



(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)



1-0027408

(51)⁷ C12N 15/82

(13) B

(21) 1-2011-02745

(22) 19/03/2009

(86) PCT/US2009/001720 19/03/2009

(87) WO 2010/107415 23/09/2010

(45) 25/02/2021 395

(43) 26/11/2012 296A

(73) DSM IP ASSETS B.V. (NL)

Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, The Netherlands

(72) APT, Kirk E. (US); PFEIFER, Joseph W., III (US); HANSEN, Jon, Milton (US);
BEHRENS, Paul, Warren (US); Zirkle, Ross (US); STAHL, Tracey Lynn (US).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)

(54) DẦU VI SINH VẬT CHỨA PHÂN ĐOẠN TRIGLYXERIT, SẢN PHẨM THỰC
PHẨM, DƯỢC PHẨM VÀ MỸ PHẨM CHỨA DẦU VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các vi sinh vật thraustochytrid đã phân lập, cũng như các chủng
và các thể đột biến của các vi sinh vật này. Sáng chế còn đề cập đến các sinh khối
thraustochytrid, các dầu vi sinh vật, các chế phẩm, các nuôi cấy thraustochytrid, các
phương pháp sản xuất các dầu vi sinh vật, và các phương pháp sử dụng các thraustochytrid,
các sinh khối đã phân tách, cũng như các dầu vi sinh vật.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các vi sinh vật thraustochytrid như các chủng và các thể đột biến của các vi sinh vật này. Sáng chế còn đề cập đến các sinh khối thraustochytrid, các dầu vi sinh vật, các thành phần axit béo, các sản phẩm nuôi cấy, các phương pháp sản xuất các dầu vi sinh vật và các phương pháp sử dụng các thraustochytrid, các sinh khối đã phân tách và các dầu vi sinh vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các axit béo được phân loại dựa trên độ dài và đặc tính no của mạch cacbon. Các axit béo mạch ngắn thường có 12 nguyên tử cacbon hoặc ít hơn, các axit béo mạch trung bình thường có từ 14 đến 18 nguyên tử cacbon, còn các axit béo mạch dài thường có 20 nguyên tử cacbon hoặc nhiều hơn. Các axit béo được gọi là các axit béo no nếu không có liên kết đôi giữa các nguyên tử cacbon, và được gọi là các axit béo không no nếu có mặt liên kết đôi. Các axit béo mạch dài không no là đơn không no nếu chỉ có mặt một liên kết đôi nêu trên, và là đa không no nếu có mặt hơn một liên kết đôi nêu trên.

Các axit béo đa không no (các PUFA) được phân loại dựa vào vị trí của liên kết đôi thứ nhất tính từ tận cùng metyl của axit béo: các axit béo omega-3 (ký hiệu là n-3) chứa liên kết đôi thứ nhất ở cacbon thứ ba, còn các axit béo omega-6 (ký hiệu là n-6) chứa liên kết đôi thứ nhất ở cacbon thứ sáu. Ví dụ, axit docosahexaenoic (“DHA”) là axit béo mạch dài đa không no omega-3 có độ dài mạch 22 nguyên tử cacbon và 6 liên kết đôi, thường được ký hiệu là “22:6 n-3”. Các axit béo đa không no mạch dài omega-3 khác là axit eicosapentaenoic (“EPA”), được ký hiệu là “20:5 n-3” và axit docosapentaenoic omega-3 (“DPA n-3”), được ký hiệu là “22:5 n-3”. DHA và EPA được gọi là các axit béo “thiết yếu”. Các axit béo mạch dài omega-6 là axit arachidonic (“ARA”), được ký hiệu là “20:4 11-6”, và axit docosapentaenoic omega-6 (“DPA n-6”), được ký hiệu là “22:5 n-6”.

Các axit béo omega-3 là các phân tử có tầm quan trọng về sinh vật học, ảnh hưởng đến sinh lý tế bào do chúng có mặt trong các màng tế bào, điều khiển sự sản xuất và sự biểu hiện gen của các hợp chất có hoạt tính sinh học, và là các cơ chất sinh tổng hợp (xem tài liệu: Roche, H. M., *Proc. Nutr. Soc.* 58: 397-401 (1999)). Ví dụ, DHA chiếm tỷ lệ khoảng 15-20% các lipit ở vỏ não của người, 30-60% các lipit ở võng mạc, tập trung ở tinh hoàn, tinh dịch, và là thành phần cấu tạo quan trọng của sữa mẹ (xem tài liệu:

Jean-Pascal Bergé & Gilles Barnathan, *Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects*, trong cuốn sách: *Marine Biotechnology I* 49 (do T. Scheper biên soạn, 2005)). DHA chiếm tới khoảng 97% các axit béo omega-3 ở não và chiếm tới 93% các axit béo omega-3 ở võng mạc. Hơn nữa, DHA là axit thiết yếu cho sự phát triển của cả thai nhi và trẻ nhỏ, cũng như cho sự duy trì các hoạt động nhận thức ở người lớn (xem tài liệu: nêu trên). Các axit béo omega-3, bao gồm DHA và EPA, cũng có tính chất chống viêm (chẳng hạn, xem tài liệu trên và tài liệu: Simopoulos, A. P., *J. Am. Coll. Nutr.* 21: 495-595 (2002)). Do các axit béo omega-3 không được tổng hợp mới trong cơ thể người, nên các axit béo này cần phải được lấy từ các nguồn chất dinh dưỡng.

