền về mặt cấu trúc.

Vì xyloza và arabinoza (là các thành phần cấu tạo của các arabinoxylan) đều là các pentoza, nên các arabinoxylan thường được phân loại là các pentosan.

AX là phân đoạn polysacarit không phải tinh bột (NSP) chủ yếu trong một số nguyên liệu thức ăn trong số các nguyên liệu thức ăn thô quan trọng nhất, bao gồm lúa mì và ngô.

Sự phong phú, vị trí của nó trong nguyên liệu thực vật và cấu trúc phân tử làm cho AX có tác động tiêu cực nghiêm trọng đối với khả năng tiêu hóa thức ăn, làm giảm đáng kể giá trị dinh dưỡng của nguyên liệu thô mà nó có mặt trong đó. Điều này khiến cho AX là một yếu tố kháng dinh dưỡng quan trọng, làm giảm hiệu quả sản xuất động vật.

AX cũng có thể giữ lượng nước đáng kể (có thể được gọi là khả năng giữ nước của nó) – điều này có thể làm cho arabinoxylan hòa tan để tạo ra độ nhớt (cao) – là một nhược điểm trong nhiều ứng dụng.

Arabinoxylan không hòa tan trong nước (AXinsol)

Arabinoxylan không hòa tan trong nước (AXinsol) còn được gọi là arabinoxylan không chiết được bằng nước (WU-AX) chiếm tỷ lệ đáng kể của lượng vật chất khô của nguyên liệu thực vật.

Trong lúa mì, AXinsol có thể chiếm 6,3% lượng vật chất khô. Trong cám mì và DDGS lúa mì, AXinsol có thể chiếm khoảng 20,8% hoặc 13,4% lượng vật chất khô (trọng lượng/trọng lượng).

Trong lúa mạch đen, AXinsol có thể chiếm 5,5% lượng vật chất khô.

Trong ngô, AXinsol có thể chiếm 5,1% lượng vật chất khô. Trong DDGS ngô, AXinsol có thể chiếm 12,6% lượng vật chất khô.

AXinsol gây ra hiện tượng bắt giữ dưỡng chất trong thức ăn. Lượng lớn các dưỡng chất có thể tiêu hóa tốt như tinh bột và các protein vẫn được chứa trong các nhóm cụm vật liệu thành tế bào hoặc vẫn được gắn kết với các mạch bên của AX. Các dưỡng chất bị bắt giữ này sẽ không khả dụng để tiêu hóa và hấp thụ sau đó trong ruột nhỏ.

Arabinoxylan hòa tan trong nước (AXsol)

Arabinoxylan hòa tan trong nước (AXsol) còn được gọi là arabinoxylan có thể chiết được bằng nước (WE-AX) có thể gây ra các vấn đề trong quá trình sản xuất nhiên liệu sinh học và/hoặc ủ mạch nha và/hoặc ủ rượu bia và/hoặc trong thức ăn vì chúng có thể làm tăng độ nhớt do khả năng liên kết với nước của AXsol.

Trong thức ăn, AXsol có thể có tác động kháng dinh dưỡng, đặc biệt là ở các động vật có dạ dày một ngăn vì chúng làm tăng đáng kể độ nhớt của các thành phần trong ruột, do khả năng liên kết với nước đặc biệt của AXsol. Độ nhớt tăng có thể gây tác động đến sự tiêu hóa thức ăn và sự sử dụng đường chất vì nó có thể ngăn cản quá trình trộn đúng cách thức ăn với các enzym tiêu hóa và các muối mật và/hoặc nó làm chậm sự hấp thụ và độ sinh khả dụng của đường chất và/hoặc nó kích thích sự lên men trong ruột sau.

Trong lúa mì, AXsol có thể chiếm 1,8% lượng vật chất khô. Trong cám mì và DDGS lúa mì, AXsol có thể chiếm khoảng 1,1% hoặc 4,9% lượng vật chất khô (trọng lượng/trọng lượng).

Trong lúa mạch đen, AXsol có thể chiếm 3,4% lượng vật chất khô.

Trong lúa mạch, AXsol có thể chiếm từ 0,4 đến 0,8% lượng vật chất khô.

Trong ngô, AXsol có thể chiếm 0,1% lượng vật chất khô. Trong DDGS ngô, AXinsol có thể chiếm 0,4% lượng vật chất khô.

Tuy nhiên, ngoài lượng AXsol có mặt trong nguyên liệu thực vật, khi xylanaza hòa tan AXinsol trong nguyên liệu thực vật, nó có thể giải phóng các pentosan và/hoặc các oligome mà đóng góp vào hàm lượng AXsol của nguyên liệu thực vật.

Một ưu điểm quan trọng của một số xylanaza trong số các xylanaza được nêu trong bản mô tả này là chúng có cả khả năng hòa tan AXinsol cũng như khả năng phá vỡ nhanh chóng và hiệu quả các oligome và/hoặc các pentosan đã được hòa tan, nhờ đó các enzym này có khả năng hòa tan Axinsol mà không làm tăng độ nhớt và/hoặc làm giảm độ nhớt.

Việc phá vỡ AXsol có thể làm giảm độ nhớt.

Việc phá vỡ AXsol có thể giải phóng các đường chất.

Độ nhớt

Sáng chế có thể được sử dụng để làm giảm độ nhớt trong quy trình bất kỳ trong đó khả năng liên kết với nước của AXsol gây ra sự tăng độ nhớt không mong muốn.

Sáng chế đề xuất việc làm giảm độ nhớt bằng cách phá vỡ (phân giải) AXsol hoặc bằng cách phá vỡ (phân giải) các polyme và/hoặc các oligome được tạo ra bằng cách hòa tan AXinsol.

Trong sáng chế, sự giảm độ nhớt có thể được tính toán bằng cách so sánh một mẫu chứa xylanaza theo sáng chế (hoặc được nêu trong bản mô tả này) so với mẫu

tương đương khác không chứa xylanaza theo sáng chế (hoặc được nêu trong bản mô tả này).

Việc so sánh profin giảm độ nhớt của xylanaza theo sáng chế với các xylanaza trong số các xylanaza chuẩn có trên thị trường chứng tỏ hiệu quả của enzym. Mục đích là nhằm cải thiện hiệu quả của enzym so với enzym chuẩn có trên thị trường. Các enzym chuẩn dùng cho các ứng dụng riêng lẻ được nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Theo một phương án của sáng chế, xylanaza được nêu trong bản mô tả này là chất làm giảm độ nhớt.

Thức ăn hoặc thức ăn chăn nuôi

Enzym hoặc chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế có thể được sử dụng làm – hoặc để sản xuất - thức ăn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thức ăn” được sử dụng theo cách đồng nghĩa với “thức ăn chăn nuôi”.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi theo sáng chế chứa nguyên liệu thức ăn có lượng chất xơ cao và/hoặc ít nhất một sản phẩm phụ của ít nhất một nguyên liệu thức ăn có lượng chất xơ cao như bột mầm ngô, cám ngô, bột ngô nghiền, bột gluten ngô, bã chưng cất khô cùng chất hòa tan (DDGS), bã chưng cất khô (DDG), bột gluten, phụ phẩm lúa mì hạt lớn, mì tấm hoặc các tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, đối tượng mà được cho dùng tổ hợp chứa DFM, xylanaza và β -glucanaza (tùy chọn, trong tổ hợp enzym phân giải chất xơ khác nữa) theo sáng chế hoặc chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế, còn được cho ăn thức ăn chăn nuôi chứa nguyên liệu thức ăn có lượng chất xơ cao và/hoặc ít nhất một sản phẩm phụ của ít nhất một nguyên liệu thức ăn có lượng chất xơ cao như bột mầm ngô, cám ngô, bột ngô nghiền, bột gluten ngô, bã chưng cất khô cùng chất hòa tan (DDGS), bã chưng cất khô (DDG), bột gluten, phụ phẩm lúa mì hạt lớn, mì tấm hoặc các tổ hợp của chúng.

Thích hợp là, theo một phương án, thành phần ngũ cốc của khẩu phần ăn cho đối tượng gia cầm có thể là lúa mì hoặc lúa mạch với lúa mạch đen, mì tấm, cám mì, yến mạch, vỏ yến mạch trong khi các thành phần thực vật có thể là bột đậu tương cùng với hoặc không cùng với các thành phần protein khác như bột cải Canola, bột cải dầu, v.v., với điều kiện là khẩu phần ăn này sẽ chứa lúa mì-lúa mạch làm các thành phần

chính và được phối chế để đáp ứng các yêu cầu về dưỡng chất của loài gà được cho ăn.

Thức ăn theo sáng chế có thể là ở dạng dung dịch hoặc ở dạng chất rắn – tùy thuộc vào việc sử dụng và/hoặc cách thức ứng dụng và/hoặc cách thức dùng.

Khi được sử dụng làm – hoặc để sản xuất – thức ăn – như thực phẩm chức năng – enzym hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hơn chất trong số các chất sau đây: chất mang có thể chấp nhận về mặt dinh dưỡng, chất pha loãng có thể chấp nhận về mặt dinh dưỡng, tá dược có thể chấp nhận về mặt dinh dưỡng, chất bổ trợ có thể chấp nhận về mặt dinh dưỡng, thành phần hoạt tính về mặt dinh dưỡng.

Theo phương án được ưu tiên, enzym hoặc chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế được trộn lẫn với thành phần thức ăn để tạo thành thức ăn chăn nuôi.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thành phần thức ăn” có nghĩa là toàn bộ hoặc một phần của thức ăn chăn nuôi. Một phần của thức ăn chăn nuôi có thể có nghĩa là một thành phần cấu tạo của thức ăn chăn nuôi hoặc nhiều hơn một thành phần cấu tạo của thức ăn chăn nuôi, ví dụ, 2 hoặc 3 hoặc 4. Theo một phương án, thuật ngữ “thành phần thức ăn” bao gồm hỗn hợp trộn sẵn hoặc các thành phần cấu tạo của hỗn hợp trộn sẵn.

Tốt hơn là, thức ăn có thể là cỏ khô, hoặc hỗn hợp trộn sẵn của chúng, thức ăn hỗn hợp, hoặc hỗn hợp trộn sẵn của chúng. Theo một phương án, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế có thể được trộn lẫn với thức ăn hỗn hợp, thành phần của thức ăn hỗn hợp hoặc với hỗn hợp trộn sẵn của thức ăn hỗn hợp hoặc với cỏ khô, thành phần của cỏ khô, hoặc hỗn hợp trộn sẵn của cỏ khô.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ cỏ khô có nghĩa là thức ăn bất kỳ được cung cấp cho động vật (chứ không phải là động vật phải tự đi tìm cỏ cho nó). Cỏ khô bao gồm thực vật đã được cắt.

Thuật ngữ cỏ khô bao gồm cỏ ủ tươi, thức ăn được nén ép và được tạo viên, dầu và suất ăn hỗn hợp, và cả ngũ cốc hạt và đậu đỗ nảy mầm.

Cỏ khô có thể được thu nhận từ một hoặc nhiều hơn thực vật trong số các thực vật được chọn từ: ngô (bắp), cỏ linh lăng (Lucerne), lúa mạch, cỏ ba lá chân chim, các loại rau cải, cải Chau moellier, cải xoăn, cải dầu (cải Canola), cải củ Thụy Điển (củ cải Thụy Điển), củ cải, cỏ ba lá, cỏ ba lá Alsike (cỏ ba lá Thụy Điển), cỏ ba lá đỏ, cỏ

ba lá Subterranean, cỏ ba lá trắng, cỏ đuôi trâu, tước mạch, kê, yến mạch, lúa miến, đậu tương, cây gỗ (chồi cây gỗ cắt ngọn để làm cỏ khô), lúa mì, và đậu đỗ.

Thuật ngữ “thức ăn hỗn hợp” có nghĩa là thức ăn thương mại ở dạng bột, viên, hạt, bánh hoặc bánh vụn. Thức ăn hỗn hợp có thể được hòa trộn từ các nguyên liệu thô và các chất phụ gia khác nhau. Các hỗn hợp hòa trộn này được phối chế theo các yêu cầu cụ thể của động vật đích.

Thức ăn hỗn hợp có thể là thức ăn đầy đủ mà cung cấp tất cả các dưỡng chất cần thiết mỗi ngày, sản phẩm cô mà cung cấp một phần của suất ăn (protein, năng lượng) hoặc các sản phẩm bổ sung mà chỉ cung cấp các dưỡng chất vi lượng bổ sung, như các khoáng chất và các vitamin.

Các thành phần chính được sử dụng trong thức ăn hỗn hợp là ngũ cốc hạt dùng làm thức ăn, bao gồm ngô, lúa mì, cám mì, đậu tương, lúa miến, yến mạch, và lúa mạch.

Thích hợp là, hỗn hợp trộn sẵn được đề cập đến trong bản mô tả này có thể là chế phẩm chứa các thành phần vi lượng như vitamin, khoáng chất, chất bảo quản hóa học, thuốc kháng sinh, sản phẩm lên men, và các thành phần thiết yếu khác. Hỗn hợp trộn sẵn thường là chế phẩm thích hợp để hòa trộn thành suất ăn thương mại.

Thức ăn chăn nuôi bất kỳ theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều hơn nguyên liệu thức ăn được chọn từ nhóm bao gồm a) ngũ cốc, như ngũ cốc hạt nhỏ (ví dụ, lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen, yến mạch, tiểu hắc mạch và các tổ hợp của chúng) và/hoặc ngũ cốc hạt to như ngô hoặc lúa miến; b) sản phẩm phụ từ ngũ cốc, như bột mầm ngô, cám ngô, bột ngô nghiền, bột gluten ngô, bã chưng cất khô cùng chất hòa tan (DDGS), bã chưng cất khô (DDG), bột gluten, phụ phẩm lúa mì hạt lớn, mì tấm hoặc các tổ hợp của chúng; c) protein thu được từ các nguồn như đậu tương, hướng dương, lạc, đậu lupin, đậu Hà Lan, đậu tằm, bông, cải Canola, bột cá, protein huyết tương khô, bột thịt xương, protein khoai tây, nước sữa, củi dừa khô, vừng; d) dầu và chất béo thu được từ các nguồn thực vật và động vật; e) khoáng chất và vitamin.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi chứa hoặc bao gồm ngô, DDGS (như cDDGS), lúa mì, cám mì hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, thành phần thức ăn có thể là ngô, DDGS (ví dụ, cDDGS), lúa mì, cám mì hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi chứa hoặc bao gồm ngô, DDGS (như cDDGS) hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, thành phần thức ăn có thể là ngô, DDGS (như DDGS ngô (cDDGS)) hoặc tổ hợp của chúng.

Thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể chứa ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50% hoặc ít nhất 60% trọng lượng là ngô và bột đậu tương hoặc ngô và đậu tương nguyên béo, hoặc bột lúa mì hoặc bột hướng dương.

Thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể chứa từ khoảng 5 đến khoảng 40% là DDGS ngô. Đối với gia cầm – thức ăn chăn nuôi tính trung bình có thể chứa từ khoảng 7 đến 12% là DDGS ngô. Đối với lợn (heo) – thức ăn chăn nuôi có thể chứa trung bình là từ 5 đến 40% là DDGS ngô.

Thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể chứa ngô làm ngũ cốc riêng lẻ, trong trường hợp này, thức ăn chăn nuôi có thể chứa từ khoảng 35% đến khoảng 85% là ngô.

Trong thức ăn chăn nuôi chứa ngũ cốc hạt hỗn hợp, ví dụ, chứa ngô và lúa mì, thì thức ăn chăn nuôi này có thể chứa ít nhất 10% là ngô.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể chứa ít nhất một nguyên liệu thức ăn có lượng chất xơ cao và/hoặc ít nhất một sản phẩm phụ của ít nhất một nguyên liệu thức ăn có lượng chất xơ cao để tạo ra thức ăn chăn nuôi có lượng chất xơ cao. Các ví dụ về nguyên liệu thức ăn có lượng chất xơ cao bao gồm: lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen, yến mạch, sản phẩm từ ngũ cốc, như bột gluten ngô, bã ẩm, bã chung cất khô (DDG), bã chung cất khô cùng chất hòa tan (DDGS), cám mì, mì tấm, phụ phẩm lúa mì hạt lớn, cám gạo, vỏ trấu, vỏ yến mạch, hạt nhân cò, và cùi quả họ cam quýt. Một số nguồn protein cũng có thể được xem là có lượng chất xơ cao: protein thu được từ các nguồn như hướng dương, đậu lupin, đậu tằm và bông.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi theo sáng chế chứa ít nhất một nguyên liệu có lượng chất xơ cao và/hoặc ít nhất một sản phẩm phụ của ít nhất một nguyên liệu thức ăn có lượng chất xơ cao được chọn từ nhóm bao gồm, ví dụ, bã chung cất khô cùng chất hòa tan (DDGS) – đặc biệt là DDGS ngô (cDDGS), bã ẩm, bã chung cất khô (DDG) – đặc biệt là DDG ngô (cDDG), cám mì, và lúa mì.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi theo sáng chế chứa ít nhất một nguyên liệu có lượng chất xơ cao và/hoặc ít nhất một sản phẩm phụ của ít nhất một nguyên

liệu thức ăn có lượng chất xơ cao được chọn từ nhóm bao gồm, ví dụ, bã chưng cất khô cùng chất hòa tan (DDGS) – đặc biệt là cDDGS, cám mì, và lúa mì.

Trong sáng chế, thức ăn có thể là một hoặc nhiều hơn loại thức ăn trong số các loại thức ăn sau đây: thức ăn hỗn hợp và hỗn hợp trộn sẵn, bao gồm viên, hạt hoặc bánh (gia súc); sản phẩm vụ mùa hoặc bã sản phẩm vụ mùa: ngô, đậu tương, lúa miến, yến mạch, lúa mạch, củi dừa khô, trấu, bã củ cải đường; bột cá; bột thịt xương; rỉ đường; bã dầu và bã ép; oligosacarit; thực vật làm thức ăn chăn nuôi được bảo toàn: cỏ ủ tươi; rong biển; hạt và ngũ cốc hạt, nguyên vẹn hoặc được tạo ra bằng cách đập, xay v.v.; ngũ cốc hạt và đậu đỗ nảy mầm; sản phẩm chiết nấm men.

Theo một số phương án, thuật ngữ thức ăn trong sáng chế còn bao gồm thức ăn cho vật nuôi. Thức ăn cho vật nuôi là nguyên liệu thực vật hoặc động vật được dự định cho sự tiêu thụ bởi vật nuôi, như thức ăn cho chó hoặc thức ăn cho mèo. Thức ăn cho vật nuôi, như thức ăn cho chó và thức ăn cho mèo, có thể là ở dạng khô, như bột nghiền thô cho chó, hoặc dạng đóng hộp ướt. Thức ăn cho mèo có thể chứa amino axit taurin.

Theo một số phương án, thuật ngữ thức ăn trong sáng chế còn bao gồm thức ăn cho cá. Thức ăn cho cá thường chứa các chất dinh dưỡng đa lượng, các yếu tố vết và các vitamin cần để giữ sức khỏe tốt cho cá nuôi nhốt. Thức ăn cho cá có thể là ở dạng phiến nhỏ, viên hoặc viên nén. Các dạng đã được tạo viên, một số trong số chúng chìm xuống rất nhanh, thường được sử dụng cho cá lớn hoặc loài ăn dưới đáy. Một số thức ăn cho cá còn chứa các chất phụ gia, như beta caroten hoặc các hormon giới tính, để cải thiện màu của cá cảnh theo cách nhân tạo.

Theo một số phương án, thuật ngữ thức ăn trong sáng chế còn bao gồm thức ăn cho chim. Thức ăn cho chim bao gồm thức ăn mà được sử dụng cả trong thùng đựng thức ăn cho chim hoang dã và để cho chim nuôi ăn. Thông thường, thức ăn cho chim bao gồm nhiều loại hạt, nhưng cũng có thể bao gồm mỡ quanh thận bò, cừu (chất béo của bò hoặc cừu).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "được cho tiếp xúc" chỉ việc cấp trực tiếp hoặc gián tiếp enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) theo sáng chế vào sản phẩm (ví dụ, thức ăn). Các ví dụ về phương pháp cấp mà có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xử lý sản phẩm trong nguyên liệu chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn, cấp trực tiếp bằng cách trộn chế phẩm phụ gia dùng trong

thức ăn với sản phẩm này, phun chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn lên trên bề mặt sản phẩm hoặc ngâm sản phẩm vào trong chế phẩm chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn.

Theo một phương án, tốt hơn là chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế được trộn lẫn với sản phẩm (ví dụ, thức ăn chăn nuôi). Theo cách khác, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn có thể được bao gồm trong nhũ tương hoặc các thành phần thô của thức ăn chăn nuôi.

Đối với một số ứng dụng, quan trọng là chế phẩm phải được làm sẵn có trên hoặc cho bề mặt của sản phẩm cần được tác động/xử lý. Điều này cho phép chế phẩm mang lại một hoặc nhiều hơn đặc tính trong số các đặc tính thuận lợi sau đây: các lợi ích về năng suất.

Enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) theo sáng chế có thể được cấp nhằm mục đích rắc, bao và/hoặc ngâm tẩm lượng được kiểm soát của enzym này vào sản phẩm (ví dụ, thức ăn chăn nuôi hoặc các thành phần thô của thức ăn chăn nuôi).

Thích hợp là, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn có thể được dùng theo cách đơn giản cho đối tượng tại cùng thời điểm khi cho động vật ăn thức ăn chăn nuôi.

Tốt hơn là, enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) theo sáng chế sẽ là ổn định nhiệt đối với việc xử lý nhiệt lên tới khoảng 70°C; lên tới khoảng 85°C; hoặc lên tới khoảng 95°C. Việc xử lý nhiệt có thể được thực hiện trong khoảng thời gian lên tới khoảng 1 phút; lên tới khoảng 5 phút; lên tới khoảng 10 phút; lên tới khoảng 30 phút; lên tới khoảng 60 phút. Thuật ngữ ổn định nhiệt có nghĩa là ít nhất khoảng 75% lượng enzym mà có mặt/có hoạt tính trong chất phụ gia trước khi làm nóng đến nhiệt độ xác định vẫn sẽ có mặt/có hoạt tính sau khi nó nguội đến nhiệt độ trong phòng. Tốt hơn là, ít nhất khoảng 80% lượng enzym mà có mặt và có hoạt tính trong chất phụ gia trước khi làm nóng đến nhiệt độ xác định vẫn sẽ có mặt và có hoạt tính sau khi nó nguội đến nhiệt độ trong phòng.

Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) theo sáng chế được làm đồng nhất để tạo ra bột.

Theo phương án được ưu tiên thay thế, enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) theo sáng chế được phối chế thành viên cứng như được mô tả trong WO2007/044968 (được gọi là viên cứng TPT), tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Theo phương án được ưu tiên khác, khi chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn được phối chế thành viên cốm, viên cốm này chứa muối chẵn đã được hydrat hóa được bao ngoài lõi protein. Ưu điểm của lớp muối bao này là có tính chịu nhiệt được cải thiện, độ ổn định khi bảo quản được cải thiện và sự bảo vệ chống lại các chất phụ gia thức ăn khác mà có tác động bất lợi đối với enzyme theo cách khác.

Tốt hơn là, muối được sử dụng cho lớp muối bao có hoạt tính trong nước lớn hơn 0,25 hoặc độ ẩm không đổi lớn hơn 60 % tại 20°C.

Tốt hơn là, lớp muối bao chứa Na_2SO_4 .

Phương pháp sản xuất enzyme (hoặc chế phẩm chứa enzyme) theo sáng chế còn có thể bao gồm bước bổ sung là bước tạo viên cho bột. Bột có thể được trộn với các thành phần khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Bột, hoặc hỗn hợp chứa bột, có thể được đẩy qua khuôn kéo sợi và các sợi thu được được cắt thành các viên thích hợp có chiều dài thay đổi.

Tùy chọn, bước tạo viên có thể bao gồm việc xử lý bằng hơi nước, hoặc giai đoạn điều hòa, trước khi tạo viên. Hỗn hợp chứa bột này có thể được đặt vào thiết bị điều hòa, ví dụ, thiết bị trộn có tiêm hơi nước. Hỗn hợp này được làm nóng trong thiết bị điều hòa lên tới nhiệt độ xác định, như từ 60 đến 100°C, nhiệt độ điển hình sẽ là 70°C, 80°C, 85°C, 90°C hoặc 95°C. Thời gian lưu có thể thay đổi từ vài giây đến vài phút và thậm chí là vài giờ, như 5 giây, 10 giây, 15 giây, 30 giây, 1 phút 2 phút., 5 phút, 10 phút, 15 phút, 30 phút và 1 giờ.

Cần phải hiểu rằng enzyme (hoặc chế phẩm chứa enzyme) theo sáng chế thích hợp để bổ sung vào nguyên liệu thức ăn thích hợp bất kỳ.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các động vật khác nhau cần các thức ăn chẵn nuôi khác nhau, và thậm chí là cùng một động vật có thể cần các thức ăn chẵn nuôi khác nhau, tùy thuộc vào mục đích nuôi dưỡng động vật này.

Tùy chọn, thức ăn chẵn nuôi cũng có thể chứa các khoáng chất bổ sung như, ví dụ, canxi và/hoặc các vitamin bổ sung.

Tốt hơn là, thức ăn chẵn nuôi là hỗn hợp bột đậu tương ngô.

Theo một phương án, tốt hơn là thức ăn không phải là thức ăn cho vật nuôi.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thức ăn chẵn nuôi. Thức ăn chẵn nuôi thường được sản xuất trong thiết bị xay thức ăn trong đó các nguyên liệu thô trước tiên được nghiền nhỏ đến kích cỡ hạt thích hợp và sau đó được

trộn với các chất phụ gia thích hợp. Sau đó, thức ăn chăn nuôi có thể được sản xuất dưới dạng cám trộn hoặc viên; viên thường liên quan đến phương pháp mà nhờ đó nhiệt độ được nâng cao đến mức cần thiết và sau đó thức ăn được cho đi qua khuôn kéo sợi để tạo ra các viên có kích cỡ cụ thể. Các viên này được để nguội. Sau đó, các chất phụ gia lỏng như chất béo và enzym có thể được thêm vào. Việc sản xuất thức ăn chăn nuôi cũng có thể bao gồm bước bổ sung mà bao gồm việc ép đùn hoặc việc làm giãn nở trước khi tạo viên – cụ thể bằng các kỹ thuật thích hợp mà có thể bao gồm ít nhất là việc sử dụng hơi nước.

Thức ăn chăn nuôi có thể là thức ăn chăn nuôi cho động vật có dạ dày một ngăn, như gia cầm (ví dụ, gà giò, gà đẻ trứng, gà giống cung cấp trứng để sản xuất gà giò, gà tây, vịt, ngỗng, chim nước), lợn (tất cả các nhóm tuổi), vật nuôi (ví dụ, chó, mèo) hoặc cá, tốt hơn là thức ăn chăn nuôi là cho gia cầm.

Thức ăn chăn nuôi có thể là thức ăn chăn nuôi cho động vật có dạ dày một ngăn, như gia cầm (ví dụ, gà giò, gà đẻ trứng, gà giống cung cấp trứng để sản xuất gà giò, gà tây, vịt, ngỗng, chim nước), lợn (tất cả các nhóm tuổi), vật nuôi (ví dụ, chó, mèo) hoặc cá, tốt hơn là thức ăn chăn nuôi là cho gia cầm.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi không dành cho động vật đẻ trứng.

Chỉ nhằm ví dụ, thức ăn chăn nuôi cho gà, ví dụ, gà giò có thể bao gồm một hoặc nhiều hơn thành phần trong số các thành phần được liệt kê trong bảng nêu dưới đây, ví dụ ở đơn vị tỉ lệ phần trăm được thể hiện trong bảng nêu dưới đây:

Thành phần	Gà mới nở (%)	Gà thịt (%)
Ngô	46,2	46,7
Mì tấm	6,7	10,0
DDGS ngô	7,0	7,0
Bột đậu tương 48%CP	32,8	26,2
Hỗn hợp hòa trộn chất béo động vật/thực vật	3,0	5,8
L-Lysin HCl	0,3	0,3
DL-methionin	0,3	0,3
L-threonin	0,1	0,1
Muối	0,3	0,4
Đá vôi	1,1	1,1
Dicaxi Phosphat	1,2	1,2
Các vitamin gia cầm và các khoáng chất vi lượng	0,3	0,3

Chỉ nhằm ví dụ, danh mục chi tiết về khẩu phần ăn cho gà, như gà giò, có thể là như được thể hiện trong bảng dưới đây:

Danh mục chi tiết về khẩu phần ăn		
Protein thô (%)	23,00	20,40
Năng lượng có thể chuyển hóa được/gia cầm (kcal/kg)	2950	3100
Canxi (%)	0,85	0,85
Phospho khả dụng (%)	0,38	0,38
Natri (%)	0,18	0,19

Lysin có thể tiêu hóa được (%)	1,21	1,07
Methionin có thể tiêu hóa được (%)	0,62	0,57
Methionin + xystein có thể tiêu hóa được (%)	0,86	0,78
Threonin có thể tiêu hóa được (%)	0,76	0,68

Chỉ nhằm ví dụ, thức ăn chăn nuôi cho gà mái đẻ có thể bao gồm một hoặc nhiều hơn thành phần trong số các thành phần được liệt kê trong bảng nêu dưới đây, ví dụ ở đơn vị tỉ lệ phần trăm được thể hiện trong bảng nêu dưới đây:

Thành phần	Giai đoạn đẻ trứng (%)
Ngô	10,0
Lúa mì	53,6
DDGS ngô	5,0
Bột đậu tương 48%CP	14,9
Mì tấm	3,0
Dầu đậu tương	1,8
L-Lysin HCl	0,2
DL-methionin	0,2
L-threonin	0,1
Muối	0,3
Dicanxi Phosphat	1,6
Đá vôi	8,9
Các vitamin gia cầm và các khoáng chất vi lượng	0,6

Chỉ nhằm ví dụ, danh mục chi tiết về khẩu phần ăn cho gà mái đẻ có thể là như được thể hiện trong bảng dưới đây:

Danh mục chi tiết về khẩu phần ăn	
Protein thô (%)	16,10
Năng lượng có thể chuyển hóa được/gia cầm (kcal/kg)	2700
Lysin (%)	0,85
Methionin (%)	0,42
Methionin + Xystein (%)	0,71
Threonin (%)	0,60
Canxi (%)	3,85
Phospho khả dụng (%)	0,42
Natri (%)	0,16

Chỉ nhằm ví dụ, thức ăn chăn nuôi cho gà tây có thể bao gồm một hoặc nhiều hơn thành phần trong số các thành phần được liệt kê trong bảng nêu dưới đây, ví dụ ở đơn vị tỉ lệ phần trăm được thể hiện trong bảng nêu dưới đây:

Thành phần	Pha 1 (%)	Pha 2 (%)	Pha 3 (%)	Pha 4 (%)
Lúa mì	33,6	42,3	52,4	61,6
DDGS ngô	7,0	7,0	7,0	7,0
Bột đậu tương 48%CP	44,6	36,6	27,2	19,2
Bột cải dầu	4,0	4,0	4,0	4,0
Dầu đậu tương	4,4	4,2	3,9	3,6
L-Lysin HCl	0,5	0,5	0,4	0,4
DL-methionin	0,4	0,4	0,3	0,2
L-threonin	0,2	0,2	0,1	0,1
Muối	0,3	0,3	0,3	0,3
Đá vôi	1,0	1,1	1,1	1,0
Dicanxi Phosphat	3,5	3,0	2,7	2,0
Các vitamin gia cầm và các khoáng chất vi lượng	0,4	0,4	0,4	0,4

Chỉ nhằm ví dụ, danh mục chi tiết về khẩu phần ăn cho gà tây có thể là như được thể hiện trong bảng dưới đây:

Danh mục chi tiết về khẩu phần ăn				
Protein thô (%)	29,35	26,37	22,93	20,00
Năng lượng có thể chuyển hóa được/gia cầm (kcal/kg)	2,850	2,900	2,950	3,001
Canxi (%)	1,43	1,33	1,22	1,02
Phospho khả dụng (%)	0,80	0,71	0,65	0,53
Natri (%)	0,16	0,17	0,17	0,17
Lysin có thể tiêu hóa được (%)	1,77	1,53	1,27	1,04
Methionin có thể tiêu hóa được (%)	0,79	0,71	0,62	0,48
Methionin + xystein có thể tiêu hóa được (%)	1,12	1,02	0,90	0,74
Threonin có thể tiêu hóa được (%)	1,03	0,89	0,73	0,59

Chỉ nhằm ví dụ, thức ăn chăn nuôi cho lợn con có thể bao gồm một hoặc nhiều hơn thành phần trong số các thành phần được liệt kê trong bảng nêu dưới đây, ví dụ ở đơn vị tỉ lệ phần trăm được thể hiện trong bảng nêu dưới đây:

Thành phần	Pha 1 (%)	Pha 2 (%)
Ngô	20,0	7,0
Lúa mì	25,9	46,6
Lúa mạch đen	4,0	10,0
Mì tấm	4,0	4,0
DDGS ngô	6,0	8,0
Bột đậu tương 48% CP	25,7	19,9
Nước sữa khô	10,0	0,0
Dầu đậu tương	1,0	0,7
L-Lysin HCl	0,4	0,5
DL-methionin	0,2	0,2
L-threonin	0,1	0,2
L-tryptophan	0,03	0,04
Đá vôi	0,6	0,7
Dicanxi Phosphat	1,6	1,6
Các vitamin heo và các khoáng chất vi lượng	0,2	0,2
Muối	0,2	0,4

Chỉ nhằm ví dụ, danh mục chi tiết về khẩu phần ăn cho lợn con có thể là như được thể hiện trong bảng dưới đây:

Danh mục chi tiết về khẩu phần ăn		
Protein thô (%)	21,50	20,00
Năng lượng có thể tiêu hóa được/lợn (kcal/kg)	3380	3320
Năng lượng thuần/lợn (kcal/kg)	2270	2230
Canxi (%)	0,80	0,75
Phospho có thể tiêu hóa được(%)	0,40	0,35
Natri (%)	0,20	0,20
Lysin có thể tiêu hóa được (%)	1,23	1,14
Methionin có thể tiêu hóa được (%)	0,49	0,44
Methionin + xystein có thể tiêu hóa được (%)	0,74	0,68
Threonin có thể tiêu hóa được (%)	0,80	0,74

Chỉ nhằm ví dụ, thức ăn chăn nuôi cho lợn đang tăng trưởng/lợn thịt có thể bao gồm một hoặc nhiều hơn thành phần trong số các thành phần được liệt kê trong bảng nêu dưới đây, ví dụ ở đơn vị tỉ lệ phần trăm được thể hiện trong bảng nêu dưới đây:

Thành phần	Lợn đang tăng trưởng/lợn thịt (%)
Ngô	27,5
Bột đậu tương 48% CP	15,4
DDGS ngô	20,0
Cám mì	11,1
Cám gạo	12,0
Bột cải Canola	10,0
Đá vôi	1,6
Dicaxi phosphate	0,01
Muối	0,4
Các vitamin heo và các khoáng chất vi lượng	0,3
Lysin-HCl	0,2
Dầu thực vật	0,5

Chỉ nhằm ví dụ, danh mục chi tiết về khẩu phần ăn cho lợn đang tăng trưởng/lợn thịt có thể là như được thể hiện trong bảng dưới đây:

Danh mục chi tiết về khẩu phần ăn	
Protein thô (%)	22,60
Năng lượng có thể chuyển hóa được/lợn(kcal/kg)	3030
Canxi (%)	0,75
Phospho khả dụng (%)	0,29
Lysin có thể tiêu hóa được (%)	1,01
Methionin + xystein có thể tiêu hóa được (%)	0,73
Threonin có thể tiêu hóa được (%)	0,66

Bã ẩm, bã chưng cất khô (DDG) và bã chưng cất khô cùng chất hòa tan (DDGS)

Bã ẩm, bã chung cất khô và bã chung cất khô với chất hòa tan là các sản phẩm thu được sau khi loại bỏ rượu etylic bằng cách chưng cất từ quá trình lên men ngũ cốc hạt hoặc hỗn hợp ngũ cốc hạt sử dụng nấm men bằng các phương pháp được sử dụng trong ngành công nghiệp chưng cất ngũ cốc hạt.

Cặn hạt từ quá trình chưng cất (ví dụ, chứa nước, các phần còn lại của hạt, các tế bào nấm men, v.v.) được tách thành phần “rắn” và phần lỏng.

Phần rắn được gọi là “bã ẩm” và có thể được sử dụng làm thức ăn động vật ở dạng như vậy.

Phần lỏng được làm bay hơi (một phần) thành xi rô (chất hòa tan).

Khi bã ẩm được làm khô, là nó bã chung cất khô (DDG).

Khi bã ẩm được làm khô cùng với xi rô (chất hòa tan), nó là Bã chung cất khô với chất hòa tan (DDGS).

Bã ẩm có thể được sử dụng trong trại chăn nuôi bò sữa và trại chăn nuôi bò thịt.

DDGS đã được làm khô có thể được sử dụng trong thức ăn cho gia súc, ví dụ, bò sữa, bò thịt và lợn) và thức ăn cho gia cầm.

DDGS ngô là nguồn protein rất tốt cho bò sữa.

Bột gluten ngô

Theo một khía cạnh, sản phẩm phụ của ngô có thể là bột gluten ngô (CGM).

CGM là sản phẩm phụ dạng bột của ngành công nghiệp xay xát ngô. CGM rất hữu ích, ví dụ, thức ăn động vật. Nó có thể được sử dụng làm nguồn protein rẻ tiền cho thức ăn như thức ăn cho vật nuôi, thức ăn cho gia súc và thức ăn cho gia cầm. Nó là nguồn amino axit xystein đặc biệt tốt, nhưng phải được cân bằng với các protein khác về lysin.

Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn

Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế và/hoặc thức ăn chăn nuôi chứa chúng có thể được sử dụng ở dạng thích hợp bất kỳ.

Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng chế phẩm rắn hoặc lỏng hoặc các dạng thay thế của chúng. Các ví dụ về chế phẩm rắn bao gồm bột, bột nhão, viên tròn mềm, viên nang, viên, viên nén, bột bụi, và viên cốm mà có thể là có thể làm ướt được, được sấy phun hoặc được làm khô lạnh. Các ví dụ về chế phẩm lỏng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch, huyền phù và nhũ tương nước, hữu cơ hoặc hữu cơ-nước.

Trong một số ứng dụng, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế có thể được trộn với thức ăn hoặc được dùng trong nước uống.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn, bao gồm việc trộn lẫn xylanaza, β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa) và DFM được nêu trong bản mô tả này với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược có thể chấp nhận trong thức ăn, và (tùy chọn) bao gói.

Hỗn hợp trộn sẵn

Thức ăn chăn nuôi và/hoặc chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn có thể được kết hợp với ít nhất một khoáng chất và/hoặc ít nhất một vitamin. Chế phẩm thu được theo cách đó có thể được gọi trong bản mô tả này là hỗn hợp trộn sẵn.

Các dạng

Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế và các thành phần khác và/hoặc thức ăn chăn nuôi chứa chúng có thể được sử dụng ở dạng thích hợp bất kỳ.

Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng chế phẩm rắn hoặc lỏng hoặc các dạng thay thế của chúng. Các ví dụ về chế phẩm rắn bao gồm bột, bột nhão, viên tròn mềm, viên nang, viên, viên nén, bột bụi, và viên cốm mà có thể là có thể làm ướt được, được sấy phun hoặc được làm khô lạnh. Các ví dụ về chế phẩm lỏng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch, huyền phù và nhũ tương nước, hữu cơ hoặc hữu cơ-nước.

Trong một số ứng dụng, DFM hoặc chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế có thể được trộn với thức ăn hoặc được dùng trong nước uống. Theo một phương án, khoảng trị số liều lượng được bao gồm trong nước nằm từ khoảng 1×10^3 CFU/động vật/ngày đến khoảng 1×10^{10} CFU/động vật/ngày, và tốt hơn nữa là nằm từ khoảng 1×10^7 CFU/động vật/ngày.

Các ví dụ thích hợp về dạng bao gồm một hoặc nhiều hơn dạng trong số các dạng sau đây: bột, bột nhão, viên tròn mềm, viên, viên nén, viên tròn nhỏ, viên nang, viên trứng, dung dịch hoặc huyền phù, mà có thể chứa chất tạo hương vị hoặc chất tạo màu, dùng cho các ứng dụng giải phóng tức thì, theo cách trì hoãn, theo cách có biến đổi, theo cách duy trì liên tục, theo xung hoặc theo cách có kiểm soát.

Ví dụ, nếu chế phẩm theo sáng chế được sử dụng ở dạng chất rắn, ví dụ, ở dạng đã được tạo viên, thì nó cũng có thể chứa một hoặc nhiều hơn chất trong số các chất

sau đây: tá dược như xenluloza vi tinh thể, lactoza, natri xitrat, canxi cacbonat, canxi phosphat diaxit và glyxin; chất gây rã như tinh bột (tốt hơn là tinh bột ngô, khoai tây hoặc sắn), glycolat tinh bột natri, croscarmelloza natri và một số silicat phức hợp nhất định; chất gắn kết hạt như polyvinylpyrrolidon, hydroxypropylmetylxenluloza (HPMC), hydroxypropylxenluloza (HPC), sucroza, gelatin và acacia; chất làm trơn như magie stearat, axit stearic, glyxeryl behenat và hoạt thạch có thể được bao gồm.

Các ví dụ về chất mang có thể chấp nhận về mặt dinh dưỡng để sử dụng trong việc sản xuất các dạng này bao gồm, ví dụ, nước, dung dịch muối, rượu, silicon, sáp, keo dầu mỏ, dầu thực vật, polyetylen glycol, propylen glycol, liposom, đường, gelatin, lactoza, amyloza, magie stearat, hoạt thạch, chất hoạt động bề mặt, axit silicic, parafin nhớt, dầu thơm, monoglyxerit và diglyxerit của axit béo, este của axit béo petroethral, hydroxymetyl-xenluloza, polyvinylpyrrolidon, và chất mang tương tự.

Các tá dược được ưu tiên cho các dạng này bao gồm lactoza, tinh bột, xenluloza, đường sữa hoặc polyetylen glycol có phân tử lượng cao.

Đối với huyền phù nước và/hoặc còn ngọt, chế phẩm theo sáng chế có thể được kết hợp với chất tạo ngọt hoặc chất tạo hương vị, chất tạo màu hoặc thuốc nhuộm, với chất tạo nhũ và/hoặc chất tạo huyền phù và với chất pha loãng như nước, propylen glycol và glyxerin, và các tổ hợp của chúng.

Nước sữa không cảm ứng ẩm thường được sử dụng làm chất mang cho các DFM (đặc biệt là các DFM vi khuẩn) và là môi trường tốt để khởi đầu sự sinh trưởng.

Bột nhão chứa DFM vi khuẩn có thể được phối chế với dầu thực vật và các thành phần tạo gel trợ.

Các sản phẩm nắm có thể được phối chế với các sản phẩm phụ của hạt làm chất mang.

Theo một phương án, tốt hơn là chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế không ở dạng hệ vi hạt, như hệ vi hạt được bọc lộ trong WO2005/123034.

Định liều

DFM và/hoặc chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế có thể được thiết kế để cấp liều một lần hoặc có thể được thiết kế để cho ăn trên cơ sở hằng ngày.

Lượng tối ưu của chế phẩm (và từng thành phần trong đó) được sử dụng trong tổ hợp theo sáng chế sẽ phụ thuộc vào sản phẩm cần được xử lý và/hoặc phương pháp cho sản phẩm tiếp xúc với chế phẩm và/hoặc ứng dụng được dự định cho chúng.

Lượng của DFM và các enzym được sử dụng trong các chế phẩm này sẽ là lượng đủ để có tác dụng và để duy trì đủ tác dụng trong việc cải thiện năng suất của động vật được cho ăn các sản phẩm thức ăn chứa chế phẩm này. Độ dài của thời gian có tác dụng này cần phải kéo dài lên tới ít nhất là thời gian sử dụng của sản phẩm (ví dụ, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn hoặc thức ăn chứa chúng).

Tổ hợp với các thành phần khác

DFM và (các) enzym được sử dụng trong sáng chế có thể được sử dụng trong tổ hợp với các thành phần khác. Do đó, sáng chế còn đề xuất các tổ hợp. DFM trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza (và, tùy chọn, ít nhất một enzym phân giải chất xơ khác nữa) có thể được gọi trong bản mô tả này là “chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế”.

Theo phương án được ưu tiên, “chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế” có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) DFM trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza và enzym phân giải chất xơ khác nữa được nêu trong bản mô tả này (ví dụ, thích hợp là ít nhất hai, thích hợp là ít nhất ba enzym phân giải chất xơ khác nữa).

Theo phương án được ưu tiên khác, “chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế” có thể chứa (hoặc về cơ bản bao gồm, hoặc bao gồm) DFM trong tổ hợp với xylanaza và β -glucanaza và enzym phân giải chất xơ khác nữa được nêu trong bản mô tả này (ví dụ, thích hợp là ít nhất bốn, thích hợp là ít nhất năm enzym phân giải chất xơ khác nữa).

Tổ hợp theo sáng chế chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế (hoặc một hoặc nhiều hơn thành phần cấu tạo trong số các thành phần cấu tạo của chúng) và thành phần khác mà thích hợp cho sự tiêu thụ của động vật và có khả năng mang lại lợi ích về mặt sinh lý hoặc y tế cho động vật tiêu thụ.

Theo một phương án, tốt hơn là “thành phần khác” không phải là enzym khác nữa hoặc DFM khác nữa.

Các thành phần này có thể là thức ăn cho vi sinh vật có lợi. Thức ăn cho vi sinh vật có lợi thường là hydrat cacbon không tiêu hóa được (oligosacarit hoặc polysacarit) hoặc rượu đường mà không được phân giải hoặc được hấp thụ trong đường tiêu hóa trên. Các thức ăn cho vi sinh vật có lợi đã biết được sử dụng trong các sản phẩm thương mại và hữu dụng trong sáng chế bao gồm inulin (fructo-oligosacarit, hoặc

FOS) và transgalacto-oligosacarit (GOS hoặc TOS). Các thức ăn cho vi sinh vật có lợi thích hợp bao gồm palatinoseoligosacarit, oligosacarit đậu tương, alginat, xanthan, pectin, gồm đậu locust (LBG), inulin, gồm guar, galacto-oligosacarit (GOS), fructo-oligosacarit (FOS), tinh bột không phân giải được, lactosacaroza, lactuloza, lactitol, maltitol, maltodextrin, polydextroza (tức là Litesse®), lactitol, lactosucroza, oligosacarit đậu tương, palatinoza, isomalto-oligosacarit, gluco-oligosacarit và xylo-oligosacarit.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất tổ hợp của chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế (hoặc một hoặc nhiều hơn thành phần cấu tạo trong số các thành phần cấu tạo của chúng) với thức ăn cho vi sinh vật có lợi. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn chứa (hoặc về cơ bản bao gồm hoặc bao gồm) DFM trong tổ hợp với xylanaza, β -glucanaza, amylaza, phytaza, proteaza và thức ăn cho vi sinh vật có lợi.

Thức ăn cho vi sinh vật có lợi có thể được dùng đồng thời với (ví dụ, trong hỗn hợp trộn lẫn cùng với hoặc được đưa vào cơ thể đồng thời bằng các đường giống hoặc khác nhau) hoặc liên tiếp theo (ví dụ, bằng các đường giống hoặc khác nhau) chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn (hoặc các thành phần cấu tạo của chúng) theo sáng chế.

Các thành phần khác của tổ hợp theo sáng chế bao gồm polydextroza, như Litesse®, và/hoặc maltodextrin và/hoặc lactitol. Các thành phần khác này có thể được thêm, tùy chọn, vào chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn để hỗ trợ cho quá trình làm khô và trợ giúp cho sự sống sót của DFM.

Các ví dụ khác về các thành phần thích hợp khác bao gồm một hoặc nhiều hơn thành phần trong số các thành phần nêu dưới đây: chất làm đặc, chất tạo gel, chất nhũ hóa, chất gắn kết, chất làm biến đổi tính thể, chất tạo ngọt (bao gồm chất tạo ngọt nhân tạo), chất làm biến đổi tính lưu biến, chất làm ổn định, chất chống oxy hóa, thuốc nhuộm, enzym, chất mang, chất dẫn thuốc, tá dược, chất pha loãng, chất làm trơn, chất tạo hương vị, chất tạo màu, chất tạo huyền phù, chất gây rã, chất gắn kết hạt, v.v. Các thành phần khác này có thể là tự nhiên. Các thành phần khác này có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật hóa học và/hoặc enzym.

Theo một phương án, các DFM và/hoặc enzym có thể được bao nang. Theo một phương án, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn và/hoặc DFM và/hoặc enzym

được phối chế dưới dạng bột khô hoặc viên cốm như được mô tả trong WO2007/044968 (được gọi là viên cốm TPT) – tài liệu tham khảo này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án được ưu tiên, các DFM và/hoặc enzym được sử dụng trong sáng chế có thể được sử dụng trong tổ hợp với một hoặc nhiều hơn lipit.

Ví dụ, các DFM và/hoặc enzym được sử dụng trong sáng chế có thể được sử dụng trong tổ hợp với một hoặc nhiều hơn mixen lipit. Mixen lipit có thể là mixen lipit đơn giản hoặc mixen lipit phức tạp.

Mixen lipit có thể là khối kết tụ của các phân tử có định hướng của các chất lưỡng tính, như lipit và/hoặc dầu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất làm đặc hoặc chất tạo gel” chỉ sản phẩm mà ngăn cản tách pha bằng cách làm chậm hoặc ngăn cản sự chuyển động của các hạt, các giọt nhỏ của chất lỏng không thể trộn lẫn, không khí hoặc chất rắn không hòa tan. Sự làm đặc xảy ra khi các phân tử đã được hydrat hóa riêng lẻ gây ra sự tăng độ nhớt, làm chậm sự tách pha. Sự tạo gel xảy ra khi các phân tử đã được hydrat hóa này liên kết để tạo ra mạng lưới ba chiều mà bắt giữ các hạt, nhờ đó giữ cố định chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất làm ổn định” được định nghĩa là thành phần hoặc tổ hợp của các thành phần mà giữ cho sản phẩm (ví dụ, sản phẩm thức ăn) không thay đổi theo thời gian.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất nhũ hóa” chỉ thành phần (ví dụ, thành phần thức ăn) mà ngăn cản sự tách pha của nhũ tương. Nhũ tương là hai chất không thể trộn lẫn, một chất có mặt ở dạng giọt nhỏ, được chứa trong chất còn lại. Nhũ tương có thể bao gồm dầu trong nước, trong đó giọt nhỏ hoặc pha phân tán là dầu và pha liên tục là nước; hoặc nước trong dầu, trong đó nước trở thành pha phân tán và pha liên tục là dầu. Bột, là khí trong chất lỏng, và huyền phù, là chất rắn trong chất lỏng, cũng có thể được làm ổn định bằng cách sử dụng chất nhũ hóa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất gắn kết” chỉ thành phần (ví dụ, thành phần thức ăn) mà gắn kết sản phẩm với nhau bằng phản ứng vật lý hoặc phản ứng hóa học. Ví dụ, trong quá trình “tạo gel”, nước được hấp thụ, tạo ra tác dụng gắn kết. Tuy nhiên, chất gắn kết có thể hấp thụ các chất lỏng khác, như dầu, giữ chúng trong sản phẩm. Trong sáng chế, chất gắn kết sẽ thường được sử dụng trong sản

phẩm rắn hoặc sản phẩm có độ ẩm thấp, ví dụ, sản phẩm của quá trình nướng: bánh bao, bánh rán, bánh mì và các sản phẩm khác.

"Chất mang" hoặc "chất dẫn thuốc" có nghĩa là nguyên liệu thích hợp cho việc dùng DFM và/hoặc các enzym và bao gồm nguyên liệu như vậy bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như, ví dụ, chất lỏng, gel, dung môi, chất pha loãng lỏng, chất làm tan bất kỳ, hoặc chất tương tự, mà không độc và không tương tác với bất kỳ thành phần nào của chế phẩm theo cách có hại.

Theo một phương án, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn, hỗn hợp trộn sẵn, thức ăn hoặc thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được trộn lẫn với ít nhất một chất mang có thể chấp nhận về mặt sinh lý được chọn từ ít nhất một chất trong số maltodextrin, đá vôi (canxi cacbonat), cyclodextrin, lúa mì hoặc thành phần lúa mì, sucroza, tinh bột, Na_2SO_4 , hoạt thạch, PVA, sorbitol, benzoat, sorbiat, glyxerol, sucroza, propylen glycol, 1,3-propan diol, glucoza, paraben, natri clorua, xitrat, axetat, phosphat, canxi, metabisulfit, format và các hỗn hợp của chúng.

Các ví dụ về tá dược bao gồm một hoặc nhiều hơn tá dược trong số: xenluloza vi tinh thể và các xenluloza khác, lactoza, natri xitrat, canxi cacbonat, canxi phosphat diaxit, glyxin, tinh bột, đường sữa và polyetylen glycol có phân tử lượng cao.

Các ví dụ về chất gây rã bao gồm một hoặc nhiều hơn chất trong số các chất sau đây: tinh bột (tốt hơn là tinh bột ngô, khoai tây hoặc sắn), glycolat tinh bột natri, croscarmelloza natri và một số silicat phức hợp nhất định.

Các ví dụ về chất gắn kết hạt bao gồm một hoặc nhiều hơn chất trong số các chất sau đây: polyvinylpyrrolidon, hydroxypropylmetylxenluloza (HPMC), hydroxypropylxenluloza (HPC), sucroza, maltoza, gelatin và acacia.

Các ví dụ về chất làm trơn bao gồm một hoặc nhiều hơn chất trong số các chất sau đây: magie stearat, axit stearic, glyxeryl behenat và hoạt thạch.

Các ví dụ về chất pha loãng bao gồm một hoặc nhiều hơn chất trong số các chất sau đây: nước, etanol, propylen glycol và glyxerin, và các tổ hợp của chúng.

Các thành phần khác này có thể được sử dụng đồng thời (ví dụ, khi chúng ở trong hỗn hợp trộn lẫn với nhau hoặc ngay cả khi chúng được đưa vào cơ thể bằng các đường khác nhau) hoặc liên tiếp (ví dụ, chúng có thể được đưa vào cơ thể bằng các đường khác nhau).

Tốt hơn là, khi chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế được trộn lẫn với (các) thành phần khác, DFM vẫn có thể sống được.

Theo một phương án, tốt hơn là chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế không chứa crom hoặc crom hữu cơ.

Theo một phương án, tốt hơn là chất phụ gia thức ăn theo sáng chế không chứa axit sorbic.

Sản phẩm cô

Các DFM được sử dụng trong sáng chế có thể là ở dạng sản phẩm cô. Thông thường, các sản phẩm cô này chứa nồng độ DFM cao đáng kể.

Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế có thể có lượng tế bào có thể sống được (đơn vị hình thành khuẩn lạc, CFU) nằm trong khoảng từ ít nhất 10^4 CFU/g (thích hợp là bao gồm ít nhất 10^5 CFU/g, như ít nhất 10^6 CFU/g, ví dụ, ít nhất 10^7 CFU/g, ít nhất 10^8 CFU/g, như ít nhất 10^9 CFU/g) đến khoảng 10^{10} CFU/g (hoặc thậm chí khoảng 10^{11} CFU/g hoặc khoảng 10^{12} CFU/g).

Khi DFM ở dạng chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn dạng sản phẩm cô theo sáng chế có thể có lượng tế bào có thể sống được nằm trong khoảng từ ít nhất 10^9 CFU/g đến khoảng 10^{12} CFU/g, tốt hơn là nằm trong khoảng từ ít nhất 10^{10} CFU/g đến khoảng 10^{12} CFU/g.

Bột, viên cốm và chế phẩm lỏng ở dạng sản phẩm cô có thể được pha loãng bằng nước hoặc được tái tạo huyền phù trong nước hoặc các chất pha loãng thích hợp khác, ví dụ, môi trường sinh trưởng thích hợp như sữa hoặc khoáng chất hoặc dầu thực vật, để tạo ra chế phẩm sẵn sàng để sử dụng.

DFM hoặc chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế hoặc các tổ hợp theo sáng chế ở dạng sản phẩm cô có thể được sản xuất theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một khía cạnh của sáng chế, các enzym hoặc thức ăn được cho tiếp xúc bởi chế phẩm ở dạng đã được cô.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được sấy phun hoặc được làm khô lạnh bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các quy trình tiêu biểu để tạo hạt bằng cách sử dụng quy trình sấy phun liên quan đến nguyên liệu rắn được hòa tan trong dung môi thích hợp (ví dụ, nuôi cấy của DFM trong môi trường lên men). Theo cách khác, nguyên liệu này có thể được tạo

huyền phù hoặc được nhũ hóa trong chất không phải dung môi để tạo ra huyền ph hoặc nhũ tương. Các thành phần khác (như nêu trên) hoặc các thành phần như chất kháng vi sinh vật, chất làm ổn định, thuốc nhuộm và chất hỗ trợ cho quy trình làm khô có thể, tùy chọn, được thêm vào giai đoạn này.

Sau đó, dung dịch này được phun sương để tạo ra dạng sương mịn của các giọt nhỏ. Các giọt nhỏ này ngay lập tức đi vào buồng làm khô, nơi chúng tiếp xúc với khí làm khô. Dung môi được làm bay hơi ra khỏi các giọt nhỏ vào trong khí làm khô để hóa rắn các giọt nhỏ này, nhờ đó tạo ra các hạt. Sau đó, các hạt này được tách ra khỏi khí làm khô và được thu lại.

Đối tượng

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” có nghĩa là động vật mà sẽ được hoặc đã và đang được cho dùng chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế hoặc thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” có nghĩa là động vật. Tốt hơn là, đối tượng là động vật có vú, chim, cá hoặc động vật giáp xác bao gồm, ví dụ, gia súc hoặc động vật đã được thuần dưỡng (ví dụ, vật nuôi).

Theo một phương án, “đối tượng” là gia súc.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “gia súc” chỉ động vật được nuôi trong trang trại bất kỳ. Tốt hơn là, gia súc là một hoặc nhiều hơn gia súc trong số bò cái hoặc bò đực (bao gồm bê), gia cầm, lợn (bao gồm lợn con), gia cầm (bao gồm gà giò, gà và gà tây), chim, cá (bao gồm cá nước ngọt, như cá hồi, cá tuyết, cá hồi vân và cá chép, ví dụ, cá chép Nhật, và cá biển, như cá vược), động vật giáp xác (như tôm, vẹm và sò), ngựa (bao gồm ngựa đua), cừu (bao gồm cừu non).

Theo một phương án, thuật ngữ gia súc và/hoặc gia cầm và/hoặc gà không bao gồm động vật đẻ trứng.

Theo một phương án khác, “đối tượng” là động vật đã được thuần dưỡng hoặc vật nuôi hoặc động vật được giữ trong môi trường vườn thú.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “động vật đã được thuần dưỡng hoặc vật nuôi hoặc động vật được giữ trong môi trường vườn thú” chỉ động vật có liên quan bất kỳ bao gồm loài chó (ví dụ, chó), loài mèo (ví dụ, mèo), động vật gặm

nhấm (ví dụ, chuột lang, chuột *Rattus*, chuột nhắt), chim, cá (bao gồm cá nước ngọt và cá biển), và ngựa.

Sản xuất axit béo chuỗi ngắn (SCFA)

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “axit béo chuỗi ngắn” bao gồm các axit béo dễ bay hơi cũng như axit lactic. Theo một phương án, SCFA có thể được chọn từ nhóm bao gồm: axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit isobutyric, axit valeric, axit isovaleric, axit 2-metylbutyric và axit lactic, tốt hơn là axit propionic và/hoặc axit butyric.

Theo một phương án, SCFA có thể là axit butyric và/hoặc axit propionic.

Các axit béo chuỗi ngắn (đặc biệt là các axit béo dễ bay hơi, ví dụ, axit propionic và axit butyric, và axit lactic) có thể được phân tích bằng phương pháp nêu dưới đây:

Kỹ thuật phân tích sắc ký các axit béo dễ bay hơi và axit lactic, ví dụ, các SCFA, được thực hiện từ các mẫu mô phỏng với axit pivalic làm chất nội chuẩn như được mô tả trước đó (Ouweland et al., 2009 Feb;101(3):367-75). Nồng độ của axit axetic, propionic, butyric, isobutyric, valeric, isovaleric, 2-metylbutyric, và axit lactic được xác định.

Năng suất

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “năng suất động vật” có thể được xác định bằng hiệu suất thức ăn và/hoặc sự tăng trọng của động vật và/hoặc bằng tỷ lệ chuyển hóa thức ăn và/hoặc bằng khả năng tiêu hóa của dưỡng chất trong thức ăn (ví dụ, khả năng tiêu hóa amino axit) và/hoặc năng lượng có thể tiêu hóa được hoặc năng lượng có thể chuyển hóa được trong thức ăn và/hoặc bằng sự tích trữ nitơ.

Tốt hơn là, “năng suất động vật” được xác định bằng hiệu suất thức ăn và/hoặc sự tăng trọng của động vật và/hoặc bằng tỷ lệ chuyển hóa thức ăn.

“Năng suất động vật được cải thiện” có nghĩa là có hiệu suất thức ăn tăng, và/hoặc sự tăng trọng tăng và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn giảm và/hoặc khả năng tiêu hóa của dưỡng chất hoặc năng lượng trong thức ăn được cải thiện và/hoặc sự tích trữ nitơ được cải thiện nhờ việc sử dụng chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế trong thức ăn so với thức ăn không chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn này.

Tốt hơn là, “năng suất động vật được cải thiện” có nghĩa là có hiệu suất thức ăn tăng và/hoặc sự tăng trọng tăng và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn giảm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hiệu suất thức ăn” chỉ lượng tăng trọng ở động vật mà xảy ra khi động vật này được cho ăn tự do hoặc lượng thức ăn xác định trong một khoảng thời gian.

“Hiệu suất thức ăn tăng” có nghĩa là việc sử dụng chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế trong thức ăn giúp làm tăng sự tăng trọng cho mỗi đơn vị hấp thu thức ăn so với động vật được cho ăn thức ăn không chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế.

Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR)

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tỷ lệ chuyển hóa thức ăn” chỉ lượng thức ăn cho động vật ăn để làm tăng trọng lượng của động vật thêm một lượng xác định.

Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn được cải thiện có nghĩa là tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp hơn.

“Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp hơn” hoặc “tỷ lệ chuyển hóa thức ăn được cải thiện” có nghĩa là việc sử dụng chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn trong thức ăn giúp làm giảm lượng thức ăn cần cho động vật ăn để làm tăng trọng lượng của động vật thêm một lượng xác định so với lượng thức ăn cần để làm tăng trọng lượng của động vật thêm một lượng giống như vậy khi thức ăn không chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn này.

Khả năng tiêu hóa dưỡng chất

Như được sử dụng trong bản mô tả này, khả năng tiêu hóa dưỡng chất có nghĩa là phần dưỡng chất biến mất khỏi ống tiêu hóa hoặc đoạn xác định của ống tiêu hóa, ví dụ, ruột nhỏ. Khả năng tiêu hóa dưỡng chất có thể được đo dưới dạng hiệu số giữa những thứ được dùng cho đối tượng và những thứ đi ra trong phân của đối tượng, hoặc giữa những thứ được dùng cho đối tượng và những thứ còn lại trong sản phẩm tiêu hóa trên đoạn xác định của ống tiêu hóa, ví dụ, ruột hồi.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, khả năng tiêu hóa dưỡng chất có thể được đo bằng hiệu số giữa lượng hấp thu dưỡng chất và dưỡng chất được bài tiết bằng cách thu lại toàn bộ chất bài tiết trong một khoảng thời gian; hoặc bằng cách sử dụng chất đánh dấu trơ mà không được hấp thụ bởi động vật, và cho phép người nghiên cứu

tính toán lượng dưỡng chất biến mất trong toàn bộ ống tiêu hóa hoặc một đoạn của ống tiêu hóa. Chất đánh dấu tracer này có thể là titan dioxit, crom (III) oxit hoặc tro không hòa tan trong axit. Khả năng tiêu hóa có thể được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm của dưỡng chất trong thức ăn, hoặc dưới dạng số đơn vị khối lượng của dưỡng chất có thể tiêu hóa được có trong mỗi đơn vị khối lượng của dưỡng chất trong thức ăn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, khả năng tiêu hóa dưỡng chất bao gồm khả năng tiêu hóa tinh bột, khả năng tiêu hóa chất béo, khả năng tiêu hóa protein, và khả năng tiêu hóa amino axit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, khả năng tiêu hóa năng lượng có nghĩa là tổng năng lượng của thức ăn được tiêu thụ trừ đi tổng năng lượng của phân hoặc tổng năng lượng của thức ăn được tiêu thụ trừ đi tổng năng lượng của sản phẩm tiêu hóa còn lại trên đoạn xác định của ống tiêu hóa của động vật, ví dụ, ruột hồi. Như được sử dụng trong bản mô tả này, năng lượng có thể chuyển hóa được chỉ năng lượng có thể chuyển hóa được biểu kiến và có nghĩa là tổng năng lượng của thức ăn được tiêu thụ trừ đi tổng năng lượng được chứa trong phân, nước tiểu, và các sản phẩm khí của quá trình tiêu hóa. Khả năng tiêu hóa năng lượng và năng lượng có thể chuyển hóa được có thể được đo dưới dạng hiệu số giữa lượng hấp thu năng lượng toàn phần và tổng năng lượng được bài tiết ra trong phân hoặc sản phẩm tiêu hóa có mặt trong đoạn xác định của ống tiêu hóa bằng cách sử dụng các phương pháp giống như vậy để đo khả năng tiêu hóa của dưỡng chất, với các hiệu chỉnh thích hợp cho sự bài tiết nitơ để tính toán năng lượng có thể chuyển hóa được của thức ăn.

Sự tích trữ nitơ

Như được sử dụng trong bản mô tả này, sự tích trữ nitơ có nghĩa là khả năng của đối tượng trong việc giữ nitơ từ khẩu phần ăn dưới dạng khối lượng cơ thể. Cân bằng nitơ tiêu cực xảy ra khi lượng nitơ bài tiết vượt quá lượng hấp thu hằng ngày và thường được thấy khi cơ bị mất đi. Cân bằng nitơ tích cực thường liên quan đến sự tăng trưởng cơ, đặc biệt là ở động vật đang tăng trưởng.

Sự tích trữ nitơ có thể được đo dưới dạng hiệu số giữa lượng hấp thu nitơ và nitơ được bài tiết bằng cách thu lại toàn bộ chất bài tiết và nước tiểu trong một khoảng thời gian. Cần phải hiểu rằng nitơ được bài tiết bao gồm protein không được tiêu hóa

từ thức ăn, các sản phẩm tiết chứa protein nội sinh, protein vi sinh vật, và nitơ trong nước tiểu.

Sản lượng thịt xẻ và sản lượng thịt

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ sản lượng thịt xẻ có nghĩa là lượng thịt xẻ tính theo tỷ lệ của trọng lượng cơ thể sống, sau quá trình giết mổ thương mại hoặc thí nghiệm. Thuật ngữ thịt xẻ có nghĩa là phần thân của động vật đã bị giết mổ để làm thức ăn, trong đó đầu, lòng ruột, một phần của các chi, và lông hoặc da đã được bỏ đi. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ sản lượng thịt có nghĩa là lượng thịt có thể ăn được tính theo tỷ lệ của trọng lượng cơ thể sống, hoặc lượng của miếng thịt cắt xác định tính theo tỷ lệ của trọng lượng cơ thể sống.

Sự tăng trọng

Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm tăng sự tăng trọng ở đối tượng, ví dụ, gia cầm hoặc lợn, bao gồm việc cho đối tượng này ăn thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế.

“Sự tăng trọng tăng” chỉ động vật có trọng lượng cơ thể tăng khi được cho ăn thức ăn chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn so với động vật được cho ăn thức ăn không chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo sáng chế.

Các tính chất khác

Theo một phương án, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn, thức ăn, thức ăn chăn nuôi hoặc phương pháp theo sáng chế có thể không điều biến (ví dụ, cải thiện) đáp ứng miễn dịch của đối tượng.

Theo một phương án khác, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn, thức ăn, thức ăn chăn nuôi hoặc phương pháp theo sáng chế có thể không cải thiện khả năng sống sót (ví dụ, làm giảm tỉ lệ tử vong) của đối tượng.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn, thức ăn, thức ăn chăn nuôi hoặc phương pháp theo sáng chế có thể không điều biến (ví dụ, cải thiện) đáp ứng miễn dịch hoặc cải thiện khả năng sống sót (ví dụ, làm giảm tỉ lệ tử vong) của đối tượng.

Vi sinh vật có lợi

Đối với một số ứng dụng, DFM trong chế phẩm theo sáng chế được tin là có thể tạo ra tác dụng của nuôi cấy vi sinh vật có lợi. Việc thêm các vi sinh vật có lợi

và/hoặc các thức ăn cho vi sinh vật có lợi khác vào chế phẩm theo sáng chế cũng thuộc phạm vi của sáng chế

Trong bản mô tả này, thức ăn cho vi sinh vật có lợi là:

"thành phần thức ăn không tiêu hóa được mà tác động có lợi đến vật chủ bằng cách kích thích theo cách chọn lọc sự sinh trưởng và/hoặc hoạt tính của một hoặc một số lượng giới hạn các vi khuẩn có lợi".

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "nuôi cấy vi sinh vật có lợi" xác định các vi sinh vật sống (bao gồm, ví dụ, vi khuẩn hoặc nấm men) mà, khi, ví dụ, được tiêu hóa hoặc được cấp cục bộ với số lượng thích hợp, sẽ gây tác động có lợi đến sinh vật chủ, tức là bằng cách mang lại một hoặc nhiều hơn lợi ích về sức khỏe mà có thể chứng minh được cho sinh vật chủ. Các vi sinh vật có lợi có thể cải thiện sự cân bằng vi sinh vật trong một hoặc nhiều hơn bề mặt niêm mạc. Ví dụ, bề mặt niêm mạc có thể là ruột non, đường tiết niệu, đường hô hấp hoặc da. Mặc dù không có giới hạn trên và giới hạn dưới đối với lượng hấp thu các vi sinh vật có lợi, nhưng liều hằng ngày nằm trong khoảng từ ít nhất 10^6 đến 10^{12} , tốt hơn là nằm trong khoảng từ ít nhất 10^6 đến 10^{10} , tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^9 , cfu được gợi ý là sẽ có hiệu quả trong việc đạt được các tác dụng có lợi cho sức khỏe ở đối tượng.

Phân lập

Theo một khía cạnh, tốt hơn là enzym được sử dụng trong sáng chế ở dạng đã được phân lập. Thuật ngữ "đã được phân lập" có nghĩa là enzym ít nhất là về cơ bản không chứa ít nhất một thành phần khác mà enzym vốn có liên quan với nó trong tự nhiên và như được phát hiện thấy trong tự nhiên. Enzym theo sáng chế có thể được cung cấp ở dạng mà về cơ bản không chứa một hoặc nhiều hơn tạp chất mà chất này có thể có liên quan theo cách khác với nó. Do đó, ví dụ, nó có thể là về cơ bản không chứa một hoặc nhiều hơn polypeptit và/hoặc phân tử axit nucleic mà có tiềm năng gây nhiễm tạp.

Tinh chế

Theo một khía cạnh, tốt hơn là enzym và/hoặc DFM theo sáng chế ở dạng đã được tinh chế. Thuật ngữ "được tinh chế" có nghĩa là enzym và/hoặc DFM có mặt với lượng cao. Enzym và/hoặc DFM được mong muốn là thành phần chiếm ưu thế có mặt trong chế phẩm. Tốt hơn là, nó có mặt với lượng là ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất

khoảng 95% hoặc ít nhất khoảng 98%, lượng này được xác định dựa trên cơ sở trọng lượng khô/trọng lượng khô tính theo tổng chế phẩm đang được xem xét.

Cũng thuộc phạm vi của sáng chế là trường hợp các phương án của sáng chế có thể được kết hợp sao cho tổ hợp của dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu được nêu trong bản mô tả này cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Cụ thể, cũng thuộc phạm vi của sáng chế là việc tác dụng bất kỳ trong số các tác dụng trị liệu của vi khuẩn có thể được thể hiện một cách đồng thời.

Trình tự amino axit

Phạm vi của sáng chế còn bao gồm các trình tự amino axit của các enzym có các tính chất đặc hiệu như được xác định trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trình tự amino axit” đồng nghĩa với thuật ngữ “polypeptit” và/hoặc thuật ngữ “protein”. Trong một số trường hợp, thuật ngữ “trình tự amino axit” đồng nghĩa với thuật ngữ “peptit”. Trong một số trường hợp, thuật ngữ “trình tự amino axit” đồng nghĩa với thuật ngữ “enzym”.

Trình tự amino axit có thể được tạo ra/được phân lập từ nguồn thích hợp, hoặc nó có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc nó có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Tốt hơn là, trình tự amino axit khi liên quan đến và khi được bao hàm bởi chính phạm vi của sáng chế không phải là enzym nguyên gốc. Về khía cạnh này, thuật ngữ “enzym nguyên gốc” có nghĩa là enzym toàn phần mà ở trong môi trường nguyên gốc của nó và khi nó được biểu hiện bởi trình tự nucleotit nguyên gốc của nó.

Độ đồng nhất trình tự hoặc độ tương đồng trình tự

Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng các trình tự có mức độ của độ đồng nhất trình tự hoặc độ tương đồng trình tự với (các) trình tự amino axit của polypeptit có các tính chất đặc hiệu được xác định trong bản mô tả này hoặc của trình tự nucleotit bất kỳ mà mã hóa polypeptit này (sau đây được gọi là “(các) trình tự tương đồng”). Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể tương đồng” có nghĩa là thực thể có độ tương đồng nhất định với các trình tự amino axit theo sáng chế và các trình tự nucleotit theo sáng chế. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “độ tương đồng” có thể là tương đương với “độ đồng nhất”.

Trình tự amino axit và/hoặc trình tự nucleotit tương đồng cần tạo ra và/hoặc mã hóa polypeptit mà giữ lại được hoạt tính chức năng và/hoặc tăng cường hoạt tính của enzym.

Thuật ngữ "trình tự nucleotit" theo sáng chế bao gồm Hệ gen ADN, cADN, ADN tổng hợp, và ARN. Tốt hơn là, nó có nghĩa là ADN, tốt hơn nữa là trình tự cADN mã hóa cho sáng chế.

Trong ngữ cảnh này, theo một số phương án, trình tự tương đồng được sử dụng để bao gồm trình tự amino axit hoặc trình tự nucleotit mà có thể giống ít nhất là 97%, tốt hơn là giống ít nhất là 98 hoặc 99% với trình tự theo sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự tương đồng được sử dụng để bao gồm trình tự amino axit hoặc trình tự nucleotit mà có thể giống ít nhất là 85%, tốt hơn là giống ít nhất là 90 hoặc 95% với trình tự theo sáng chế.

Thông thường, các thể tương đồng sẽ chứa, ví dụ, các vị trí hoạt động v.v. giống với trình tự amino axit theo sáng chế. Mặc dù độ tương đồng cũng có thể được xem xét theo khía cạnh độ tương tự (tức là các gốc amino axit có các chức năng/các tính chất hóa học tương tự nhau), trong ngữ cảnh của sáng chế, ưu tiên biểu diễn độ tương đồng theo khía cạnh độ đồng nhất trình tự.

Theo một phương án, trình tự tương đồng được sử dụng để bao gồm trình tự amino axit hoặc trình tự nucleotit mà có một hoặc một vài đột biến bổ sung, đột biến mất và/hoặc đột biến thế so với trình tự theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein mà trình tự amino axit của nó được thể hiện trong bản mô tả này hoặc protein có nguồn gốc từ protein (gốc) này bằng cách thế, làm khuyết hoặc bổ sung một hoặc một vài amino axit, như 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 amino axit, hoặc nhiều amino axit hơn, như 10 hoặc lớn hơn 10 amino axit trong trình tự amino axit của protein gốc và có hoạt tính của protein gốc.

Thông thường, các thể tương đồng sẽ chứa các trình tự mà mã hóa cho các vị trí hoạt động v.v. giống với trình tự theo sáng chế. Mặc dù độ tương đồng cũng có thể được xem xét theo khía cạnh độ tương tự (tức là các gốc amino axit có các chức năng/các tính chất hóa học tương tự nhau), trong ngữ cảnh của sáng chế, ưu tiên biểu diễn độ tương đồng theo khía cạnh độ đồng nhất trình tự.

Việc so sánh độ tương đồng có thể được thực hiện bằng mắt, hoặc thông thường hơn là với sự hỗ trợ của các chương trình so sánh trình tự đã có sẵn. Các

chương trình máy tính có bán trên thị trường có thể tính toán % độ tương đồng giữa hai hoặc nhiều hơn hai trình tự.

% độ tương đồng có thể được tính toán trên các trình tự liên kề, tức là một trình tự được sắp hàng với trình tự còn lại và từng amino axit trong một trình tự được so sánh trực tiếp với amino axit tương ứng trong trình tự còn lại, một gốc tại một thời điểm. Việc này được gọi là việc sắp hàng “không được tạo khoảng trống”. Thông thường, việc sắp hàng không được tạo khoảng trống như vậy chỉ được thực hiện trên số gốc tương đối ngắn.

Mặc dù đây là phương pháp rất đơn giản và nhất quán, nhưng nó không xem xét đến việc, ví dụ, trong một cặp trình tự đồng nhất theo cách khác, một đột biến chèn hoặc đột biến mất sẽ làm cho các gốc amino axit nêu dưới đây bị đưa ra khỏi quá trình sắp hàng, do đó có khả năng làm giảm đáng kể % độ tương đồng khi việc sắp hàng toàn phần được thực hiện. Kết quả là, hầu hết các phương pháp so sánh trình tự đều được thiết kế để tạo ra sự sắp hàng tối ưu mà có xem xét đến các đột biến chèn và các đột biến mất có thể có mà không trừ quá mức điểm số của độ tương đồng toàn phần. Việc này đạt được bằng cách chèn “các khoảng trống” trong quá trình so sánh trình tự để cố gắng tối đa hóa độ tương đồng cục bộ.

Tuy nhiên, các phương pháp phức hợp hơn này gán “các điểm trừ khoảng trống” cho mỗi khoảng trống mà xuất hiện trong phép sắp hàng sao cho, đối với cùng một số lượng amino axit đồng nhất, phép sắp hàng trình tự với số khoảng trống ít nhất có thể - phản ánh độ liên quan cao hơn giữa hai trình tự được so sánh - sẽ đạt được điểm số cao hơn so với phép sắp hàng với nhiều khoảng trống. “Phí tổn khoảng trống afin” thường được sử dụng mà tính phí tổn tương đối cao cho sự tồn tại của một khoảng trống và điểm trừ nhỏ hơn cho mỗi gốc sau đó trong khoảng trống này. Đây là hệ thống cho điểm khoảng trống được sử dụng phổ biến nhất. Tất nhiên, điểm trừ khoảng trống cao sẽ tạo ra các sắp hàng được tối ưu hóa với số khoảng trống ít hơn. Hầu hết các chương trình sắp hàng đều cho phép thay đổi điểm trừ khoảng trống. Tuy nhiên, ưu tiên sử dụng các trị số mặc định khi sử dụng phần mềm như vậy để so sánh trình tự.

Do đó, việc tính toán % độ tương đồng cực đại trước tiên cần đến việc tạo ra phép sắp hàng tối ưu, có xem xét đến điểm trừ khoảng trống. Chương trình máy tính thích hợp để tiến hành phép sắp hàng như vậy là Vector NTI (Invitrogen Corp.). Các

ví dụ về phần mềm mà có thể thực hiện việc so sánh trình tự bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, gói BLAST (xem ấn phẩm Ausubel et al 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed - Chapter 18), BLAST 2 (xem ấn phẩm FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 và tatiana@ncbi.nlm.nih.gov), FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) và AlignX. Ít nhất là BLAST, BLAST 2 và FASTA là có sẵn để tra cứu trực tuyến và ngoại tuyến (xem ấn phẩm Ausubel et al 1999, các trang 7-58 đến 7-60).

Mặc dù % độ tương đồng cuối cùng có thể được đo theo khía cạnh độ đồng nhất, nhưng bản thân quy trình sắp hàng thường không dựa vào việc so sánh tất cả các cặp hoặc không có cặp nào. Thay vào đó, ma trận cho điểm độ tương tự có chia tỷ lệ thường được sử dụng mà gán các điểm số cho mỗi so sánh theo từng cặp dựa trên cơ sở độ tương tự hóa học hoặc khoảng cách tiến hóa. Ví dụ về ma trận như vậy mà được sử dụng phổ biến là ma trận BLOSUM62 – là ma trận mặc định cho bộ chương trình BLAST. Các chương trình Vector NTI thường sử dụng các trị số mặc định có công khai hoặc bảng so sánh ký hiệu theo đặt hàng nếu được cung cấp (xem hướng dẫn sử dụng để biết thêm chi tiết). Đối với một số ứng dụng, ưu tiên sử dụng các trị số mặc định cho gói Vector NTI.

Theo cách khác, tỷ lệ phần trăm độ tương đồng có thể được tính toán bằng cách sử dụng tính năng sắp hàng nhiều phần trong Vector NTI (Invitrogen Corp.), dựa trên một thuật toán, tương tự với CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Khi phần mềm đã tạo ra được phép sắp hàng tối ưu, thì có thể tính toán % độ tương đồng, tốt hơn là % độ đồng nhất trình tự. Phần mềm thường thực hiện việc này dưới dạng một phần của quá trình so sánh trình tự và tạo ra các kết quả bằng số.

Nếu điểm trừ khoảng trống được sử dụng khi xác định độ đồng nhất trình tự, thì tốt hơn là các thông số nêu dưới đây được sử dụng để sắp hàng theo từng cặp:

Đối với CLUSTAL	and	PROTEIN	
Cỡ chữ	2	1	K bộ ba
Điểm trừ khoảng trống	15	10	
Mở rộng khoảng trống	6,66	0,1	

Theo một phương án, CLUSTAL có thể được sử dụng với điểm trừ khoảng trống và mở rộng khoảng trống được thiết đặt như nêu trên.

Thích hợp là, mức độ của độ đồng nhất liên quan đến một trình tự amino axit được xác định trên ít nhất là 20 gốc amino axit liền kề, tốt hơn là trên ít nhất là 30 gốc liền kề, tốt hơn là trên ít nhất là 40 gốc liền kề, tốt hơn là trên ít nhất là 50 gốc liền kề, tốt hơn là trên ít nhất là 60 gốc liền kề, tốt hơn là trên ít nhất là 100 gốc liền kề.

Thích hợp là, mức độ của độ đồng nhất liên quan đến một trình tự amino axit có thể được xác định trên toàn bộ trình tự được nêu trong bản mô tả này.

Các trình tự này cũng có thể có các đột biến mất, các đột biến chèn hoặc các đột biến thế của các gốc amino axit mà tạo ra sự biến đổi âm và dẫn đến việc tạo ra chất tương đương về mặt chức năng. Các đột biến thế amino axit chủ động có thể được tạo ra dựa trên cơ sở độ tương tự về độ phân cực, điện tích, độ tan, độ kỵ nước, độ ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc miễn là hoạt tính gắn kết thứ cấp của chất vẫn được giữ lại. Ví dụ, các amino axit tích điện âm bao gồm axit aspartic và axit glutamic; các amino axit tích điện dương bao gồm lysin và arginin; và các amino axit với các nhóm đầu phân cực không tích điện có các trị số độ ưa nước tương tự bao gồm leuxin, isoleuxin, valin, glyxin, alanin, asparagin, glutamin, serin, threonin, phenylalanin, và tyrosin.

Các đột biến thế bảo toàn có thể được tạo ra, ví dụ theo bảng nêu dưới đây. Các amino axit trong cùng một khối trong cột thứ hai và tốt hơn là trong cùng một dòng trong cột thứ ba có thể được thế cho nhau:

BÉO	Không phân cực	G A P
		I L V
	Phân cực – không tích điện	C S T M
		N Q

	Phân cực – tích điện	D E
		K R
THƠM		H F W Y

Sáng chế còn bao gồm đột biến thể tương đồng (cả đột biến thể và đột biến thay thế đều được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là sự trao đổi gốc amino axit hiện có với gốc thay thế) mà có thể xuất hiện, tức là sự thể giống nhau cho giống nhau như có tính bazơ cho có tính bazơ, có tính axit cho có tính axit, phân cực cho phân cực v.v. Đột biến thể không tương đồng cũng có thể xảy ra, tức là từ một lớp gốc cho lớp khác hoặc theo cách khác là liên quan đến việc bao gồm các amino axit không tự nhiên như ornithin (sau đây được gọi là Z), ornithin axit diaminobutyric (sau đây được gọi là B), norleuxin ornithin (sau đây được gọi là O), pyriylalanin, thienylalanin, naphtylalanin và phenylglyxin.

Các đột biến thay thế cũng có thể được tạo ra bởi các amino axit không tự nhiên bao gồm; các amino axit alpha* và được thể hai lần ở vị trí alpha*, các amino axit N-alkyl*, axit lactic*, các dẫn xuất halogen của các amino axit tự nhiên như triflortyrosin*, p-Cl-phenylalanin*, p-Br-phenylalanin*, p-I-phenylalanin*, L-allyl-glyxin*, β -alanin*, axit L- α -amino butyric*, axit L- γ -amino butyric*, axit L- α -amino isobutyric*, axit L- ϵ -amino caproic[#], axit 7-amino heptanoic*, L-methionin sulfon[#], L-norleuxin*, L-norvalin*, p-nitro-L-phenylalanin*, L-hydroxyprolin[#], L-thioprolin*, các dẫn xuất metyl của phenylalanin (Phe) như 4-metyl-Phe*, pentametyl-Phe*, L-Phe (4-amino)[#], L-Tyr (metyl)*, L-Phe (4-isopropyl)*, L-Tic (axit 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-carboxyl)*, axit L-diaminopropionic[#] và L-Phe (4-benzyl)*. Ký hiệu * được sử dụng nhằm mục đích mô tả nêu trên (liên quan đến đột biến thể tương đồng hoặc không tương đồng), để thể hiện bản chất kỵ nước của dẫn xuất trong khi # được sử dụng để thể hiện bản chất ưa nước của dẫn xuất, #* thể hiện các đặc tính lưỡng tính.

Các trình tự amino axit biến thể có thể bao gồm các nhóm đệm thích hợp mà có thể được chèn giữa hai gốc amino axit bất kỳ của trình tự này bao gồm các gốc alkyl như các gốc metyl, etyl hoặc propyl ngoài các nhóm đệm amino axit như các gốc glyxin hoặc β -alanin. Dạng biến đổi khác, liên quan đến sự có mặt của một hoặc nhiều hơn gốc amino axit ở dạng peptoit, sẽ được hiểu rõ bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ

thuật này. Để tránh nghi ngờ, “dạng peptoit” được sử dụng để chỉ các gốc amino axit biến thể trong đó nhóm thế α -cacbon nằm trên nguyên tử nitơ của gốc chứ không phải α -cacbon. Các quy trình tạo ra các peptit ở dạng peptoit này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ ấn phẩm Simon RJ *et al.*, *PNAS* (1992) 89(20), 9367-9371 và Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (1995) 13(4), 132-134.

Theo một phương án, xylanaza được sử dụng trong sáng chế có thể chứa trình tự polypeptit được nêu trong bản mô tả này với đột biến thể bảo toàn của ít nhất một amino axit trong số các amino axit.

Thích hợp là, có thể có ít nhất 2 đột biến thể bảo toàn, như ít nhất 3 hoặc ít nhất 4 hoặc ít nhất 5.

Thích hợp là, có thể có nhỏ hơn 15 đột biến thể bảo toàn, như nhỏ hơn 12, nhỏ hơn 10, hoặc nhỏ hơn 8 hoặc nhỏ hơn 5.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Đáp ứng của gà giò được cho ăn khẩu phần ăn dựa trên cơ sở lúa mì chứa xylanaza, β -glucanaza và vi sinh vật được nuôi trực tiếp

Nguyên liệu và phương pháp

Việc sử dụng các động vật và quy trình thí nghiệm được phê chuẩn bởi Ủy ban Thí nghiệm động vật cấp cơ sở. Khẩu phần ăn được phối chế để cân bằng về năng lượng và các dưỡng chất cho gà giò non (từ 0 đến 21 ngày tuổi) (bảng 1, khẩu phần ăn I). Thành phần ngũ cốc của khẩu phần ăn là lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen, mì tấm, cám mì hoặc các tổ hợp của chúng trong khi thành phần protein là bột đậu tương và nguồn chất béo là dầu cải dầu. Không có chất kháng sinh hoặc thuốc kháng cầu trùng tổng hợp nào được bao gồm, và khẩu phần ăn này được cung cấp dưới dạng cám trộn. Khẩu phần ăn cơ bản này được chia thành các phần và các enzym và các DFM tương ứng được thêm vào để tạo thành các khẩu phần ăn thí nghiệm được mô tả trong bảng 2.

Mỗi phần bổ sung được cung cấp trong hỗn hợp trộn sẵn và được đưa vào thiết bị trộn trong quá trình chuẩn bị khẩu phần ăn. Các khẩu phần ăn chứa DFM được trộn trước và thiết bị trộn được giới rửa giữa mỗi khẩu phần ăn để ngăn ngừa sự nhiễm tạp chéo. Các mẫu được thu lại từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý ở thời điểm lúc đầu, giữa, và cuối của mỗi mẻ và được hòa trộn với nhau để xác nhận các hoạt tính enzym và sự có mặt của DFM trong thức ăn trước khi bắt đầu thử nghiệm ở động vật. Các mẫu bổ

sung từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý được giữ lại và được lưu giữ đến khi cần ở $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ để phân tích.

Các con gà giò đực (Ross 308) được nhận ở độ tuổi là 72 giờ hoặc nhỏ hơn từ một trại giống thương mại. Các con gà con này được cân từng cá thể riêng lẻ và được phân bổ vào 32 lồng ấp (8 con mỗi lồng) sao cho trọng lượng trung bình của gà ở mỗi lồng là tương tự nhau. Sau đó, 4 phương án xử lý khẩu phần ăn (bảng 2) được phân ngẫu nhiên vào 8 lồng đối với mỗi phương án. Vào ngày 12, các con gà này được chuyển sang các lồng nuôi. Sự phân bổ không gian cho mỗi con gà trong các lồng ấp và lồng nuôi là 530 và 640 cm^2 , một cách tương ứng. Các lồng ấp và lồng nuôi được đặt trong các phòng được kiểm soát về môi trường. Nhiệt độ được duy trì ở 31°C trong tuần đầu tiên và sau đó được giảm từ từ xuống 22°C vào cuối tuần thứ ba. Các con gà này được chiếu huỳnh quang trong 20 giờ và được để cho tự do tiếp cận các khẩu phần ăn và nước. Các khẩu phần ăn được cung cấp từ ngày 0 đến 21. Trọng lượng cơ thể được ghi lại hằng tuần trong suốt thời kỳ thí nghiệm là 21 ngày. Tỷ lệ tử vong được ghi lại hằng ngày. Các dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng quy trình GLM của SAS.

Bảng 1: Thành phần của khẩu phần ăn dựa trên cơ sở lúa mì cho gà giò (% , như được cho ăn)

Thành phần	Khẩu phần ăn I	Khẩu phần ăn II	Khẩu phần ăn III
Lúa mì	44,9	43,9	44,36
Mì tấm	3,00	2,83	-
Lúa mạch	10,0	10,0	-
Lúa mạch đen	-	5,00	-
Cám mì	-	-	22,8
Bột đậu tương	30,9	29,3	23,9
Chất béo	5,89	4,25	-
Dầu cải dầu	-	-	4,5
L-Lysin HCl	0,40	0,32	0,59
DL-Methionin	0,34	0,24	0,23
L-Threonin	0,19	0,10	0,25

Natri Bicacbonat	-	0,20	-
Muối	0,17	0,23	0,36
Đá vôi	1,69	1,32	1,00
Monocanxi Phosphat	1,55	1,00	1,61
Hỗn hợp trộn sẵn của các vitamin/khoáng chất vết	0,50	1,00	0,40
Titan dioxit	-	0,30	-
Lượng cung cấp tính được			
Protein thô, %	22,1	21,8	21,8
Năng lượng có thể chuyển hóa được, MJ/kg	12,7	11,60	11,63
Canxi, %	1,05	0,88	0,88
Phospho khả dụng, %	0,50	0,38	0,38
Lysin có thể tiêu hóa được, %	1,27	1,15	1,15
Methionin có thể tiêu hóa được %	0,63	0,51	0,51

Bảng 2: Mô tả các phương án xử lý

ID	Mô tả ¹
1	Đối chứng, không có chất phụ gia
2	NC + Xylanaza (2500 XU/kg)
3	NC + Xylanaza (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg)
4	NC + Xylanaza (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg) + DFM ² (7,5e+04)

¹Các enzym (xylanaza (Danisco Xylanase endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) và β -glucanaza Aextra®XB) là các sản phẩm thương mại được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition.

²Vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở ba chủng *Bacillus*, được chọn lọc dựa trên khả năng tiết các enzym được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition dưới dạng tỷ lệ bằng nhau của các chủng AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) và AGTP BS1013 (NRRL B-50509).

Kết quả

Bảng 3: Các tác dụng của xylanaza, β -glucanaza và vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Bacillus* đối với hiệu suất tăng trưởng của gà giò non.

	Trọng lượng cơ thể tại thời điểm 21 ngày, g	Sự tăng trọng lượng cơ thể, g
1	863,8b	827,4b
2	897,0ab	860,4ab
3	899,6ab	863,4ab
4	906,3a	869,6a
Sai số chuẩn	16,98	16,92

N.B. Các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,10$) giữa các giá trị trong cột đó

Các con gà con được cho ăn tổ hợp của xylanaza, enzym phân giải chất xơ (β -glucanaza) và DFM dựa trên cơ sở *Bacillus* tăng trưởng nhanh hơn so với đối chứng và tốt hơn về số lượng so với các con gà con được cho ăn khẩu phần ăn chỉ chứa các enzym. Trọng lượng cơ thể tại thời điểm 21 ngày và sự tăng trọng lượng cơ thể tốt hơn về số lượng ở các con gà con được cho ăn các tổ hợp theo ba cách của xylanaza, β -glucanaza và DFM so với đối chứng.

II. Khả năng tiêu hóa/sự tích trữ năng lượng và các dưỡng chất

Nguyên liệu và phương pháp

Việc sử dụng các động vật và quy trình thí nghiệm được phê chuẩn bởi Ủy ban Thí nghiệm động vật cấp cơ sở. Khẩu phần ăn dựa trên cơ sở lúa mì-lúa mạch được phối chế để cân bằng về năng lượng và các dưỡng chất cho gà giò non (từ 0 đến 21 ngày tuổi) (bảng 1, khẩu phần ăn II). Titan dioxit được bao gồm với lượng là 0,30% để cho phép xác định sự tích trữ thành phần trong khẩu phần ăn. Không có chất kháng sinh hoặc thuốc kháng cầu trùng tổng hợp nào được bao gồm, và khẩu phần ăn này được cung cấp dưới dạng cám trộn. Khẩu phần ăn cơ bản này được chia thành các phần và các enzym và các DFM tương ứng được thêm vào để tạo thành các khẩu phần ăn thí nghiệm được mô tả trong bảng 4. Mỗi phần bổ sung được trộn trước và thiết bị trộn được giới rửa để ngăn ngừa sự nhiễm tạp chéo của các khẩu phần ăn đã được xử lý. Các mẫu được thu lại từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý ở thời điểm lúc đầu, giữa, và

cuối của mỗi mẻ và được hòa trộn với nhau để xác nhận các hoạt tính enzym và sự có mặt của DFM trong thức ăn trước khi bắt đầu thử nghiệm ở động vật. Các mẫu bổ sung từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý được giữ lại và được lưu giữ đến khi cần ở $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ để phân tích.

Bảng 4: Mô tả các phương án xử lý

s	Mô tả ¹
1	Đối chứng, không có chất phụ gia
2	NC + Xylanaza (2500 XU/kg)
3	NC + Xylanaza (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 XBGU/kg)
4	NC + Xylanaza (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg) + DFM ² ((7,5e+04)

¹Các enzym (xylanaza (Danisco Xylanase endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) và β -glucanaza (Aextra® XB)) là các sản phẩm thương mại được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition.

²Vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở ba chủng *Bacillus*, được chọn lọc dựa trên khả năng của chúng trong việc tiết các enzym được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition dưới dạng tỷ lệ bằng nhau của các chủng AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) và AGTP BS1013 (NRRL B-50509).

Nghiên cứu này liên quan đến thử nghiệm trong lồng, được thực hiện để thu được các mẫu chất bài tiết để đo khả năng tiêu hóa các dưỡng chất và năng lượng. Các con gà giò đực ở độ tuổi là 72 giờ hoặc nhỏ hơn (Ross 308) được nhận từ một trại giống thương mại. Sau khi đến nơi, các con gà con này được cân từng cá thể riêng lẻ và được phân lớp theo trọng lượng cơ thể và được phân bổ vào 30 lồng (năm con mỗi lồng) sao cho trọng lượng trung bình của gà ở mỗi lồng là tương tự nhau. Sau đó, bốn phương án xử lý khẩu phần ăn được phân ngẫu nhiên vào sáu lồng lặp lại. Thử nghiệm này được tiến hành từ ngày 0 đến 21, trong khoảng thời gian đó các con gà được tự do tiếp cận các phương án xử lý khẩu phần ăn đã được phân cho chúng và nước. Nhiệt độ lò ấp và nhiệt độ trong phòng được thiết đặt ở 32 và 29°C, một cách tương ứng, trong suốt tuần đầu tiên. Sau đó, nguồn cung cấp nhiệt trong lò ấp được tắt đi và nhiệt độ trong phòng được duy trì ở 29°C trong suốt thí nghiệm. Ánh sáng được cung cấp trong 24 giờ trong suốt thí nghiệm. Vào các ngày 17, 18, 19 và 20, các mẫu chất bài tiết

được thu lại và được lưu giữ đông lạnh ở -20°C để xác định khả năng tiêu hóa/sự tích trữ các dưỡng chất và năng lượng. Thực hiện cẩn thận trong quá trình thu các mẫu chất bài tiết để tránh nhiễm tạp từ lông và các vật liệu lạ khác. Các mẫu chất bài tiết được gộp lại trong mỗi lồng, được trộn kỹ bằng thiết bị hòa trộn và hai mẫu đại diện mỗi lồng được lấy ra. Các mẫu được làm khô lạnh. Các mẫu đã được làm khô được nghiền để đi qua được rây loại 0,5 mm và được lưu giữ trong các hộp nhựa kín khí ở -4°C đến khi phân tích hóa học. Các mẫu khẩu phần ăn và chất bài tiết được phân tích về vật chất khô, protein thô (dưới dạng nitơ), năng lượng toàn phần, chất béo (dưới dạng các sản phẩm chiết bằng hexan) và xơ không tan trong chất rửa trung tính các phương pháp phân tích AOAC chính thức). Titan (chất đánh dấu khả năng tiêu hóa) được phân tích theo các quy trình được mô tả bởi ấn phẩm Lomer et al. (2000, *Analyst* 125:2339–2343). Khả năng tiêu hóa/sự tích trữ được tính toán bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn (Adeola, O. 2001. Digestion and balance techniques in pigs. Pages 903–916 in Swine Nutrition, 2nd ed. A. J. Lewis, and L. L. Southern, ed. CRC Press, Washington, DC). Các dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng quy trình mô hình tuyến tính tổng quát của SAS (2004).

Kết quả

Bảng 5: Các tác dụng của xylanaza, enzym phân giải chất xơ và các vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Bacillus* đối với khả năng tiêu hóa/sự tích trữ các dưỡng chất và khả năng chuyển hóa năng lượng ở gà giò non.

Phương án xử lý	Khả năng tiêu hóa/sự tích trữ biểu kiến, %				ME, kcal/kg
	Vật chất khô	Protein thô	Chất béo	Xơ không tan trong chất rửa trung tính	
1	67,4d	62,2c	78,3c	29,0c	2875c
2	71,2b	64,7b	81,5b	37,1a	3033b
3	70,9c	63,8bc	82,9b	33,1b	3040b
4	73,9a	68,8a	86,0a	38,9a	3154a
Sai số chuẩn	0,06	0,70	0,71	1,06	2,92

N.B. Các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,10$) giữa các giá trị trong cột đó

Tổ hợp của xylanaza, β -glucanaza và vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Bacillus* cải thiện việc sử dụng năng lượng trong khẩu phần ăn của gà giò non so với đối chứng hoặc xylanaza riêng lẻ hoặc tổ hợp của xylanaza và β -glucanaza (bảng 5). Điều này có thể có liên quan đến sự tăng cường tích trữ các dưỡng chất sinh năng lượng như chất xơ, chất béo và nitơ (bảng 5). Sự tích trữ chất béo được tăng cường nhờ các tổ hợp theo ba cách là đáng chú ý và có thể có liên quan đến sự tăng cường tiêu hóa và hấp thụ chất béo trong khẩu phần ăn và cả sự sản xuất và hấp thụ các axit béo chuỗi ngắn từ quá trình lên men. Các lợi ích được quan sát thấy của tổ hợp theo ba cách của xylanaza, β -glucanaza, DFM sản xuất axit propionic/*Bacillus* tốt hơn về mặt sử dụng các dưỡng chất và năng lượng cũng có thể được suy đoán là có liên quan đến sự cải thiện chức năng và sức khỏe của ruột thông qua sự điều biến khu hệ vi sinh vật tích cực và chức năng hấp thụ/tiêu hóa của ruột.

III. Sản xuất axit lactic trong manh tràng

Nguyên liệu và phương pháp

Mô phỏng manh tràng gà *in vitro*

Mô hình manh tràng gà được phát triển từ hệ *in vitro* trong ruột kết của người đã được mô tả trước đó (Mäkivuokko et al. 2006; *Nutrition and Cancer* 52:94-104, Mäkeläinen et al. 2009; *International Dairy Journal* 19:675-683). Mô hình manh tràng *in vitro* này bao gồm bốn bình kết nối với nhau được cấy chủng bằng các vi sinh vật manh tràng tươi. Khẩu phần ăn cơ bản dựa trên cơ sở lúa mì-cám mì được phối chế để cân bằng về năng lượng và các dưỡng chất cho gà giò non (bảng 1, khẩu phần ăn III). Không có chất kháng sinh hoặc thuốc kháng khuẩn tổng hợp nào được bao gồm trong khẩu phần ăn cơ bản này. Khẩu phần ăn cơ bản này được chia thành các phần và các enzym và các DFM tương ứng được thêm vào để tạo thành các khẩu phần ăn thí nghiệm được mô tả trong bảng 6. Các thức ăn khác nhau trải qua sự tiêu hóa được mô phỏng của ống tiêu hóa trên trước khi chúng được cấp vào hệ manh tràng *in vitro* trong suốt 5 giờ mô phỏng. Các bình này mô phỏng các ngăn manh tràng của gà, mỗi bình có độ pH giống nhau (6,25). Kỹ thuật phân tích sắc ký axit lactic từ các mẫu mô phỏng manh tràng được thực hiện với axit pivalic làm chất nội chuẩn theo nội

dung tương tự như được mô tả trước đó (Ouwehand et al. 2009; *The British Journal of Nutrition* 101:367-375).

Bảng 6: Mô tả các phương án xử lý

ID	Mô tả
1	Xylanaza ¹ (2500 XU/kg)
2	Hỗn hợp xylanaza + FDE ²
3	Hỗn hợp xylanaza (2500 XU/kg)+ FDE ² + DFM ³

¹DANISCO XYLANASE, Danisco Animal Nutrition

²ACCELLERASE® TRIO™ phức hợp enzym chứa tổ hợp có hiệu lực của các hoạt tính enzym bao gồm các β -glucanaza (200 CMC U/kg), các xylanaza (ví dụ, các endoxylanaza - endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8))(>1200 ABX U/kg) và các β -glucosidaza (>800 pNPG U/kg) được cung cấp bởi DuPont Industrial Biosciences.

³vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở ba chủng *Bacillus* được chọn lọc dựa trên khả năng của chúng trong việc tiết các enzym được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition dưới dạng tỷ lệ bằng nhau của các chủng AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) và AGTP BS1013 (NRRL B-50509).

Kết quả

Bảng 7: Các tác dụng của xylanaza, hỗn hợp của các enzym phân giải chất xơ và vi sinh vật được nuôi trực tiếp đối với sự sản xuất axit lactic trong trong manh tràng gà

Phương án xử lý	Axit lactic, $\mu\text{mol/ml}$
1	17,51b
2	19,67b
3	42,23a
SEM	7,525

N.B. Các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,10$) giữa các giá trị trong cột đó

Tổ hợp của xylanaza + hỗn hợp của các enzym phân giải chất xơ khác + các vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Bacillus* làm tăng sự sản xuất axit lactic trong manh tràng so với enzym riêng lẻ hoặc các tổ hợp enzym riêng lẻ. Axit lactic được sản xuất bởi vi khuẩn sản xuất axit lactic, trong đó *Lactobacillus* và

Streptococcus chiếm ưu thế; các vi khuẩn này đã được biết là có các tính chất tăng cường sức khỏe trong ruột (Walter, 2008; *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4985-4996). Axit lactic có các tác dụng kháng khuẩn đối với các mầm bệnh như loài *E. coli* và *Salmonella* (Nout *et al.* 1989; *International Journal of Food Microbiology* 8, 351–361), và *Lactobacillus* có thể ức chế sự bám dính của *E. coli* vào ruột non (Hillman *et al.* 1994; *Journal of Applied Microbiology* 76: 294–300.). Do đó, nồng độ cao của axit lactic nhờ tổ hợp theo ba cách của xylanaza, các enzym phân giải chất xơ và vi sinh vật được nuôi trực tiếp có thể phản ánh sự gia tăng quần thể và hoạt tính của các vi sinh vật có liên quan đến sức khỏe của ruột này.

IV. Quần thể vi sinh vật manh tràng

Nguyên liệu và phương pháp

Các con gà giò được phân vào các chuồng dựa trên cơ sở trọng lượng cơ thể ban đầu và các khẩu phần ăn thí nghiệm được phân bổ ngẫu nhiên bằng cách sử dụng thiết kế thí nghiệm đã được công nhận. Các con gà này được để cho tự do tiếp cận các khẩu phần ăn thí nghiệm trong thời kỳ từ ngày 0 đến 21.

Các mẫu chất bài tiết được thu lại hằng ngày từ ngày d18 đến d20 và được lưu giữ ở -20°C. Vào ngày 21, các con gà này bị giết bằng cách vặn cổ, và các thành phần của manh tràng được thu lại và được lưu giữ đông lạnh ở -20°C để xác định VFA manh tràng.

Chiết ADN: 0,2 g sản phẩm tiêu hóa trong manh tràng được tạo huyền phù trong PBS, và sau đó được phân lập tiếp bằng bước phá tế bào bằng vi hạt và sau đó tự động bằng MagMax bằng cách sử dụng bộ kit thương mại, MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems). Lượng ADN đã được phân lập được xác định bằng cách sử dụng thiết bị đo quang phổ Nanodrop ND-1000 Full-spectrum UV/Vis (Wilmington, DE, USA). Kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy được sử dụng như được mô tả trước đó (Apajalahti *et al.* 2002, *Appl Environ Microbiol* 68(10): 4986-4995) để đếm tổng số vi khuẩn hoặc vi khuẩn đặc hiệu từ các mẫu.

Quy trình PCR: ADN đã được phân lập được phân tích bằng kỹ thuật qPCR (phản ứng chuỗi polymeraza định lượng) bằng cách sử dụng hệ sinh học ứng dụng (Applied Biosystems). Các đoạn mồi đặc hiệu được sử dụng để phát hiện chi vi sinh vật đang được quan tâm đặc biệt như được mô tả trong 3.

Bảng 8: Các tài liệu tham khảo mà các đoạn môi đặc hiệu chỉ có thể được tìm thấy từ đó dùng để định lượng quần thể vi sinh vật trong sản phẩm tiêu hóa bằng kỹ thuật qPCR

Chi đang quan tâm	Tài liệu tham khảo mà các đoạn môi đặc hiệu được lấy từ đó
<i>Enterobacteriaceae</i>	Matsuda et al. (2007), Appl Environ Microbiol 73(1):32-39
<i>Propionibacterium</i>	Peng et al. 2011
<i>Lactobacillus</i>	Heilig et al (2002) Appl Environ Microbiol 68:114-123, Walter et al (2001) Appl Environ Microbiol 67:2578-2585
<i>Ruminococcus</i>	Rinttilä et al (2004), J Appl Microbiol 97,1166-1177, Mosoni et al. J Appl Microbiol, 2007, 103: 2676-85 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18045448
<i>Fibrobacter</i>	MvDonald et al. 2008. Environ. Microbiol. 1:1310-1319
<i>Roseburia</i>	Mäkivuokko et al. 2010. Beneficial Microbes, 1;131-137
<i>Faecalibacterium</i>	Rinttilä et al. J Appl Microbiol, 2004, 97, 1166-1177
<i>Bacteroides</i>	Mulugeta et al., 2012. J Environ Manage. 2012 Jul 30;103:95-101.

Tổ hợp của xylanaza + (mannanaza hoặc β -Glucanaza) + các DFM gây ra sự chuyển dịch quần thể vi sinh vật manh tràng sang hướng có lợi cho *Lactobacillus* và/hoặc các nhóm đặc hiệu khác mà được biết là vi khuẩn phân giải chất xơ: *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Roseburia*.

Ví dụ 2: Tác dụng của 2 xylanaza và các enzym phân giải chất xơ khác (hỗn hợp FDE) và DFM (vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Bacillus*; vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Lactobacillus* khi được cho ăn theo cách riêng lẻ hoặc trong tổ hợp đối với hiệu suất tăng trưởng và các axit béo dễ bay hơi trong manh tràng ở gà giò non được cho ăn các khẩu phần ăn dựa trên cơ sở ngô

Thí nghiệm 1

Nguyên liệu và phương pháp

Việc sử dụng các động vật và quy trình thí nghiệm được phê chuẩn bởi Ủy ban Thí nghiệm động vật cấp cơ sở. Khẩu phần ăn cơ bản, như được cho ăn, được phối chế để cân bằng về năng lượng và protein, và để phù hợp với các yêu cầu đối với gà đang tăng trưởng thuộc lứa tuổi và kiểu gen đó (bảng 9). Thành phần ngũ cốc của khẩu

phần ăn là ngô, và thành phần protein có thể là bột đậu tương cùng với hoặc không cùng với các thành phần protein khác như bột cải Canola, bột cải dầu, v.v. Các đồng sản phẩm của ngô như DDGS hoặc bột mầm ngô hoặc bột gluten ngô có thể được cho vào riêng lẻ hoặc trong tổ hợp, với điều kiện là khẩu phần ăn này được phối chế để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của gà được cho ăn. Không có chất kháng sinh hoặc thuốc kháng cầu trùng tổng hợp nào được bao gồm, và khẩu phần ăn này được cung cấp dưới dạng cám trộn. Chất đánh dấu khả năng tiêu hóa phổ biến (titan dioxit, crom (III) oxit hoặc xelit) được bao gồm với lượng là 3 g/kg để cho phép xác định khả năng tiêu hóa của các thành phần trong khẩu phần ăn. Khẩu phần ăn cơ bản này được chia thành các phần và các enzym và các DFM tương ứng được thêm vào để tạo thành các khẩu phần ăn thí nghiệm được mô tả trong bảng 10. Mỗi phần bổ sung được trộn trước và thiết bị trộn được giới rửa để ngăn ngừa sự nhiễm tạp chéo của các khẩu phần ăn đã được xử lý. Các mẫu được thu lại từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý ở thời điểm lúc đầu, giữa, và cuối của mỗi mẻ và được hòa trộn với nhau để xác nhận các hoạt tính enzym và sự có mặt của DFM trong thức ăn trước khi bắt đầu thử nghiệm ở động vật. Các mẫu bổ sung từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý được giữ lại và được lưu giữ đến khi cần ở $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ để phân tích.

Bảng 9: Thành phần của khẩu phần ăn cơ bản dựa trên cơ sở ngô (% , như được cho ăn) cho gà giò từ ngày 0 đến 21

	Khẩu phần ăn I	Khẩu phần ăn II
Ngô	54,7	58,2
DDGS ngô	11,0	-
Bột cải dầu	-	16,2
Bột đậu tương	28,9	19,4
Chất béo	1,00	-
Dầu cải dầu	-	2,11
L-Lysin HCl	0,43	0,50
DL-Methionin	0,27	0,17
L-Threonin	0,11	0,16
Natri Bicacbonat	0,20	-
Muối	0,22	0,35

Đá vôi	1,53	0,70
Monocanxi phosphat	0,56	1,90
Hỗn hợp trộn sẵn của vitamin/khoáng chất	1,00	0,40
Lượng cung cấp tính được		
Protein thô, %	21,1	21,1
Năng lượng có thể chuyển hóa được, MJ/kg	11,5	11,6
Canxi	0,89	0,89
Phospho có thể tiêu hóa được, %	0,28	0,28
Lysin có thể tiêu hóa được, %	1,15	1,15
Methionin có thể tiêu hóa được, %	0,55	0,55

Bảng 10: Mô tả các khẩu phần ăn thí nghiệm

Phương án xử lý	Mô tả
1	Đối chứng, cơ bản (NC)
2	NC + Xylanaza ¹ 1
3	NC + Xylanaza 1 + hỗn hợp FDE ⁴
4	NC + Xylanaza 1+ DFM <i>Bacillus</i> ²
5	NC + Xylanaza 1+ DFM <i>Lactobacillus</i> ³
6	NC + Xylanaza 1 + hỗn hợp FDE ⁴ + DFM <i>Bacillus</i> ²
7	NC + Xylanaza 1 + hỗn hợp FDE ⁴ + DFM <i>Lactobacillus</i> ³
8	NC + Xylanaza ¹ 2
9	NC + Xylanaza 2 + hỗn hợp FDE ⁴
10	NC + Xylanaza 2+ DFM <i>Bacillus</i> ²
11	NC + Xylanaza 2+ DFM <i>Lactobacillus</i> ³
12	NC + Xylanaza 2 + hỗn hợp FDE ⁴ + DFM <i>Bacillus</i> ²
13	NC + Xylanaza 2 + hỗn hợp FDE ⁴ + DFM <i>Lactobacillus</i> ³

¹ Các xylanaza (ví dụ, endo-1,4-β-D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8) từ hai sinh vật nguyên gốc khác nhau

² DFM *Bacillus* được chọn làm chủng sản xuất enzym

³ DFM *Lactobacillus* đã được biết là chủng lên men đường C5; chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn; chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ; hoặc các tổ hợp của chúng

⁴ hỗn hợp FDE: Tổ hợp của các hoạt tính enzym phân giải chất xơ bao gồm beta-glucanaza, beta-glucosidaza, beta-xylosidaza và/hoặc alpha-arabinofuranosidaza

Các con gà giò được phân vào các chuồng dựa trên cơ sở trọng lượng cơ thể ban đầu và các khẩu phần ăn thí nghiệm được phân bổ ngẫu nhiên bằng cách sử dụng thiết kế thí nghiệm đã được công nhận. Các con gà này được để cho tự do tiếp cận các khẩu phần ăn thí nghiệm trong thời kỳ từ ngày 0 đến 21. Trọng lượng cơ thể (BW), lượng hấp thu thức ăn (FI) và tỷ lệ tử vong được ghi lại để tính toán sự tăng trọng lượng cơ thể (BWG), tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) và hiệu quả chuyển hóa thức ăn (FCE).

Các mẫu chất bài tiết được thu lại hằng ngày từ ngày d18 đến d20 và được lưu giữ ở -20°C để xác định sự tích trữ chất xơ và các dưỡng chất, và hàm lượng AME và AMEn. Vào ngày 21, các con gà này bị giết bằng cách vận cổ, và các thành phần của ruột hồi (từ túi thừa Meckel đến khoảng 1 cm phía trên đường nối ruột hồi-manh tràng) và manh tràng được thu nhận và được lưu giữ đông lạnh ở -20°C để xác định khả năng tiêu hóa các thành phần của ruột hồi và VFA trong manh tràng.

Hằng ngày, các mẫu chất bài tiết được gộp lại cho mỗi lồng và được làm khô trong lò ở 60°C, trong khi các mẫu sản phẩm tiêu hóa trong ruột hồi được gộp lại trên cơ sở lồng/chuồng và được làm khô lạnh. Các mẫu khẩu phần ăn, chất bài tiết và sản phẩm tiêu hóa trong ruột hồi được nghiền mịn và được trộn kỹ để phân tích. Tất cả các mẫu đều được phân tích về vật chất khô, nitơ, chất béo và năng lượng toàn phần theo các quy trình A.O.A.C. (2005). Các polysacarit không phải tinh bột hòa tan và không hòa tan được thử nghiệm trong các khẩu phần ăn và chất bài tiết theo Englyst và các đồng tác giả (1988) trong khi xơ không tan trong chất rửa trung tính, nitơ không tan trong chất rửa trung tính được thử nghiệm theo các phương pháp của Tilley và Terry (1962). Chất đánh dấu khả năng tiêu hóa được phân tích theo quy trình tiêu chuẩn của chất đánh dấu được chọn.

Kỹ thuật phân tích sắc ký các axit béo dễ bay hơi và axit lactic, ví dụ, các SCFA, được thực hiện từ các mẫu mô phỏng với axit pivalic làm chất nội chuẩn theo

nội dung tương tự như được mô tả trước đó (Ouweland et al., 2009 Feb;101(3):367-75). Nồng độ của axit axetic, propionic, butyric, isobutyric, valeric, isovaleric, 2-methylbutyric, và axit lactic được xác định.

Hệ số khả năng tiêu hóa biểu kiến của ruột hồi và hệ số tích trữ thành phần biểu kiến được tính toán theo ấn phẩm Adeola et al., 2010 (Poult Sci. 2010 Sep; 89(9):1947-54).

Lồng (chuồng) là đơn vị thí nghiệm. ANOVA được thực hiện bằng cách sử dụng các mô hình tuyến tính tổng quát của SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Khi tỷ số F thể hiện sự có nghĩa, thì giá trị trung bình của các phương án xử lý được cho là tách biệt.

Kết quả

Các nhóm đã được xử lý được cho ăn tổ hợp toàn phần: xylanaza cộng với (các) enzym phân giải chất xơ thứ cấp và DFM (*Bacillus* hoặc LB) có BWG (g/gà/ngày) cao hơn và/hoặc FCR (g BW tăng / g thức ăn hấp thu) thấp hơn và/hoặc sự tích trữ/khả năng tiêu hóa chất xơ, năng lượng và các dưỡng chất tốt hơn so với đối chứng, hoặc các chất phụ gia này được cho ăn theo cách riêng lẻ hoặc trong tổ hợp theo hai cách.

Tổ hợp của các xylanaza (xylanaza 1 và/hoặc 2) + hỗn hợp FDE + các DFM làm tăng đáng kể tổng VFA trong ruột hồi và/hoặc manh tràng và nồng độ của axit butyric hoặc axit propionic trong sản phẩm tiêu hóa trong ruột hồi và/hoặc manh tràng của gà giò.

II. Hiệu suất tăng trưởng

Thí nghiệm I

Nguyên liệu và phương pháp

Việc sử dụng các động vật và quy trình thí nghiệm được phê chuẩn bởi Ủy ban Thí nghiệm động vật cấp cơ sở. Khẩu phần ăn dựa trên cơ sở ngô/đậu tương được phối chế để cân bằng về năng lượng và các dưỡng chất cho gà giò non (từ 0 đến 21 ngày tuổi) (bảng 9, khẩu phần ăn I). Không có chất kháng sinh hoặc thuốc kháng cầu trùng tổng hợp nào được bao gồm, và khẩu phần ăn này được cung cấp dưới dạng cám trộn. Khẩu phần ăn cơ bản này được chia thành các phần và các enzym và các DFM tương ứng được thêm vào để tạo thành các khẩu phần ăn thí nghiệm được mô tả trong bảng 11.

Bảng 11: Mô tả các phương án xử lý được sử dụng trong thí nghiệm I

ID	Mô tả
1	Đối chứng âm, không có chất phụ gia (NC)
2	NC +Xylanaza ^a 1
3	NC +Xylanaza 1 + B-glucanaza ^a
4	NC +Xylanaza 1 + DFM <i>Bacillus</i> ^b
5	NC +Xylanaza 1 + B-glucanaza + DFM <i>Bacillus</i>
6	NC +Xylanaza 2 ^c
7	NC +Xylanaza 2 + B-glucanaza
8	NC +Xylanaza 2 + DFM <i>Bacillus</i>
9	NC +Xylanaza 2 + B-glucanaza + DFM <i>Bacillus</i>

^aCác enzym (xylanaza (Danisco Xylanase endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) và β -glucanaza (Aextra ® XB)) là các sản phẩm thương mại được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition

^bDFM dựa trên cơ sở ba chủng *Bacillus* (các tỷ lệ bằng nhau của các chủng AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) và AGTP BS1013 (NRRL B-50509)), được chọn lọc dựa trên khả năng của chúng trong việc tiết các enzym

^cFveXyn4 xylanaza (endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) được thể hiện là SEQ ID No. 3 trong bản mô tả này (còn được mô tả trong PCT/CN2012/079650, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), Danisco Animal Nutrition.

Tất cả các phân bổ sung được cung cấp trong hỗn hợp trộn sẵn mà được đưa vào thiết bị trộn trong quá trình chuẩn bị khẩu phần ăn. Các khẩu phần ăn chứa DFM được trộn trước và thiết bị trộn được giới rửa giữa mỗi khẩu phần ăn để ngăn ngừa sự nhiễm tạp chéo. Các mẫu được thu lại từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý ở thời điểm lúc đầu, giữa, và cuối của mỗi mẻ và được hòa trộn với nhau để xác nhận các hoạt tính enzym và sự có mặt của DFM trong thức ăn trước khi bắt đầu thử nghiệm ở động vật. Các mẫu bổ sung từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý được giữ lại và được lưu giữ đến khi cần ở $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ để phân tích. Các con gà giò đực (Hubbard-Cobb) được nhận ở

độ tuổi là 72 giờ hoặc nhỏ hơn từ một trại giống thương mại. Vào ngày 0, các con gà con này được cân từng cá thể riêng lẻ và được phân bổ vào 72 lồng (8 con mỗi lồng) sao cho trọng lượng trung bình của gà ở mỗi lồng là tương tự nhau. Sau đó, 9 phương án xử lý khẩu phần ăn (bảng 11) được phân ngẫu nhiên vào 8 lồng đối với mỗi phương án. Các lồng này được đặt trong các phòng được kiểm soát về môi trường. Nhiệt độ được duy trì ở 31°C trong tuần đầu tiên và sau đó được giảm từ từ xuống 22°C vào cuối tuần thứ ba. Các con gà này được chiếu huỳnh quang trong 20 giờ và được để cho tự do tiếp cận các khẩu phần ăn và nước trong thời gian nghiên cứu. Trọng lượng cơ thể và lượng hấp thu thức ăn được ghi lại vào lúc đầu và cuối của thời kỳ thí nghiệm dài 21 ngày. Tỷ lệ tử vong được ghi lại hàng ngày. Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn được tính toán bằng cách chia tổng lượng hấp thu thức ăn cho sự tăng trọng của các con gà sống và chết. Các dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng các mô hình tuyến tính tổng quát của SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Khi tỷ lệ F thể hiện sự có nghĩa, thì giá trị trung bình của các phương án xử lý được cho là tách biệt.

Kết quả, thí nghiệm I

Bảng 12: Các tác dụng của xylanaza, β -glucanaza và các vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Bacillus* đối với hiệu suất tăng trưởng của gà giò non.

	Sự tăng trọng lượng cơ thể (g)	Lượng hấp thu thức ăn (g)	Chuyển hóa thức ăn (g/g)
1	652,5 ^d	980,8	1,498 ^a
2	670,6 ^{bc}	982,3	1,465 ^{bc}
3	673,6 ^{abc}	978,3	1,452 ^{cde}
4	681,7 ^{ab}	982,3	1,441 ^{def}
5	688,2 ^a	977,2	1,420 ^f
6	665,7 ^{cd}	985,4	1,477 ^{ab}
7	671,2 ^{bc}	982,4	1,464 ^{bcd}
8	677,0 ^{abc}	979,0	1,446 ^{cde}
9	684,5 ^{ab}	981,5	1,430 ^{ef}
Sai số chuẩn	6,4	11,5	0,009

N.B. Các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,10$) giữa các giá trị trong cột đó

Các nhóm đã được xử lý được cho ăn tổ hợp toàn phần: xylanaza + β -glucanaza + DFM *Bacillus* tổ hợp có BWG (g/gà/ngày) cao hơn và FCR (g BW tăng / g thức ăn hấp thu) thấp hơn so với đối chứng, hoặc các chất phụ gia này được cho ăn theo cách riêng lẻ hoặc trong tổ hợp theo hai cách (bảng 12). Điều này cũng xảy ra khi cả xylanaza 1 và xylanaza 2 được dùng.

Thí nghiệm II

Nguyên liệu và phương pháp

Việc sử dụng các động vật và quy trình thí nghiệm được phê chuẩn bởi Ủy ban Thí nghiệm động vật cấp cơ sở. Khẩu phần ăn dựa trên cơ sở ngô/đậu tương được phối chế để cân bằng về năng lượng và các dưỡng chất cho gà giò non (từ 0 đến 21 ngày tuổi) (bảng 9, khẩu phần ăn I). Không có chất kháng sinh hoặc thuốc kháng cầu trùng tổng hợp nào được bao gồm, và khẩu phần ăn này được cung cấp dưới dạng cám trộn. Khẩu phần ăn cơ bản này được chia thành các phần và các enzym và các DFM tương ứng được thêm vào để tạo thành các khẩu phần ăn thí nghiệm được mô tả trong bảng 13.

Bảng 13: Mô tả các phương án xử lý cho thí nghiệm II

ID	Mô tả
1	Đối chứng âm, không có chất phụ gia (NC)
2	NC +Xylanaza 1 (2500 XU/kg)
3	NC +Xylanaza 1 (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg)
4	NC +Xylanaza 1 (2500 XU/kg) + DFM <i>Enterococcus</i>
5	NC + Xylanaza 1 (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg) + DFM <i>Enterococcus</i>
6	NC +Xylanaza 2 (2500 XU/kg)
7	NC +Xylanaza 2 (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg)
8	NC +Xylanaza 2 (2500 XU/kg) + DFM <i>Enterococcus</i>
9	NC +Xylanaza 2 (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg) + DFM <i>Enterococcus</i>

^aCác enzym (xylanaza (Danisco Xylanase endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) và β -glucanaza (Aextra ® XB)) là các sản phẩm thương mại được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition

^bDFM dựa trên cơ sở *Enterococcus* (*Enterococcus faecium* ID7 (được gọi là *Lactococcus lactis* ID7 trong Patent Mỹ đã được cấp bằng số 7,384,628 và được nộp lưu tại Cơ quan lưu trữ ATCC với số hiệu PTA-6103 và sau đó được phân loại lại là *Enterococcus faecium* ID7)),

^cFveXyn4 xylanaza (endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) được thể hiện là SEQ ID No. 3 trong bản mô tả này (còn được mô tả trong PCT/CN2012/079650, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), Danisco Animal Nutrition

Tất cả các phần bổ sung được cung cấp trong hỗn hợp trộn sẵn mà được đưa vào thiết bị trộn trong quá trình chuẩn bị khẩu phần ăn. Các khẩu phần ăn chứa DFM được trộn trước và thiết bị trộn được gội rửa giữa mỗi khẩu phần ăn để ngăn ngừa sự nhiễm tạp chéo. Các mẫu được thu lại từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý ở thời điểm lúc đầu, giữa, và cuối của mỗi mẻ và được hòa trộn với nhau để xác nhận các hoạt tính enzym và sự có mặt của DFM trong thức ăn trước khi bắt đầu thử nghiệm ở động vật. Các mẫu bổ sung từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý được giữ lại và được lưu giữ đến khi cần ở $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ để phân tích. Các con gà giò đực (Hubbard-Cobb) được nhận ở độ tuổi là 72 giờ hoặc nhỏ hơn từ một trại giống thương mại. Vào ngày 0, các con gà con này được cân từng cá thể riêng lẻ và được phân bổ vào 72 lồng (8 con mỗi lồng) sao cho trọng lượng trung bình của gà ở mỗi lồng là tương tự nhau. 9 phương án xử lý khẩu phần ăn (bảng 13) sau đó được phân ngẫu nhiên vào 8 lồng đối với mỗi phương án. Các lồng này được đặt trong các phòng được kiểm soát về môi trường. Nhiệt độ được duy trì ở 31°C trong tuần đầu tiên và sau đó được giảm từ từ xuống 22°C vào cuối tuần thứ ba. Các con gà này được chiếu huỳnh quang trong 20 giờ và được để cho tự do tiếp cận các khẩu phần ăn và nước trong thời gian nghiên cứu. Trọng lượng cơ thể được ghi lại vào lúc đầu và cuối của hồi kỳ thí nghiệm dài 21 ngày. Tỷ lệ tử vong được ghi lại hằng ngày. Các dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng quy trình GLM của SAS.

Kết quả, thí nghiệm II

Bảng 14: Các tác dụng của xylanaza, β -glucanaza và các vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Enterococcus* đối với hiệu suất tăng trưởng của gà giò non.

	Sự tăng trọng lượng cơ thể (g)
1	652,5 ^c
2	670,6 ^{ab}
3	673,6 ^{ab}
4	677,7 ^{ab}
5	684,4 ^a
6	665,7 ^{bc}
7	671,2 ^{ab}
8	673,7 ^{ab}
9	682,4 ^a
Sai số chuẩn	6,5

N.B. Các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,10$) giữa các giá trị trong cột đó

Có sự cải thiện về số lượng về sự tăng trọng lượng cơ thể gà giò, khi tổ hợp của xylanaza + β -glucanaza + DFM *Enterococcus* được bổ sung, ở phía trên xylanaza + β -glucanaza hoặc xylanaza + DFM *Enterococcus* (bảng 14).

III. Sản xuất axit béo dễ bay hơi trong manh tràng

Nguyên liệu và phương pháp

Khẩu phần ăn cơ bản dựa trên cơ sở ngô-bột đậu tương-bột cải dầu được phối chế để cân bằng về năng lượng và các dưỡng chất cho gà giò non (bảng 9, khẩu phần ăn II). Không có chất kháng sinh hoặc thuốc kháng khuẩn tổng hợp nào được bao gồm trong khẩu phần ăn cơ bản này. Khẩu phần ăn cơ bản này được chia thành các phần và các enzym và các DFM tương ứng được thêm vào để tạo thành các khẩu phần ăn thí nghiệm được mô tả trong bảng 15. Các quy trình tiếp theo là tương tự với các quy trình được mô tả ví dụ 1, phần III theo sau. Kỹ thuật phân tích sắc ký các axit béo dễ bay hơi từ các mẫu mô phỏng (xem ví dụ 1, phần III) được thực hiện với axit pivalic làm chất nội chuẩn theo nội dung tương tự như được mô tả trước đó (Ouweland et al. 2009; *The British Journal of Nutrition* 101: 367-375, phần mô tả của sản phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Nồng độ của axit axetic, propionic, butyric, isobutyric, valeric, isovaleric, và 2-methylbutyric được xác định.

Bảng 15: Mô tả các phương án xử lý

ID	Mô tả
1	Đối chứng
2	Xylanaza (2500 XU/kg)
3	Xylanaza (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg)
4	Xylanaza (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg) + DFM)7,5e+04) ¹

¹Vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở ba chủng *Bacillus* (các tỷ lệ bằng nhau của các chủng AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) và AGTP BS1013 (NRRL B-50509)), được chọn lọc dựa trên khả năng của chúng trong việc tiết các enzym được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition.

Các enzym (xylanaza (Danisco Xylanase endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) và β -glucanaza (Aextra® XB)) là các sản phẩm thương mại được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition

Kết quả

Bảng 16: Các tác dụng của xylanaza, β -glucanaza và vi sinh vật được nuôi trực tiếp đối với sự sản xuất axit axetic và axit butyric và tổng axit béo dễ bay hơi (VFA) trong manh tràng gà

	Nồng độ, $\mu\text{mol/ml}$		
	Axetic	Butyric	VFA
1	61,36b	6,06c	68,59b
2	112,6ab	33,0b	148,3ab
3	133,6ab	43,5ab	181,3ab
4	164,6a	59,0a	227,2a
Sai số chuẩn gộp lại	27,40	5,26	35,99

N.B. Các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,10$) giữa các giá trị trong cột đó

Tổ hợp của xylanaza + β -glucanaza + các vi sinh vật được nuôi trực tiếp làm tăng sự sản xuất axit axetic, axit butyric và axit béo dễ bay hơi (VFA) trong manh tràng so với DFM riêng lẻ, các enzym riêng lẻ hoặc các tổ hợp enzym riêng lẻ (bảng

16). Các axit béo dễ bay hơi có thể cung cấp lượng năng lượng đáng kể cho gà. Axit butyric còn được biết là cải thiện sức khỏe của ống tiêu hóa và làm giảm tỷ lệ mắc phải bệnh ung thư ruột kết ở người (Brons et al., 2002, *Trends Food Science and Technology* 13:251-261, ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Ví dụ 3: Tác dụng của xylanaza và các enzym phân giải chất xơ khác (β -glucanaza hoặc hỗn hợp enzym phân giải chất xơ (hỗn hợp FDE)) và DFM (vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Bacillus*) khi được cho ăn theo cách riêng lẻ hoặc trong tổ hợp đối với hiệu suất tăng trưởng và khả năng tiêu hóa đường chất ở lợn (từ 25 đến 60kg) được cho ăn các khẩu phần ăn dựa trên cơ sở các hạt hỗn hợp

Nguyên liệu và phương pháp

Việc sử dụng các động vật và quy trình thí nghiệm được phê chuẩn bởi Ủy ban Thí nghiệm động vật. Khẩu phần ăn cơ bản, như được cho ăn, được phối chế để cân bằng về năng lượng và protein, và để phù hợp với các yêu cầu đối với lợn đang tăng trưởng thuộc lứa tuổi và kiểu gen này (bảng 17). Các thành phần chính của chế phẩm (loại và lượng được bao gồm) trong khẩu phần ăn cơ bản này có thể thay đổi như được thể hiện trong bảng 17, với điều kiện là khẩu phần ăn này được phối chế để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của các con lợn được cho ăn. Chất đánh dấu khả năng tiêu hóa phổ biến (titan dioxit, crom (III) oxit hoặc xelit) được bao gồm với lượng là 3 g/kg để cho phép xác định khả năng tiêu hóa của các thành phần trong khẩu phần ăn. Không có chất kháng sinh hoặc thuốc kháng cầu trùng tổng hợp nào được bao gồm, và khẩu phần ăn này được cung cấp dưới dạng cám trộn. Khẩu phần ăn cơ bản này được chia thành các phần mà sau đó được xử lý bằng các enzym và các DFM được mô tả trong bảng 18. Trong quá trình trộn thức ăn, thiết bị trộn được gội rửa để ngăn ngừa sự nhiễm tạp chéo của khẩu phần ăn. Các mẫu được thu lại từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý ở thời điểm lúc đầu, giữa, và cuối của mỗi mẻ và được hòa trộn với nhau để xác nhận các hoạt tính enzym và sự có mặt của DFM trong thức ăn. Các mẫu từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý được giữ lại trong quá trình trộn và được lưu giữ ở -20°C đến khi cần.

Bảng 17: Các ví dụ về thành phần của khẩu phần ăn cơ bản cho lợn có trọng lượng cơ thể nằm trong khoảng từ 20 đến 60 kg (%), như được cho ăn)

	Khẩu phần ăn I	Khẩu phần ăn II
Ngô	45,4	9,50
Lúa mì	-	25,0
Lúa mạch	-	25,0
DDGS ngô	25,0	10,0
Bột mầm ngô	15,0	-
Mì tấm/cám gạo	-	7,00
Bột đậu tương	10,0	10,0
Bột cải Canola	-	9,00
Chất béo	0,56	1,23
Rỉ đường	-	-
L-Lysin HCl	0,59	0,47
DL-methionin	0,02	0,02
L-threonin	0,13	0,09
L-tryptophan	-	0,01
Muối	0,46	0,54
Đá vôi	1,16	0,63
Dicanxi Phosphat	0,39	1,12
Hỗn hợp trộn sẵn của vitamin và khoáng chất	1,00	0,10
Chất đánh dấu khả năng tiêu hóa, chất đánh dấu trợ	0,30	0,30
Protein thô, %	19,1	18,3
Năng lượng có thể tiêu hóa được, MJ/kg	13,8	13,6
Lysin có thể tiêu hóa được, %	1,03	0,98
Canxi, %	0,66	0,66
Phospho có thể tiêu hóa được, %	0,31	0,31

Bảng 18: Mô tả các khẩu phần ăn thí nghiệm

Phương án xử lý	Mô tả
1	Đối chứng, cơ bản (NC)
2	NC + xylanaza
3	NC + xylanaza + β -Glucanaza
4	NC + xylanaza + hỗn hợp FDE ¹
5	NC + xylanaza + DFM <i>Bacillus</i> ²
6	NC + xylanaza + hỗn hợp FDE + DFM <i>Bacillus</i> ²
7	NC + xylanaza + β -Glucanaza + DFM <i>Bacillus</i> ²

¹ hỗn hợp FDE: Tổ hợp của hoạt tính enzym phân giải chất xơ bao gồm các enzym beta-glucanaza, beta-glucosidaza, beta-xylosidaza và/hoặc alpha-arabinofuranosidaza

² DFM *Bacillus* được chọn làm chủng sản xuất enzym.

Thí nghiệm này được thiết kế và được thực hiện tương ứng với pha tăng trưởng (≤ 25 đến ~ 60 kg trọng lượng cơ thể). Các khẩu phần ăn thí nghiệm được cho ăn trong 42 ngày trong 6 tuần. Nhóm lợn đực và lợn cái gần với trọng lượng cơ thể ban đầu mục tiêu được mua từ cùng một bầy (cùng di truyền). Sau khi đến nơi, các con lợn được cân và được phân bổ vào các phương án xử lý khẩu phần ăn bằng cách sử dụng thiết kế thí nghiệm đã được công nhận sao cho mỗi phương án xử lý có tối thiểu là 8 chuồng lặp lại. Trọng lượng cơ thể và lượng hấp thu thức ăn được theo dõi hằng tuần để tính toán hiệu quả chuyển hóa thức ăn theo hiệu quả tăng trọng được hiệu chỉnh về tỷ lệ tử vong. Các mẫu phân tươi đại diện (mẫu Grab) được thu lại vào tuần 3 và 6 để cho phép tính toán khả năng tiêu hóa thành phần trong khẩu phần ăn.

Lợn thí nghiệm đang tăng trưởng (trọng lượng cơ thể ban đầu là 30 kg) được trang bị một ống thông chữ T ở ruột hồi đoạn cuối cho mục đích của thí nghiệm này. Các con lợn được đặt trong các chuồng riêng biệt ($1,2 \times 1,5$ m) trong phòng được kiểm soát về môi trường. Mỗi chuồng được trang bị máng ăn và máng nước có núm và có sàn lát bê tông hoàn toàn. Thí nghiệm này được thiết kế và được thực hiện để có được ít nhất là 6 lần lặp lại cho mỗi phương án xử lý. Tất cả các con lợn đều được cho ăn ở mức gấp ba lần nhu cầu năng lượng duy trì của chúng (106 kcal ME cho mỗi $\text{kg}^{0,75}$; NRC, 1998), và được cung cấp hai phần bằng nhau lúc 0800 và 1700 giờ. Các con lợn được để cho tự do tiếp cận nước thông qua một máng uống dạng bát. Trọng lượng của lợn

được ghi lại ở thời điểm ban đầu và ở thời điểm cuối của mỗi thời kỳ và lượng thức ăn được cung cấp mỗi ngày được ghi lại. Thời kỳ thí nghiệm kéo dài 15 ngày. 10 ngày đầu của mỗi thời kỳ được xem là thời kỳ thích nghi với khẩu phần ăn. Các mẫu phân tươi đại diện (mẫu Grab) được thu lại vào ngày 11 đến ngày 13 và sản phẩm tiêu hóa trong ruột hồi được thu lại trong 8 tiếng vào ngày 14 và 15 bằng cách sử dụng các phương pháp tiến hành tiêu chuẩn. Để thu sản phẩm tiêu hóa trong ruột hồi, túi nhựa được gắn vào nòng ống thông và sản phẩm tiêu hóa chảy vào trong túi sẽ được thu lại. Các túi được lấy ra khi các túi này chứa đầy sản phẩm tiêu hóa - hoặc ít nhất là 30 phút một lần và được làm đông lạnh ngay lập tức ở -20°C .

Các mẫu phân và ruột hồi được làm tan băng, được trộn với nhau giữa các con lợn và các khẩu phần ăn, và một mẫu con được thu lại để phân tích hóa học. Mẫu khẩu phần ăn cơ bản cũng được thu lại và được phân tích. Các mẫu sản phẩm tiêu hóa được làm đông khô và được nghiền mịn trước khi phân tích hóa học. Các mẫu phân được làm khô trong lò và được nghiền mịn để phân tích. Tất cả các mẫu đều được phân tích về vật chất khô, chất đánh dấu khả năng tiêu hóa, năng lượng toàn phần, protein thô, chất béo và xơ không tan trong chất rửa trung tính theo các quy trình tiêu chuẩn (AOAC, 2005).

Các giá trị về khả năng tiêu hóa tổng và khả năng tiêu hóa biểu kiến trong ruột hồi đối với năng lượng và các dưỡng chất được tính toán như được mô tả trước đó (Stein et al., 2007. J. Anim. Sci. 85:172-180). Chuồng là đơn vị thí nghiệm. Các dữ liệu được đưa vào quy trình MIXED của SAS.

Kết quả

Các nhóm đã được xử lý được cho ăn tổ hợp toàn phần: xylanaza cộng với enzym phân giải chất xơ thứ cấp (β -glucanaza hoặc hỗn hợp FDE) và DFM (vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Bacillus*), có BWG cao hơn, và/hoặc FCR (g BW tăng / g thức ăn hấp thu) thấp hơn và/hoặc khả năng tiêu hóa các dưỡng chất và/hoặc năng lượng và/hoặc vật chất khô và/hoặc chất xơ cao.

Ví dụ 4: Các tác dụng của xylanaza, β -glucanaza và chủng sản xuất axit propionic của các vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở vi khuẩn đối với khả năng tiêu hóa/sự tích trữ các dưỡng chất và khả năng chuyển hóa năng lượng ở gà giò non.

Thành phần của các khẩu phần ăn thí nghiệm dựa trên cơ sở lúa mì được sử dụng trong ví dụ 4

Bảng 19: Thành phần của khẩu phần ăn cơ bản dựa trên cơ sở lúa mì cho gà giò (% , như được cho ăn)

Thành phần	%
Lúa mì	43,9
Mì tấm	2,83
Lúa mạch	10,0
Lúa mạch đen	5,00
Bột đậu tương	29,3
Chất béo	4,25
L-Lysin HCl	0,32
DL-Methionin	0,24
L-Threonin	0,10
Natri Bicacbonat	0,20
Muối	0,23
Đá vôi	1,32
Monocanxi Phosphat	1,00
Hỗn hợp trộn sẵn của các vitamin/khoáng chất vết	1,00
Titan dioxit	0,30
Lượng cung cấp tính được	
Protein thô, %	21,8
Năng lượng có thể chuyển hóa được, MJ/kg	11,60
Canxi, %	0,88
Phospho khả dụng, %	0,38
Lysin có thể tiêu hóa được, %	1,15
Methionin có thể tiêu hóa được %	0,51

Nguyên liệu và phương pháp

Việc sử dụng các động vật và quy trình thí nghiệm được phê chuẩn bởi Ủy ban Thí nghiệm động vật cấp cơ sở. Khẩu phần ăn dựa trên cơ sở lúa mì-lúa mạch được phối chế để cân bằng về năng lượng và các dưỡng chất cho gà giò non (từ 0 đến 21 ngày tuổi) (bảng 19). Titan dioxit được bao gồm với lượng là 0,30% để cho phép xác định sự tích trữ thành phần trong khẩu phần ăn. Không có chất kháng sinh hoặc thuốc kháng cầu trùng tổng hợp nào được bao gồm, và khẩu phần ăn này được cung cấp dưới dạng cám trộn. Khẩu phần ăn cơ bản này được chia thành các phần và các enzym và các DFM tương ứng được thêm vào để tạo thành các khẩu phần ăn thí nghiệm được mô tả trong bảng 20. Mỗi phần bổ sung được trộn trước và thiết bị trộn được giới rửa để ngăn ngừa sự nhiễm tạp chéo của các khẩu phần ăn đã được xử lý. Các mẫu được thu lại từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý ở thời điểm lúc đầu, giữa, và cuối của mỗi mẻ và được hòa trộn với nhau để xác nhận các hoạt tính enzym và sự có mặt của DFM trong thức ăn trước khi bắt đầu thử nghiệm ở động vật. Các mẫu bổ sung từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý được giữ lại và được lưu giữ đến khi cần ở $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ để phân tích.

Bảng 20: Mô tả các phương án xử lý

ID	Mô tả
1	Đối chứng, không có chất phụ gia
2	NC + Xylanaza (2500 XU/kg)
3	NC + Xylanaza (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg)
4	NC + Xylanaza (2500 XU/kg) + β -glucanaza (200 BGU/kg) + DFM ¹ ($7,5 \cdot 10^4$)

¹Các vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở các chủng sản xuất axit propionic (*Propionibacterium acidipropionici* P169 PTA-5271, Omni-Bos® P169).

Các enzym (xylanaza (Danisco Xylanase endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) và β -glucanaza (Aextra® XB)) là các sản phẩm thương mại được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition.

Nghiên cứu này liên quan đến thử nghiệm trong lồng, được thực hiện để thu được các mẫu chất bài tiết để đo khả năng tiêu hóa các dưỡng chất và năng lượng. Các con gà giò được ở độ tuổi là 72 giờ hoặc nhỏ hơn (Ross 308) được nhận từ một trại giống thương mại. Sau khi đến nơi, các con gà con này được cân từng cá thể riêng lẻ và được phân lớp theo trọng lượng cơ thể và được phân bổ vào 30 lồng (năm con mỗi

lồng) sao cho trọng lượng trung bình của gà ở mỗi lồng là tương tự nhau. Sau đó, bốn phương án xử lý khẩu phần ăn được phân ngẫu nhiên vào sáu lồng lặp lại. Thử nghiệm này được tiến hành từ ngày 0 đến 21, trong khoảng thời gian đó các con gà được tự do tiếp cận các phương án xử lý khẩu phần ăn đã được phân cho chúng và nước. Nhiệt độ lò áp và nhiệt độ trong phòng được thiết đặt ở 32 và 29°C, một cách tương ứng, trong suốt tuần đầu tiên. Sau đó, nguồn cung cấp nhiệt trong lò áp được tắt đi và nhiệt độ trong phòng được duy trì ở 29°C trong suốt thí nghiệm. Ánh sáng được cung cấp trong 24 giờ trong suốt thí nghiệm. Vào các ngày 17, 18, 19 và 20, các mẫu chất bài tiết được thu lại và được lưu giữ đông lạnh ở -20°C để xác định khả năng tiêu hóa/sự tích trữ các dưỡng chất và năng lượng. Thực hiện cẩn thận trong quá trình thu các mẫu chất bài tiết để tránh nhiễm tạp từ lông và các vật liệu lạ khác. Các mẫu chất bài tiết được gộp lại trong mỗi lồng được trộn kỹ bằng thiết bị hòa trộn và hai mẫu đại diện mỗi lồng được lấy ra. Các mẫu được làm khô lạnh. Các mẫu đã được làm khô được nghiền để đi qua được rây loại 0,5 mm và được lưu giữ trong các hộp nhựa kín khí ở -4°C đến khi phân tích hóa học. Các mẫu khẩu phần ăn và chất bài tiết được phân tích về vật chất khô, protein thô (dưới dạng nitơ), năng lượng toàn phần, chất béo (dưới dạng các sản phẩm chiết bằng hexan) và xơ không tan trong chất rửa trung tính các phương pháp phân tích AOAC chính thức). Titan (chất đánh dấu khả năng tiêu hóa) được phân tích theo các quy trình được mô tả bởi ấn phẩm Lomer et al. (2000, Analyst 125:2339–2343), ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Khả năng tiêu hóa/sự tích trữ được tính toán bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn (Adeola, O. 2001. Digestion and balance techniques in pigs. Các trang 903–916 trong Swine Nutrition, 2nd ed. A. J. Lewis, and L. L. Southern, ed. CRC Press, Washington, DC, ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Các dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng quy trình mô hình tuyến tính tổng quát của SAS (2004).

Kết quả

Bảng 21: Các tác dụng của xylanaza, enzym phân giải chất xơ và chủng sản xuất axit propionic của các vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở vi khuẩn đối với khả năng tiêu hóa/sự tích trữ các dưỡng chất và khả năng chuyển hóa năng lượng ở gà giò non.

	Khả năng tiêu hóa/sự tích trữ biểu kiến, %	ME, kcal/kg
--	--	-------------

Phương án xử lý	Vật chất khô	Chất béo	
1	67,4d	78,3c	2875c
2	71,2b	81,5b	3033b
3	70,9c	82,9b	3040b
4	72,7a	86,1a	3160a
Sai số chuẩn	0,06	0,89	15,1

N.B. Các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,10$) giữa các giá trị trong cột đó

Tổ hợp của xylanaza, β -glucanaza và vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở *Bacillus* cải thiện việc sử dụng năng lượng trong khẩu phần ăn so với đối chứng hoặc xylanaza riêng lẻ hoặc tổ hợp của xylanaza và β -glucanaza (bảng 20). Điều này có thể có liên quan đến sự tăng cường tích trữ các dưỡng chất sinh năng lượng trong vật chất khô như chất béo (bảng 20). Sự tích trữ chất béo được tăng cường nhờ các tổ hợp theo ba cách là đáng chú ý và có thể có liên quan đến sự tăng cường tiêu hóa và hấp thụ chất béo trong khẩu phần ăn và cả sự sản xuất và hấp thụ các axit béo chuỗi ngắn từ quá trình lên men. Các lợi ích được quan sát thấy của tổ hợp theo ba cách của xylanaza, β -glucanaza, DFM sản xuất axit propionic/*Bacillus* tốt hơn về mặt sử dụng các dưỡng chất và năng lượng cũng có thể được suy đoán là có liên quan đến sự cải thiện chức năng và sức khỏe của ruột thông qua sự điều biến khu hệ vi sinh vật tích cực và chức năng hấp thụ/tiêu hóa của ruột.

Ví dụ 5: Đáp ứng của gà giò khi được cho ăn các khẩu phần ăn dựa trên cơ sở ngô chứa xylanaza, các enzym phân giải chất xơ khác và các vi sinh vật được nuôi trực tiếp sản xuất axit propionic

Thành phần của các khẩu phần ăn thí nghiệm được sử dụng trong ví dụ 5

Bảng 22: Thành phần của khẩu phần ăn cơ bản dựa trên cơ sở ngô cho gà giò (%), như được cho ăn)

	Chế phẩm (%)
Ngô	54,7
DDGS ngô	11,0
Bột đậu tương	28,9

Chất béo	1,00
L-Lysin HCl	0,43
DL-Methionin	0,27
L-Threonin	0,11
Natri Bicacbonat	0,20
Muối	0,22
Đá vôi	1,53
Monocanxi phosphat	0,56
Hỗn hợp trộn sẵn của vitamin/khoáng chất	1,00
Lượng cung cấp tính được	
Protein thô, %	21,1
Năng lượng có thể chuyển hóa được, MJ/kg	11,5
Canxi	0,89
Phospho có thể tiêu hóa được, %	0,28
Lysin có thể tiêu hóa được, %	1,15
Methionin có thể tiêu hóa được, %	0,55

Nguyên liệu và phương pháp

Việc sử dụng các động vật và quy trình thí nghiệm được phê chuẩn bởi Ủy ban Thí nghiệm động vật cấp cơ sở. Khẩu phần ăn dựa trên cơ sở ngô được phối chế để cân bằng về năng lượng và các dưỡng chất cho gà giò non (từ 0 đến 21 ngày tuổi) (bảng 22). Không có chất kháng sinh hoặc thuốc kháng cầu trùng tổng hợp nào được bao gồm, và khẩu phần ăn này được cung cấp dưới dạng cám trộn. Khẩu phần ăn cơ bản này được chia thành các phần và các enzym và các DFM tương ứng được thêm vào để tạo thành các khẩu phần ăn thí nghiệm được mô tả trong bảng 23. Mỗi phần bổ sung được trộn trước và thiết bị trộn được giới rửa để ngăn ngừa sự nhiễm tạp chéo của các khẩu phần ăn đã được xử lý. Các mẫu được thu lại từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý ở thời điểm lúc đầu, giữa, và cuối của mỗi mẻ và được hòa trộn với nhau để xác nhận các hoạt tính enzym và sự có mặt của DFM trong thức ăn trước khi bắt đầu thử

nghiệm ở động vật. Các mẫu bổ sung từ mỗi khẩu phần ăn được xử lý được giữ lại và được lưu giữ đến khi cần ở $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ để phân tích.

Bảng 23: Mô tả các phương án xử lý

ID	Mô tả
1	Đối chứng
2	Xylanaza (2500 XU/kg) ¹
3	Hỗn hợp xylanaza + FDE ²
4	Hỗn hợp xylanaza (2500 XU/kg)+ FDE + DFM ³ (7,5 10 ⁰⁴)

¹Danisco Xylanase, Danisco Animal Nutrition

² ACCELLERASE® TRIO™ phức hợp enzym chứa tổ hợp có hiệu lực của các hoạt tính enzym bao gồm các β -glucanaza (200 CMC U/kg), các xylanaza (ví dụ, các endoxylanaza, endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) (>1200 ABX U/kg), và các β -glucosidaza (>800 pNPG U/kg) (DuPont Industrial Biosciences).

³Các vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở các chủng sản xuất axit propionic (*Propionibacterium acidipropionici* P169 PTA-5271, Omni-Bos® P169)

Các con gà ở độ tuổi là 72 giờ hoặc nhỏ hơn được mua từ một trại giống thương mại và sau khi đến nơi, các con gà này được cân và được gắn thẻ để nhận dạng và được phân bổ vào trong sáu buồng theo trọng lượng cơ thể, và được phân bổ ngẫu nhiên vào 4 phương án xử lý (bảng 23) trong một buồng với mười con gà trong mỗi chuồng theo thiết kế buồng hoàn thiện ngẫu nhiên. Từ ngày 1, các con gà cũng được để cho tự do tiếp cận nước uống sạch. Các con gà này được cân vào các ngày 0 và 21 và trọng lượng của chúng được ghi lại, sự tiêu thụ thức ăn cũng được theo dõi và được ghi lại vào các ngày cân gà. Các con gà này được theo dõi hằng ngày và các thay đổi về ngoại hình hoặc tập tính của chúng được ghi lại. Vào cuối mỗi thời kỳ cho ăn, các thông số như sự tăng trọng, lượng hấp thu thức ăn, tỷ lệ chuyển hóa thức ăn, hiệu suất thức ăn, và tỷ lệ tử vong được xác định. Các dữ liệu được phân tích ở dạng thiết kế buồng hoàn thiện ngẫu nhiên bằng cách sử dụng quy trình GLM của phần mềm SAS (SAS Institute, Inc. 2006).

Kết quả

Bảng 24: Các tác dụng của xylanaza, hỗn hợp của các enzym phân giải chất xơ khác và các vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở propionic đối với hiệu suất tăng trưởng của gà giò non.

	Trọng lượng cơ thể tại thời điểm 21 ngày, g	Sự tăng trọng lượng cơ thể, g	Lượng hấp thu thức ăn, g	Hiệu quả chuyển hóa thức ăn, g/g
1	830,4	783,5	1006,6	1,284a
2	804,2	757,3	964,0	1,273ab
3	817,6	770,7	983,3	1,275ab
4	813,2	766,4	953,9	1,245b
Sai số chuẩn	12,96	11,82	23,37	0,017

N.B. Các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,10$) giữa các giá trị trong cột đó

Các con gà con được cho ăn tổ hợp của xylanaza, hỗn hợp của các enzym phân giải chất xơ khác và DFM dựa trên cơ sở propionic có FCR tốt hơn so với đối chứng và tốt hơn về số lượng so với các con gà con được cho ăn khẩu phần ăn chỉ chứa các enzym (bảng 24).

Ví dụ 6: Các tác dụng của xylanaza và β -glucanaza cùng với hoặc không cùng với vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở các chủng *Bacillus* đối với hiệu suất tăng trưởng, số lượng vi sinh vật và khả năng tiêu hóa dưỡng chất ở lợn thịt

Thành phần của các khẩu phần ăn thí nghiệm được sử dụng trong ví dụ 6

Bảng 25: Thành phần của khẩu phần ăn của thức ăn cho lợn đang tăng trưởng (trọng lượng cơ thể nằm trong khoảng từ 20 đến 60 kg) (%), như được cho ăn)

	Khẩu phần ăn I	Khẩu phần ăn II
Ngô	45,4	42,3
Lúa mì	-	5,00
DDGS ngô	25,0	20
Bột mầm ngô	15,0	-
Mì tấm/cám gạo	-	3,00
Bột đậu tương	10,0	19,8

Bột cải Canola	-	2,00
Chất béo	0,56	2,00
Rỉ đường	-	3,00
L-Lysin HCl	0,59	0,24
DL-methionin	0,02	0,02
L-threonin	0,13	-
Muối	0,46	0,30
Đá vôi	1,16	1,18
Dicaxi Phosphat	0,39	0,45
Hỗn hợp trộn sẵn của vitamin và khoáng chất	1,00	0,30
Chất đánh dấu trợ chất đánh dầu khả năng tiêu hóa	0,30	0,30
Lượng cung cấp tính được		
Protein thô, %	19,1	19,2
Năng lượng có thể tiêu hóa được, MJ/kg	13,8	14,6
Lysin có thể tiêu hóa được, %	1,03	0,91
Canxi, %	0,66	0,72
Phospho có thể tiêu hóa được, %	0,31	0,33

Nguyên liệu và phương pháp

Hai thí nghiệm được thực hiện để đánh giá các tác dụng đối với hiệu suất tăng trưởng, số lượng vi sinh vật trong phân và hiệu quả khả năng tiêu hóa của hỗn hợp hòa trộn enzym xylanaza và β -glucanaza được cho ăn cùng với hoặc không cùng với vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở các chủng *Bacillus* ở lợn thịt. Ủy ban Sử dụng và Chăm sóc động vật cấp cơ sở đã phê chuẩn việc sử dụng lợn và các hướng dẫn chăm sóc bảo vệ có liên quan cho quốc gia được sử dụng. Tổng số 42 con lợn ([♀ Yorkshire x Landrace] x ♂ Duroc) được đặt trong các nhóm hai con được sử dụng trong thí nghiệm 1 và 72 con lợn thuộc cùng một giống được đặt trong các nhóm ba

con được sử dụng trong thí nghiệm 2. Mỗi chuồng đều có các thành nhựa trơn trong suốt và nền bằng tấm kim loại mở rộng được phủ nhựa ở trong một phòng được kiểm soát về nhiệt độ ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Các khẩu phần ăn cơ bản tương ứng được phối chế để đáp ứng các khuyến nghị về dưỡng chất của NRC cho lợn (NRC, 1998, Bảng 25, khẩu phần ăn I dùng cho thí nghiệm 1 và khẩu phần ăn II dùng cho thí nghiệm 2). Trong mỗi thí nghiệm, một mẻ khẩu phần ăn cơ bản được sản xuất và được chia thành hai phần và mỗi phần sau đó được trộn với các chất phụ gia được mô tả trong bảng 26.

Bảng 26: Mô tả các phương án xử lý

ID	Mô tả
1	Đối chứng
2	Xylanaza (4000 XU/kg) + β -glucanaza (360 BGU/kg)
3	Xylanaza(4000U/kg) + β -glucanaza(360 U/kg) + DFM ¹ (3,0 10 ⁰⁸)

¹vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở ba chủng *Bacillus* (các tỷ lệ bằng nhau của các chủng AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) và AGTP BS1013 (NRRL B-50509)), được chọn lọc dựa trên khả năng của chúng trong việc tiết các enzym được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition.

Các enzym (xylanaza (Danisco Xylanase endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) và β -glucanaza (Aextra® XB)) là các sản phẩm thương mại được cung cấp bởi Danisco Animal Nutrition

Các phương án xử lý được mô tả trong bảng 26 được phân bổ một cách tương ứng vào 7 và 8 chuồng lặp lại trong thí nghiệm 1 và 2. Sự phân bổ chuồng vào các phương án xử lý được ngẫu nhiên hóa dựa trên cơ sở trọng lượng cơ thể lợn tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm. Trọng lượng cơ thể và lượng hấp thu thức ăn được ghi lại trên cơ sở hằng tuần và được sử dụng để tính toán tỷ lệ chuyển hóa thức ăn. Các con lợn được cung cấp các khẩu phần ăn thí nghiệm trong 42 ngày trong cả hai thí nghiệm. Thức ăn và nước có sẵn tự do tại tất cả các thời điểm trong quá trình thí nghiệm. Trong thí nghiệm 2, các mẫu phân tươi được thu lại vào các ngày 38, 39 và 40 để xác định khả năng tiêu hóa chất xơ, năng lượng và các dưỡng chất cũng như số lượng vi sinh vật trong phân. Một gam mẫu phân hỗn hợp từ mỗi chuồng được pha loãng bằng 9 mL môi trường lỏng pepton 1% (Becton, Dickinson và Co., Franklin Lakes, NJ) và

sau đó được làm đồng nhất. Việc đếm số lượng vi khuẩn có thể sống được trong các mẫu phân sau đó được thực hiện bằng cách ria cấy các dung dịch pha loãng 10 lần theo dãy (trong dung dịch pepton 1%) lên trên các đĩa thạch MacConkey (Difco Laboratories, Detroit, MI) và các đĩa thạch chứa môi trường III cho *Lactobacillus* (Medium 638, DSMZ, Braunschweig, Đức) để phân lập *E. coli* và *Lactobacillus*, một cách tương ứng. Các đĩa thạch chứa môi trường III cho *Lactobacillus* này sau đó được ủ trong 48 giờ ở 39°C trong điều kiện kỵ khí. Các đĩa thạch MacConkey được ủ trong 24 giờ ở 37°C. Các khuẩn lạc *E. coli* và *Lactobacillus* được đếm ngay lập tức sau khi lấy ra từ tủ ủ. Trước khi phân tích hóa học, các mẫu phân này được làm tan băng và được làm khô ở 60°C trong 72 giờ, sau đó các mẫu được nghiền nhỏ đến kích cỡ mà có thể đi qua được sàng loại 1 mm. Tất cả các mẫu thức ăn và phân sau đó được phân tích về vật chất khô, năng lượng toàn phần và xơ không tan trong chất rửa axit theo các quy trình được đưa ra bởi AOAC (các phương pháp phân tích chính thức). Crom (chất đánh dấu khả năng tiêu hóa) được phân tích theo phương pháp được mô tả bởi ấn phẩm Williams et al. 1962, J. Anim. Sci. 59:381–389, ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Khả năng tiêu hóa được tính toán bằng các quy trình tiêu chuẩn (Adeola, O. 2001. Digestion and balance techniques in pigs. Pages 903–916 in Swine Nutrition, 2nd ed. A. J. Lewis, and L. L. Southern, ed. CRC Press, Washington, DC – phần mô tả của ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Các dữ liệu về hiệu suất tăng trưởng (BW, ADFI, ADG và FCR) được đưa vào các quy trình GLM của SAS với các phương án xử lý, thí nghiệm và các tương tác dưới dạng các tác dụng trong mô hình. Phân tích ban đầu cho thấy rằng các tương tác là không quan trọng và vì vậy đã được bỏ đi trong bước phân tích tiếp theo, do đó các hiệu quả chính của phương án xử lý sẽ được trình bày. Các dữ liệu về số lượng vi sinh vật được chuyển đổi thành dạng log và cùng với khả năng tiêu hóa được đưa vào phân tích ANOVA một chiều bằng cách sử dụng các quy trình GLM của SAS.

Kết quả

Bảng 27: Các tác dụng của xylanaza và β -glucanaza cùng với hoặc không cùng với vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở các chủng *Bacillus* đối với hiệu suất tăng trưởng ở lợn thịt

Phương án	Trọng	Trọng lượng	Lượng tăng	Lượng hấp	Hiệu quả
-----------	-------	-------------	------------	-----------	----------

xử lý	lượng cơ thể ban đầu, kg	cơ thể cuối cùng, kg	hằng ngày, g/ngày	thu thức ăn, g/ngày	chuyển hóa thức ăn, g/g
1	17,4	50,6b	719,4b	1411,1a	1,967
2	17,5	51,7ab	743,9ab	1431,3ab	1,942
3	17,4	52,6a	764,1a	1471,5a	1,922
Sai số chuẩn	0,35	0,81	14,00	19,20	0,041

N.B. Các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,10$) giữa các giá trị trong cột đó

Bảng 28: Các tác dụng của xylanaza và β -glucanaza cùng với hoặc không cùng với vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở các chủng *Bacillus* đối với khả năng tiêu hóa vật chất khô, nitơ, chất xơ và năng lượng (%) ở lợn thịt

Phương án xử lý	Vật chất khô	Nitơ	Xơ không tan trong chất rửa axit	Năng lượng
1	80,4b	77,4b	44,2b	79,3b
2	80,8b	77,8b	44,6b	78,6b
3	82,0a	79,4a	56,1a	80,5a
Sai số chuẩn	0,41	0,51	1,65	0,47

N.B. Các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,10$) giữa các giá trị trong cột đó

Tổ hợp của xylanaza, β -glucanaza và vi sinh vật được nuôi trực tiếp chứa *Bacillus* cải thiện hiệu suất tăng trưởng và sự sử dụng các dưỡng chất và năng lượng trong khẩu phần ăn ở lợn đang tăng trưởng so với đối chứng hoặc enzym riêng lẻ (các bảng 27 & 28). Các tổ hợp theo ba cách cũng được thấy là tạo ra sự phân giải chất xơ nhiều hơn và sự tăng sinh của vi khuẩn *Lactobacillus* được thúc đẩy trong ruột (Fig. 1).

Ví dụ 7: Các tác dụng của xylanaza, các enzym phân giải chất xơ khác và các vi sinh vật được nuôi trực tiếp đối với sự sản xuất các axit béo chuỗi ngắn trong ruột sau của lợn

Thành phần của các khẩu phần ăn thí nghiệm được sử dụng trong ví dụ 7

Bảng 29: Thành phần của khẩu phần ăn của thức ăn cho lợn đang tăng trưởng (trọng lượng cơ thể nằm trong khoảng từ 20 đến 60 kg) (% như được cho ăn)

	Khẩu phần ăn I	Khẩu phần ăn II
Ngô	45,7	9,50
Lúa mì	-	25,3
Lúa mạch	-	25,0
DDGS ngô	25,0	10,0
Bột mầm ngô	15,0	-
Mì tấm/cám gạo	-	7,00
Bột đậu tương	10,0	10,0
Bột cải Canola	-	9,00
Chất béo	0,56	1,23
Rỉ đường	-	-
L-Lysin HCl	0,59	0,47
DL-methionin	0,02	0,02
L-threonin	0,13	0,09
L-tryptophan	-	0,01
Muối	0,46	0,54
Đá vôi	1,16	0,63
Dicanxi Phosphat	0,39	1,12
Hỗn hợp trộn sẵn của vitamin và khoáng chất	1,00	0,10
Nồng độ hóa học tính toán được		
Protein thô, %	19,1	18,3
Năng lượng có thể tiêu hóa được, MJ/kg	13,8	13,6
Lysin có thể tiêu hóa được, %	1,03	0,98
Canxi, %	0,66	0,66
Phospho có thể tiêu hóa được, %	0,31	0,31
Xơ không tan trong chất rửa trung tính, %	23,8	21,8
Vật chất khô, %	89,7	90,8

Nguyên liệu và phương pháp

Để thiết lập mô hình thí nghiệm với ruột sau của lợn, các tác giả sáng chế đã làm theo một phương pháp nêu trong ấn phẩm (Boisen and Fernandez 1997, *Animal Feed Science and Technology* 68: 277-286, phần mô tả của ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) để tạo ra chất thải ra từ ruột hồi của lợn *in vitro*. Nói ngắn gọn, 1,35 kg thức ăn cám trộn đầy đủ (dựa trên cơ sở ngô và lúa mì, để biết chi tiết, xem bảng 29) được kết hợp với 3,00 L đệm phosphat (0,1M, độ pH=6) và 1,20 L HCl 0,2M trong một xô loại 3 galon có nắp có thể đậy lại. Độ pH được điều chỉnh đến 2 bằng cách sử dụng HCl hoặc NaOH 10M. Sau đó 120 ml dung dịch Pepsin đã được điều chế trước đó (250 mg Pepsin (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) cho mỗi mL nước) được thêm vào. Xô này được đậy lại và được ủ ở 39°C trong 2 giờ trong điều kiện lắc để mô phỏng sự tiêu hóa của dạ dày. Để mô phỏng sự tiêu hóa ở ruột non, 1,20 L đệm phosphat (0,2M, độ pH=6,8) và 600 mL NaOH 0,6M được thêm vào dung dịch này và độ pH được điều chỉnh đến 6,8 bằng cách sử dụng NaOH hoặc HCl 10M như trước. Sau khi trung hoà, 120 mL dung dịch pancreatin đã được điều chế trước đó (1000 mg Pancreatin (Sigma-Aldrich) cho mỗi mL nước) được thêm vào, xô này được đậy lại và được ủ ở 39°C trong 4 giờ trong điều kiện lắc. Sau khi ủ, chất lỏng được lọc ra bằng cách sử dụng túi bia hai lớp và được gấp đôi một nửa (Jumbo Nylon Coarse, LD Carlson Company, Kent, OH). Huyền phù đặc còn lại được làm đồng nhất và được chia thành các phần có trọng lượng là 128 g, mỗi phần này được cân vào các bình Pyrex loại 250 ml riêng biệt. Các bình này sau đó được lưu giữ ở -20°C. Với vai trò là nguyên liệu cấy cho khu hệ vi sinh vật trong ruột lớn, thành phần trong manh tràng được thu lại từ 12 con lợn đang tăng trưởng. Các thành phần được làm đồng nhất, được trộn với glyxerol 10% và 14 g mẫu phân tích được cân vào các ống nón loại 15 mL. Các ống nón này sau đó được đậy lại và được lưu giữ ở -80°C.

Các thí nghiệm mô phỏng ruột sau của lợn được thực hiện trong các lần chạy lặp lại hai lần, lần chạy có 1 đối chứng và 3 phương án xử lý (bảng 30). Mỗi phương án xử lý được thử nghiệm ba lần. Đối với mỗi thử nghiệm lên men ở ruột sau của lợn *in vitro*, tổng số 24 bình Pyrex chứa chất thải ra từ ruột hồi được mô phỏng và một ống nón loại 15 mL chứa thành phần trong manh tràng được sử dụng. Các bình được làm tan băng qua đêm và 240 mL dung dịch đệm phosphat 0,1M vô trùng (pH 6) chứa muxin 4g/L (Sigma-Aldrich) sẽ được thêm vào mỗi bình, tương tự với các phương

pháp được mô tả trong ấn phẩm (Christensen *et al.* 1999, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 755-762) và Aristoteli and Willcox, 2003, *Infection and immunity* 71: 5565-5575), phần mô tả của các ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Nguyên liệu cấy được làm tan bằng trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng trong khi các bình Pyrex được làm ấm trước ở 39°C trong 30 phút trong bể nước trong điều kiện lắc, sau đó các phương án xử lý trong 1 mL dung dịch pepton 1% và 450 μ L đệm phosphat 0,1M (xem bảng 30) được thêm vào.

Bảng 30: Các phương án xử lý được thử nghiệm về sự lên men trong ruột sau của lợn ở điều kiện *in vitro**

Thí nghiệm	Đối chứng	Phương án xử lý 1	Phương án xử lý 2	Phương án xử lý 3
	Chỉ có khẩu phần ăn cơ bản #	Đối chứng với enzym xylanaza †	Phương án xử lý 1 với enzym phân giải chất xơ ‡	Phương án xử lý 2 + vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM) +
1	CC	NGX	Accel.	P169
2	CC	NGX	Accel.	<i>Bacillus</i>
3	CW	Y5	Accel.	P169
4	CW	Y5	Axtra® XB	<i>Bacillus</i>
5	CW	Y5	Accel.	<i>Bacillus</i>

* các sản phẩm enzym và vi sinh vật được nuôi trực tiếp được bao gồm theo tỷ lệ tương tự với 500 g trên mỗi tấn hệ mét trong toàn bộ thức ăn, mỗi thí nghiệm được thực hiện trong các lần chạy lặp lại hai lần, các phương án xử lý được lặp lại ba lần trong mỗi lần chạy; # Khẩu phần ăn cơ bản là khẩu phần ăn ngô đối chứng (CC) hoặc khẩu phần ăn lúa mì đối chứng (CW), như được mô tả trong bảng 29; † Xylanaza là Y5 (Danisco Xylanase endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) hoặc NGX (FveXyn4 (endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) được thể hiện là SEQ ID No. 3 trong tài liệu này (còn được mô tả trong PCT/CN2012/079650, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), Danisco Animal Nutrition) với hoạt tính được đảm bảo là 4000 XU/kg thức ăn; ‡ Enzym phân giải chất xơ là Accel. (Accelerase Trio, ACCELLERASE® TRIO™ phức hợp enzym chứa tổ hợp của các hoạt tính enzym bao gồm các β -glucanaza (200 CMC U/kg), các xylanaza (ví dụ, các endoxylanaza,

endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) (>1200 ABX U/kg) và hỗn hợp enzym β -glucosidaza (>800 pNPG U/kg) (DuPont Industrial Biosciences) hoặc Axtra® XB β -glucanaza với hoạt tính được đảm bảo là 360 BGU of β -glucanaza/kg thức ăn. ⁺Vi sinh vật được nuôi trực tiếp là dựa trên cơ sở *Bacillus* (các tỷ lệ bằng nhau của các chủng AGTP BS918 NRRL B-50508, AGTP BS1013 NRRL B-50509 và AGTP BS3BP5 NRRL B-50510) với hoạt tính được đảm bảo là $3,0 \times 10^8$ cfu trên g sản phẩm, hoặc *Propionibacterium acidipropionici* P169 PTA-5271 Omni-Bos® P169 với hoạt tính được đảm bảo là $2,1 \times 10^9$ cfu trên g sản phẩm.

Các bình được gội rửa bằng khí CO₂ trong 30 giây trong khi 250 μ L nguyên liệu cấy trong manh tràng được thêm vào (dựa vào ấn phẩm Coles *et al.* 2005, *Animal Feed Science and Technology* 123: 421-444, phần mô tả của ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) và 10 mL mẫu nền được thu lại, độ pH của nền được xác định và mẫu được lưu giữ ở -20°C. Các bình được đóng nắp, được trộn nhẹ và được đặt vào trong bể nước trong điều kiện lắc ở 39°C và 160 vòng/phút. Sau 12 giờ, 10 mL mẫu khác được thu lại, độ pH được xác định và mẫu được lưu giữ ở -20°C. Để định lượng axit béo dễ bay hơi (VFA) bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), các mẫu được làm tan băng và được ly tâm với tốc độ 16,1 rad trong 20 phút, và dịch nổi bề mặt được lọc qua màng este xenluloza hỗn hợp loại 0,22 μ m (Millex-GS, EMD Millipore Corp., Billerica, MA). 20 μ L dịch lọc được tiêm vào trong mô đun Waters Alliance 2695 Separations (Waters Corp., Milford, MA) có trang bị cột bảo vệ Shodex SH-G (Waters) và cột 300 X 7,8 mm Aminex HPX-87H (Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Phương pháp đẳng dung ly (isocratic) được áp dụng với pha động bao gồm axit phosphoric 16,8 mM trong nước/axetonitril (98:2, thể tích/thể tích) với lưu lượng là 0,525 mL/phút và nhiệt độ cột là 35°C. Các axit béo dễ bay hơi được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị phát hiện mảng diot quang (PDA) Waters 2996 (Waters) tại bước sóng hấp thụ là 211 nm. Việc điều khiển thiết bị, việc thu nhận dữ liệu, và việc xử lý dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm Waters Empower 3 (Waters). Các axit béo dễ bay hơi được định lượng bằng cách sử dụng đường chuẩn được tạo ra từ các hoá chất có độ tinh khiết cao ($\geq 99,9\%$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Các dịch pha loãng tuyến tính của các chất chuẩn trong axit phosphoric 16,8 mM trong nước/axetonitril (98:2, thể tích/thể tích) được chuẩn bị với 6 nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 % đến 2,0 %. Nồng độ của axit axetic, axit propionic, axit

butyric, axit iso-butyric, axit valeric, axit iso-valeric (tổng của chúng được thể hiện là tổng VFA) và axit lactic được xác định. Phân tích thống kê cho từng thí nghiệm được thực hiện dưới dạng ANOVA một chiều được giới hạn bởi lần chạy bằng cách sử dụng quy trình GLM của SPSS (phiên bản 17, SPSS Inc., Chicago, IL). Sự có ý nghĩa được khẳng định với $P \leq 0,10$, nghĩa là giá trị trung bình của các phương án xử lý được cho là tách biệt bằng cách sử dụng trắc nghiệm đa đoạn Duncan.

Kết quả

Trong các khẩu phần ăn dựa trên cơ sở lúa mì, sự tăng đáng kể về sự sản xuất tổng VFA và axit lactic sau 12 giờ mô phỏng ruột sau của lợn được quan sát thấy khi xylanaza NGX, hỗn hợp enzym phân giải chất xơ Accelerase Trio và DFM được thêm vào và được so với đối chứng không được bổ sung (bảng 31, thí nghiệm 1 và 2). Việc sử dụng DFM dựa trên cơ sở *Propionibacterium acidipropionici* P169 làm tăng thêm đáng kể lượng propionat và có sự axit hoá lớn hơn đối với thành phần của ruột kết được mô phỏng ở phương án xử lý kết hợp so với đối chứng (bảng 31, thí nghiệm 1). Trong các khẩu phần ăn dựa trên cơ sở ngô, phương án xử lý kết hợp của xylanaza Y5, enzym phân giải chất xơ Accelerase Trio và DFM làm tăng đáng kể hàm lượng butyrat so với đối chứng sau 12 giờ lên men mô phỏng trong ruột sau của lợn, với sự tăng thêm của tổng VFA khi DFM dựa trên cơ sở *Propionibacterium acidipropionici* P169 được sử dụng (bảng 31, thí nghiệm 3 và 5). Việc thay thế hỗn hợp enzym Accelerase Trio bằng Aextra® XB β -glucanaza và việc sử dụng DFM dựa trên cơ sở *Bacillus* trong khẩu phần ăn ngô với Y5 đã làm tăng đáng kể tổng VFA và lactat so với phương án xử lý chỉ có đối chứng (bảng 31, thí nghiệm 4).

Bảng 31: Sự phong phú trung bình của propionat, butyrat, tổng axit béo dễ bay hơi (VFA) và lactat (% như vẫn dùng), cũng như sự khác biệt về độ pH khi so sánh với các mẫu nền sau 12 giờ lên men trong ruột sau của lợn *in vitro*.

Trt #	Phương án xử lý	Propionat	Butyrat	Tổng VFA	Lactat	Δ pH
Thí nghiệm 1						
1	Ngô đối chứng (CC)	0,010 ^b		0,457 ^b	1,193 ^b	2,452 ^c
2	CC + NGX	0,010 ^b		0,501 ^b	1,254 ^a	2,462

					b	bc
3	CC + NGX + Accel.	0,022 ^{ab}	NS	0,624 ^{ab}	1,360 ^{ab}	2,472 ^{ab}
4	CC + NGX + Accel. + P169	0,056 ^a		0,865 ^a	1,595 ^a	2,485 ^a
	SEM	0,008		0,073	0,086	0,005
Thí nghiệm 2						
1	Ngô đối chứng (CC)			0,531 ^b	1,341 ^b	
2	CC + NGX			0,605 ^{ab}	1,433 ^b	
3	CC + NGX + Accel.	NS	NS	0,607 ^{ab}	1,406 ^b	NS
4	CC + NGX + Accel. + <i>Bacillus</i>			0,773 ^a	1,681 ^a	
	SEM			0,049	0,087	
Thí nghiệm 3						
1	Lúa mì đối chứng (CW)		0,145 ^b	0,685 ^b		
2	CW + Y5		0,154 ^{ab}	0,706 ^{ab}		
3	CW + Y5 + Accel.	NS	0,155 ^{ab}	0,713 ^{ab}	NS	NS
4	CW + Y5 + Accel. + P169		0,163 ^a	0,731 ^a		
	SEM		0,006	0,011		
Thí nghiệm 4						
1	Lúa mì đối chứng (CW)			0,7720 ^b	1,970 ^b	
2	CW + Y5			0,8258 ^{ab}	1,993 ^{ab}	
3	CW + Y5 + Axtra® XB	NS	NS	0,7885 ^{ab}	2,014 ^{ab}	NS
4	CW + Y5 + Axtra® XB + <i>Bacillus</i>			0,8600 ^a	2,027 ^a	
	SEM			0,031	0,021	
Thí nghiệm 5						
1	Lúa mì đối chứng (CW)		0,0627 ^b			

2	CW + Y5		0,0930 ab			
3	CW + Y5 + Accel.	NS	0,1242 ab	NS	NS	NS
4	CW + Y5 + Accel. + <i>Bacillus</i>		0,1728 ^a			
	SEM		0,031			

^{a, b} các trị số có chỉ số trên khác nhau trong cột là khác biệt có ý nghĩa với $P \leq 0,10$; NS, không có ý nghĩa; SEM, sai số chuẩn của giá trị trung bình; chi tiết về các phương án xử lý, xem bảng 26

Ví dụ 8 Các tác dụng của xylanaza, các enzym phân giải chất xơ khác và các vi sinh vật được nuôi trực tiếp đối với sự phân giải chất xơ trong ruột sau của lợn

Thành phần của khẩu phần ăn thí nghiệm được sử dụng trong ví dụ 8

Bảng 32: Thành phần của khẩu phần ăn của thức ăn cho lợn đang tăng trưởng (trọng lượng cơ thể nằm trong khoảng từ 20 đến 60 kg) (%), như được cho ăn)

	Khẩu phần ăn
Ngô	9,50
Lúa mì	25,0
Lúa mạch	25,0
DDGS ngô	10,0
Bột mầm ngô	-
Mì tấm	7,00
Bột đậu tương	10,0
Bột cải Canola	9,00
Chất béo	1,23
L-Lysin HCl	0,47
DL-methionin	0,02
L-threonin	0,09
L-tryptophan	0,01
Muối	0,54
Đá vôi	0,63

Dicanxi Phosphat	1,12
Hỗn hợp trộn sẵn của vitamin và khoáng chất	0,10
chất đánh dấu khả năng tiêu hóa, chất đánh dấu trợ	0,30
Nồng độ hóa học tính toán được	
Protein thô, %	18,3
Năng lượng có thể tiêu hóa được, MJ/kg	13,6
Lysin có thể tiêu hóa được, %	0,98
Canxi, %	0,66
Phospho có thể tiêu hóa được, %	0,31
Xơ không tan trong chất rửa trung tính, %	21,8
Vật chất khô, %	90,8

Để chứng tỏ sự biến mất của vật chất khô (DM) và sự phân giải chất xơ, các chất thải ra từ ruột hồi được tạo ra và sự lên men trong ruột sau được thiết lập như được mô tả trong ví dụ 7. Nói ngắn gọn, khẩu phần ăn dựa trên cơ sở lúa mì (CW, xem bảng 32) được sử dụng làm đối chứng và không có bất kỳ phương án xử lý nào, cũng như CW có bổ sung xylanaza Y5 (phương án xử lý 1), CW với Y5 và hỗn hợp enzyme phân giải chất xơ Accelerase Trio (phương án xử lý 2), CW với Y5, Accelerase trong tổ hợp với vi sinh vật được nuôi trực tiếp dựa trên cơ sở ba chủng *Bacillus* (phương án xử lý 3), để biết chi tiết về các phương án xử lý enzyme và DFM, xem bảng 33.

Bảng 33: Mô tả các phương án xử lý*

Đối chứng	Phương án xử lý 1	Phương án xử lý 2	Phương án xử lý 3
Chỉ có khẩu phần ăn cơ bản #	Đối chứng với enzyme xylanaza †	Phương án xử lý 1 với enzyme phân giải chất xơ ‡	Phương án xử lý 2 + vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM) +
CW	Y5	Accel.	<i>Bacillus</i>

* các sản phẩm enzym và vi sinh vật được nuôi trực tiếp được bao gồm với tỷ lệ tương tự với 500 g trên mỗi tấn hệ mét trong toàn bộ thức ăn, mỗi thí nghiệm được thực hiện trong lần chạy lặp lại hai lần, phương án xử lý được lặp lại ba lần trong mỗi lần chạy; # Khẩu phần ăn cơ bản là khẩu phần ăn lúa mì đối chứng (CW), như được mô tả trong bảng 32; † Xylanaza là Y5 (Danisco Xylanase endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) với hoạt tính được đảm bảo là 4000 XU/kg thức ăn; ‡ Enzym phân giải chất xơ là Accel. (Accelerase Trio, ACCELLERASE® TRIO™ phức hợp enzym chứa tổ hợp có hiệu lực của các hoạt tính enzym bao gồm các β -glucanaza (200 CMC U/kg), các xylanaza (ví dụ, các endoxylanaza, endo-1,4- β -D-xylanaza (E.C. 3.2.1.8)) (>1200 ABX U/kg) và hỗn hợp enzym β -glucosidaza (>800 pNPG U/kg) (DuPont Industrial Biosciences) được định liều để chắc chắn hoạt tính được đảm bảo là 360 BGU β -glucanaza/kg thức ăn. +Vi sinh vật được nuôi trực tiếp là dựa trên cơ sở *Bacillus* (các tỷ lệ bằng nhau của các chủng AGTP BS918 NRRL B-50508, AGTP BS1013 NRRL B-50509 và AGTP BS3BP5 NRRL B-50510) với hoạt tính được đảm bảo là $3,0 \times 10^8$ cfu trong mỗi g sản phẩm, hoặc *Propionibacterium acidipropionici* P169 PTA-5271 Omni-Bos® P169 với hoạt tính được đảm bảo là $2,1 \times 10^9$ cfu trong mỗi g sản phẩm.

Các tác dụng xử lý đối với sự biến mất của DM và chất xơ. Tại thời điểm 0 và 48 giờ của thí nghiệm, chất lỏng được lọc ra và các chất rắn còn lại được thu lại và được gửi đi để phân tích gần đúng dưỡng chất của vật chất khô (DM), xơ không tan trong chất rửa axit và trung tính (ADF và NDF, một cách tương ứng), chất nêu sau (xơ) được tạo ra trên cơ sở DM theo các phương pháp được mô tả trong ấn phẩm (Association of Analytical Chemists (AOAC) 2007, 18th edition. AOAC, Washington, D. C). Các dữ liệu được tính toán dưới dạng sự biến mất tính theo phần trăm, phân tích thống kê được thực hiện dưới dạng ANOVA một chiều được giới hạn bởi lần chạy bằng cách sử dụng quy trình GLM của SPSS (phiên bản 17, SPSS Inc., Chicago, IL). Sự có ý nghĩa được khẳng định với $P \leq 0,10$, nghĩa là giá trị trung bình của các phương án xử lý được cho là tách biệt bằng cách sử dụng trắc nghiệm đa đoạn Duncan.

Kết quả

Trong khẩu phần ăn dựa trên cơ sở lúa mì được thử nghiệm, phương án xử lý kết hợp với xylanaza Y5, hỗn hợp enzym phân giải chất xơ Accelerase Trio và DFM dựa trên cơ sở ba *Bacillus* có sự biến mất của DM, ADF và NDF lớn nhất so với CW không có bất kỳ sự bổ sung enzym và DFM nào (bảng 34).

Bảng 34: Sự biến mất tính theo phần trăm của vật chất khô, xơ không tan trong chất rửa trung tính và axit trong quá trình lên men trong ruột sau của lợn trong 48 giờ in vitro

Trt#	Phương án xử lý	Δ DM (%)	Δ ADF (%)	Δ NDF (%)
1	Lúa mì đối chứng (CW)	3,95 ^b	2,31 ^b	4,27 ^b
2	CW + Y5	3,97 ^b	3,26 ^{ab}	5,87 ^{ab}
3	CW + Y5 + Accel.	4,19 ^{ab}	3,46 ^{ab}	5,77 ^{ab}
4	CW + Y5 + Accel. + <i>Bacillus</i>	4,57 ^a	3,66 ^a	7,37 ^a
	SEM	0,17	0,31	0,88

^{a, b} các trị số với các chỉ số trên khác nhau trong cột có khác biệt có ý nghĩa với $P \leq 0,10$; SEM, sai số chuẩn của giá trị trung bình; chi tiết về các phương án xử lý, xem bảng 7.2.

Tất cả các tài liệu công bố được đề cập đến trong bản mô tả này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các thay đổi và cải biên khác của các phương pháp và hệ thống được mô tả trong sáng chế sẽ là dễ hiểu đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này mà không tách khỏi phạm vi của theo sáng chế. Mặc dù sáng chế được mô tả về các phương án được ưu tiên cụ thể, nhưng cũng cần phải hiểu rằng sáng chế được yêu cầu bảo hộ không bị giới hạn quá mức bởi các phương án cụ thể này. Thay vào đó, các cải biên khác của các phương án thực hiện sáng chế đã được mô tả mà là hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực hoá sinh và công nghệ sinh học hoặc các lĩnh vực liên quan đều được dự định là thuộc phạm vi của các yêu cầu bảo hộ đi kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn chứa ít nhất hai chủng vi sinh vật được nuôi trực tiếp (DFM), xylanaza và β -glucanaza,

trong đó các chủng DFM được chọn từ nhóm chỉ bao gồm AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS918 (NRRL B-50508),

trong đó ít nhất một trong các chủng DFM là chủng sản xuất enzyme,

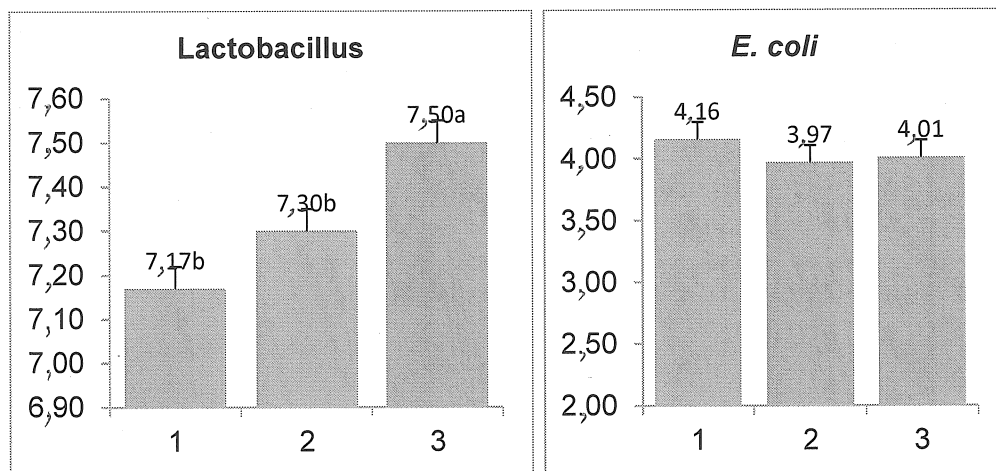
trong đó ít nhất một trong các chủng DFM là chủng lên men đường C5; và

trong đó mỗi xylanaza và β -glucanaza là enzyme ngoại sinh đối với các chủng DFM.
2. Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo điểm 1, trong đó
 - a. ít nhất một trong các chủng DFM là chủng sản xuất axit béo chuỗi ngắn; và/hoặc
 - b. ít nhất một trong các chủng DFM là chủng thúc đẩy hệ vi sinh vật nội sinh phân giải chất xơ; và/hoặc
 - c. DFM là các vi khuẩn có thể sống; và/hoặc
 - d. vi sinh vật được nuôi trực tiếp ở dạng nội bào tử.
3. Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm bao gồm enzym phân giải chất xơ khác nữa.
4. Chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo điểm 3, trong đó enzym phân giải chất xơ khác nữa được chọn từ nhóm bao gồm xenlobiohydrolaza (E.C. 3.2.1.176 và E.C. 3.2.1.91), β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21), β -xylosidaza (E.C. 3.2.1.37), feruloyl esteraza (E.C. 3.1.1.73), α -arabinofuranosidaza (E.C. 3.2.1.55), pectinaza (ví dụ endopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.15), exopolygalacturonaza (E.C. 3.2.1.67) hoặc pectat lyaza (E.C. 4.2.2.2), hoặc tổ hợp của chúng, tốt hơn là enzym phân giải chất xơ khác nữa được chọn từ nhóm bao gồm xenlobiohydrolaza (E.C. 3.2.1.176 và E.C. 3.2.1.91), β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21) hoặc các tổ hợp của chúng.
5. Chế phẩm phụ gia dùng cho thức ăn chăn nuôi theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 4 được bào chế dưới dạng hỗn hợp trộn sẵn còn bao gồm ít nhất một vitamin và / hoặc ít nhất một khoáng chất.
6. Phương pháp cải thiện năng suất của đối tượng hoặc cải thiện khả năng tiêu hóa của nguyên liệu thô trong thức ăn (ví dụ khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng, chẳng hạn

như khả năng tiêu hóa axit amin), hoặc cải thiện sự tích trữ nitơ, hoặc cải thiện tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (feed conversion ration - FCR), hoặc cải thiện sự tăng trọng ở đối tượng, hoặc cải thiện hiệu suất thức ăn ở đối tượng, hoặc dịch chuyển quá trình lên men trong ống tiêu hóa của đối tượng sang quá trình sản xuất axit butyric và/hoặc axit propionic, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 5.

7. Bộ kit chứa chế phẩm phụ gia dùng trong thức ăn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

Fig. 1



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DuPont Nutrition Biosciences ApS

<120> CHẾ PHẨM PHỤ GIA DÙNG TRONG THỨC ĂN, PHƯƠNG PHÁP CẢI THIẾN NĂNG SUẤT VÀ BỘ KIT CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

<130> P046269PCT

<150> US 61/679,084

<151> 2012-08-03

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanaza

<400> 1

Met Lys Leu Ser Ser Phe Leu Tyr Thr Ala Ser Leu Val Ala Ala Ile
1 5 10 15

Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu
20 25 30

Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn
35 40 45

Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly
50 55 60

Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser
65 70 75 80

Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala
85 90 95

Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser
100 105 110

Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr
115 120 125

Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly
130 135 140

Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly
 145 150 155 160

Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp
 165 170 175

Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala
 180 185 190

Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys
 195 200 205

Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly
 210 215 220

Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala
 225 230 235 240

Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val
 245 250 255

Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn
 260 265 270

Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile
 275 280 285

Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu
 290 295 300

His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr
 305 310 315 320

Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
 325

<210> 2
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự xylanaza

<400> 2

Ile Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys
 1 5 10 15

Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro
 20 25 30

Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe
 35 40 45

Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro
 50 55 60

Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe
 65 70 75 80

Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His
 85 90 95

Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu
 100 105 110

Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys
 115 120 125

Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp
 130 135 140

Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp
 145 150 155 160

Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn
 165 170 175

Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser
 180 185 190

Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln
 195 200 205

Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly
 210 215 220

Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly
225 230 235 240

Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala
245 250 255

Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys
260 265 270

Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys
275 280 285

Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala
290 295 300

Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
305 310

<210> 3
<211> 305
<212> PRT
<213> Năm dạng sợi

<400> 3

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
20 25 30

Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly
50 55 60

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val
65 70 75 80

Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys
85 90 95

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
100 105 110

Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
 115 120 125

Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His
 130 135 140

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg
 145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr
 165 170 175

Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro
 180 185 190

Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly
 195 200 205

Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala
 210 215 220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu
 225 230 235 240

Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys
 245 250 255

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val
 260 265 270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp
 275 280 285

Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu
 290 295 300

Arg
 305

<210> 4
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanaza

<400> 4

Met Lys Leu Ser Ser Phe Leu Tyr Thr Ala Ser Leu Val Ala Ala Ile
 1 5 10 15

Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys Leu
 20 25 30

Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn
 35 40 45

Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly
 50 55 60

Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser
 65 70 75 80

Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala
 85 90 95

Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser
 100 105 110

Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr
 115 120 125

Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Asn Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly
 130 135 140

Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Asp Trp Asp Gly
 145 150 155 160

Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp
 165 170 175

Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala
 180 185 190

Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys
 195 200 205

Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly

210 215 220
 Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala
 225 230 235 240
 Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val
 245 250 255
 Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn
 260 265 270
 Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile
 275 280 285
 Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu
 290 295 300
 His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Ala Ala Tyr
 305 310 315 320
 Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
 325
 <210> 5
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự xylanaza
 <400> 5
 Ile Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro
 20 25 30
 Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe
 35 40 45
 Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro
 50 55 60
 Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe

65					70					75				80	
Ala	Gln	Gln	Asn	Gly	Leu	Lys	Val	Arg	Gly	His	Thr	Leu	Val	Trp	His
				85					90					95	
Ser	Gln	Leu	Pro	Gln	Trp	Val	Lys	Asn	Ile	Asn	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu
			100					105					110		
Thr	Lys	Val	Ile	Glu	Asn	His	Val	Thr	Asn	Val	Val	Gly	Arg	Tyr	Lys
		115					120					125			
Gly	Lys	Ile	Tyr	Ala	Trp	Asp	Val	Val	Asn	Glu	Ile	Phe	Asp	Trp	Asp
	130					135					140				
Gly	Thr	Leu	Arg	Lys	Asp	Ser	His	Phe	Asn	Asn	Val	Phe	Gly	Asn	Asp
145					150					155					160
Asp	Tyr	Val	Gly	Ile	Ala	Phe	Arg	Ala	Ala	Arg	Lys	Ala	Asp	Pro	Asn
				165					170					175	
Ala	Lys	Leu	Tyr	Ile	Asn	Asp	Tyr	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser
			180					185					190		
Lys	Val	Thr	Lys	Gly	Met	Val	Pro	Ser	Val	Lys	Lys	Trp	Leu	Ser	Gln
		195					200					205			
Gly	Val	Pro	Val	Asp	Gly	Ile	Gly	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Asp	Pro	Gly
	210					215					220				
Ala	Ala	Gly	Gln	Ile	Gln	Gly	Ala	Leu	Thr	Ala	Leu	Ala	Asn	Ser	Gly
225					230					235					240
Val	Lys	Glu	Val	Ala	Ile	Thr	Glu	Leu	Asp	Ile	Arg	Thr	Ala	Pro	Ala
				245					250					255	
Asn	Asp	Tyr	Ala	Thr	Val	Thr	Lys	Ala	Cys	Leu	Asn	Val	Pro	Lys	Cys
			260					265					270		
Ile	Gly	Ile	Thr	Val	Trp	Gly	Val	Ser	Asp	Lys	Asn	Ser	Trp	Arg	Lys
		275					280					285			
Glu	His	Asp	Ser	Leu	Leu	Phe	Asp	Ala	Asn	Tyr	Asn	Pro	Lys	Ala	Ala
	290					295					300				

Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
305 310

<210> 6
<211> 305
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự xylanaza

<400> 6

Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
20 25 30

Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly
50 55 60

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val
65 70 75 80

Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys
85 90 95

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
100 105 110

Thr Asn Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
115 120 125

Val Asn Glu Ile Phe Asp Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His
130 135 140

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg
145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr
165 170 175

Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro
180 185 190

Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly
195 200 205

Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala
210 215 220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu
225 230 235 240

Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys
245 250 255

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val
260 265 270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp
275 280 285

Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Ala Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu
290 295 300

Arg
305

<210> 7
<211> 229
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự xylanaza

<400> 7

Met Val Ser Phe Lys Tyr Leu Phe Leu Ala Ala Ser Ala Leu Gly Ala
1 5 10 15

Leu Ala Ala Pro Val Glu Val Glu Glu Ser Ser Trp Phe Asn Glu Thr
20 25 30

Ala Leu His Glu Phe Ala Glu Arg Ala Gly Thr Pro Ser Ser Thr Gly
35 40 45

Trp Asn Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Asn Gly Gly Thr
 50 55 60

Val Asn Tyr Gln Asn Gly Asn Gly Gly Ser Tyr Ser Val Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Asp Thr Gly Asn Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala
 85 90 95

Arg Thr Ile Asn Tyr Ser Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr
 100 105 110

Leu Thr Val Tyr Gly Trp Thr Thr Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile
 115 120 125

Val Glu Asn Tyr Gly Thr Tyr Asn Pro Gly Asn Gly Gly Thr Tyr Arg
 130 135 140

Gly Ser Val Tyr Ser Asp Gly Ala Asn Tyr Asn Ile Tyr Thr Ala Thr
 145 150 155 160

Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Asp Lys Thr Phe Thr Gln Tyr
 165 170 175

Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Thr Gly Gly Thr Val Thr Thr Ala
 180 185 190

Asn His Phe Asn Ala Trp Ala Gln Leu Gly Met Ser Leu Gly Thr His
 195 200 205

Asn Tyr Gln Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser
 210 215 220

Ser Ile Thr Val Tyr
 225

<210> 8
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự xylanaza

<400> 8

Ala Pro Val Glu Val Glu Glu Ser Ser Trp Phe Asn Glu Thr Ala Leu
1 5 10 15

His Glu Phe Ala Glu Arg Ala Gly Thr Pro Ser Ser Thr Gly Trp Asn
20 25 30

Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Asn Gly Gly Thr Val Asn
35 40 45

Tyr Gln Asn Gly Asn Gly Gly Ser Tyr Ser Val Gln Trp Lys Asp Thr
50 55 60

Gly Asn Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala Arg Thr
65 70 75 80

Ile Asn Tyr Ser Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr
85 90 95

Val Tyr Gly Trp Thr Thr Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu
100 105 110

Asn Tyr Gly Thr Tyr Asn Pro Gly Asn Gly Gly Thr Tyr Arg Gly Ser
115 120 125

Val Tyr Ser Asp Gly Ala Asn Tyr Asn Ile Tyr Thr Ala Thr Arg Tyr
130 135 140

Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Asp Lys Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser
145 150 155 160

Val Arg Gln Ser Lys Arg Thr Gly Gly Thr Val Thr Thr Ala Asn His
165 170 175

Phe Asn Ala Trp Ala Gln Leu Gly Met Ser Leu Gly Thr His Asn Tyr
180 185 190

Gln Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile
195 200 205

Thr Val Tyr
210

<210> 9

<211> 189
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự xylanaza

<400> 9

Ala Gly Thr Pro Ser Ser Thr Gly Trp Asn Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15

Phe Trp Thr Asp Asn Gly Gly Thr Val Asn Tyr Gln Asn Gly Asn Gly
 20 25 30

Gly Ser Tyr Ser Val Gln Trp Lys Asp Thr Gly Asn Phe Val Gly Gly
 35 40 45

Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala Arg Thr Ile Asn Tyr Ser Gly Ser
 50 55 60

Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Val Tyr Gly Trp Thr Thr
 65 70 75 80

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Tyr Gly Thr Tyr Asn
 85 90 95

Pro Gly Asn Gly Gly Thr Tyr Arg Gly Ser Val Tyr Ser Asp Gly Ala
 100 105 110

Asn Tyr Asn Ile Tyr Thr Ala Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu
 115 120 125

Gly Asp Lys Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg
 130 135 140

Thr Gly Gly Thr Val Thr Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala Gln
 145 150 155 160

Leu Gly Met Ser Leu Gly Thr His Asn Tyr Gln Ile Val Ala Thr Glu
 165 170 175

Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Thr Val Tyr
 180 185

<210> 10

<211> 232
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự xylanaza

<400> 10

Met Val Ser Phe Thr Ser Leu Leu Ala Ala Val Ser Ala Val Thr Gly
 1 5 10 15

Val Met Ala Leu Pro Ser Ala Gln Pro Val Asp Gly Met Ser Val Val
 20 25 30

Glu Arg Asp Pro Pro Thr Asn Val Leu Asp Lys Arg Thr Gln Pro Thr
 35 40 45

Thr Gly Thr Ser Gly Gly Tyr Tyr Phe Ser Phe Trp Thr Asp Thr Pro
 50 55 60

Asn Ser Val Thr Tyr Thr Asn Gly Asn Gly Gly Gln Phe Ser Met Gln
 65 70 75 80

Trp Ser Gly Asn Gly Asn His Val Gly Gly Lys Gly Trp Met Pro Gly
 85 90 95

Thr Ser Arg Thr Ile Lys Tyr Ser Gly Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn
 100 105 110

Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr
 115 120 125

Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asn Pro Ser Ser Gly Gly Gln
 130 135 140

Lys Lys Gly Glu Val Asn Val Asp Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Val
 145 150 155 160

Ser Thr Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asn Lys Thr Phe Gln
 165 170 175

Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn Lys Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn
 180 185 190

Thr Gly Ala His Phe Gln Ala Trp Lys Asn Val Gly Leu Asn Leu Gly

195 200 205
 Thr His Asp Tyr Gln Ile Leu Ala Val Glu Gly Tyr Tyr Ser Ser Gly
 210 215 220

 Ser Ala Ser Met Thr Val Ser Gln
 225 230

 <210> 11
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự xylanaza

 <400> 11

 Leu Pro Ser Ala Gln Pro Val Asp Gly Met Ser Val Val Glu Arg Asp
 1 5 10 15

 Pro Pro Thr Asn Val Leu Asp Lys Arg Thr Gln Pro Thr Thr Gly Thr
 20 25 30

 Ser Gly Gly Tyr Tyr Phe Ser Phe Trp Thr Asp Thr Pro Asn Ser Val
 35 40 45

 Thr Tyr Thr Asn Gly Asn Gly Gly Gln Phe Ser Met Gln Trp Ser Gly
 50 55 60

 Asn Gly Asn His Val Gly Gly Lys Gly Trp Met Pro Gly Thr Ser Arg
 65 70 75 80

 Thr Ile Lys Tyr Ser Gly Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu
 85 90 95

 Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val
 100 105 110

 Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asn Pro Ser Ser Gly Gly Gln Lys Lys Gly
 115 120 125

 Glu Val Asn Val Asp Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Val Ser Thr Arg
 130 135 140

 Val Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asn Lys Thr Phe Gln Gln Tyr Trp

[illegible]

```
<210> 12
<211> 188
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Trình tự xylanaza

<400> 12

Thr Gln Pro Thr Thr Gly Thr Ser Gly Gly Tyr Tyr Phe Ser Phe Trp
1 5 10 15

Thr Asp Thr Pro Asn Ser Val Thr Tyr Thr Asn Gly Asn Gly Gly Gln
20 25 30

Phe Ser Met Gln Trp Ser Gly Asn Gly Asn His Val Gly Gly Lys Gly
35 40 45

Trp Met Pro Gly Thr Ser Arg Thr Ile Lys Tyr Ser Gly Ser Tyr Asn
50 55 60

Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro
65 70 75 80

Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asn Pro Ser
85 90 95

Ser Gly Gly Gln Lys Lys Gly Glu Val Asn Val Asp Gly Ser Val Tyr
100 105 110

Asp Ile Tyr Val Ser Thr Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asn

115 120 125
 Lys Thr Phe Gln Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn Lys Arg Ser Ser
 130 135 140
 Gly Ser Val Asn Thr Gly Ala His Phe Gln Ala Trp Lys Asn Val Gly
 145 150 155 160
 Leu Asn Leu Gly Thr His Asp Tyr Gln Ile Leu Ala Val Glu Gly Tyr
 165 170 175
 Tyr Ser Ser Gly Ser Ala Ser Met Thr Val Ser Gln
 180 185

<210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi 28F

<220>
 <221> dấu hiệu chưa chính xác
 <222> (11)..(11)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 13
 gagtttgatc ntggctcag
 19

<210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi 519R

<220>
 <221> dấu hiệu chưa chính xác
 <222> (3)..(3)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu chưa chính xác
 <222> (8)..(8)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 14

gtnttaacngc ggckgctg
18

<210> 15
<211> 10
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi 1

<400> 15
ggtgcgggaa
10

<210> 16
<211> 10
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi 2

<400> 16
gtttcgcctcc
10

<210> 17
<211> 10
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi 3

<400> 17
gtagaccggt
10

<210> 18
<211> 10
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi 4

<400> 18
aagagccggt
10

<210> 19
<211> 10

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi 5

<400> 19
aacgcgcaac
10

<210> 20
<211> 10
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi 6

<400> 20
cccgtcagca
10