Dầu hạt lanh và các loại dầu cá được xem là các nguồn dinh dưỡng chứa hàm lượng cao các axit béo omega-3. Dầu hạt lanh không chứa EPA, DHA, DPA hoặc ARA, nhưng chứa khá lượng axit linolenic (C18:3 n-3) là đơn vị cấu trúc giúp cơ thể có khả năng sản xuất ra EPA. Song, có bằng chứng là, tốc độ chuyển hoá đó có thể là chậm và không ổn định, đặc biệt là ở những người sức khoẻ bị suy yếu. Các loại dầu cá khác nhau nhiều về loại axit béo và lượng thành phần axit béo, tùy thuộc vào loài cá cụ thể và các thức ăn của chúng. Ví dụ, cá được nuôi trong nghề nuôi trồng thủy sản có khuynh hướng chứa hàm lượng các axit béo omega-3 thấp hơn so với cá đánh bắt được trong thiên nhiên hoang dã. Hơn nữa, các loại dầu cá có nguy cơ chứa các chất ô nhiễm môi trường và do đó có thể có liên quan với độ bền và mùi hoặc vị của cá.

Các thraustochytrid là các vi sinh vật thuộc bộ Thraustochytriales. Các thraustochytrid bao gồm các thành viên của giống *Schizochytrium* và đã được công nhận là một nguồn các axit béo omega-3 có thể lựa chọn, bao gồm DHA (xem bằng sáng chế Mỹ số 5,130,242). Các dầu được sản xuất ra từ các vi sinh vật biển dị dưỡng này thường có thành phần các axit béo đa không no đơn giản hơn dầu cá hoặc dầu vi tảo tương ứng (xem tài liệu: Lewis, T. E., *Mar. Biotechnol.* 1: 580-587 (1999)). Các chủng của loài thraustochytrid đã được thông báo là sản xuất ra các axit béo omega-3 với tỷ lệ phần trăm cao của toàn bộ các axit béo do sinh vật sản xuất ra (xem bằng sáng chế Mỹ số 5,130,242; Huang, J. et al., *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 78: 605-610 (2001); Huang, J. et al., *Mar. Biotechnol.* 5: 450-457 (2003)). Tuy nhiên, các thraustochytrid đã phân lập có sự khác nhau về danh tính và lượng các axit béo đa không no mạch dài được sản xuất ra, cho nên một số chủng đã mô tả trước đây có thể có lượng không đạt các axit béo omega-3 và/hoặc có thể có năng suất thấp trong nuôi cấy. Bởi vậy, vẫn tiếp tục có nhu cầu tách biệt các

thraustochytrid có năng suất cao, cho thành phần mong muốn của các axit béo đa không no mạch dài.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất vi sinh vật thraustochytrid đã phân lập thuộc loài thraustochytrid được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695 hoặc chủng có nguồn gốc từ vi sinh vật này, trong đó toàn bộ các axit béo, do vi sinh vật vừa nêu hoặc chủng có nguồn gốc từ vi sinh vật này sản xuất ra, chứa khoảng 10% hoặc thấp hơn axit eicosapentaenoic tính theo trọng lượng.

Sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật thraustochytrid đã phân lập có các đặc tính của loài thraustochytrid được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695, trong đó toàn bộ các axit béo, do vi sinh vật vừa nêu hoặc chủng có nguồn gốc từ vi sinh vật này sản xuất ra, chứa khoảng 10% hoặc thấp hơn axit eicosapentaenoic tính theo trọng lượng.

Sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật thraustochytrid đã phân lập hoặc chủng có nguồn gốc từ vi sinh vật này, chứa phân đoạn triglyxerit, trong đó hàm lượng axit docosahexaenoic trong phân đoạn triglyxerit ít nhất là khoảng 40% theo trọng lượng; trong đó hàm lượng axit docosapentaenoic n-6 trong phân đoạn triglyxerit ít nhất là khoảng từ 0,5% đến 6% theo trọng lượng; và trong đó toàn bộ các axit béo, do vi sinh vật nêu trên hoặc chủng vi sinh vật có nguồn gốc từ vi sinh vật này sản xuất ra, chứa khoảng 10% hoặc thấp hơn axit eicosapentaenoic tính theo trọng lượng.

Sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật thraustochytrid đã phân lập của cùng loài như thraustochytrid được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695, hoặc chủng vi sinh vật có nguồn gốc từ vi sinh vật này, trong đó toàn bộ các axit béo do vi sinh vật nêu trên hoặc chủng vi sinh vật có nguồn gốc từ vi sinh vật này sản xuất ra, chứa khoảng 10% hoặc thấp hơn axit eicosapentaenoic tính theo trọng lượng.

Theo một số phương án, chủng vi sinh vật có nguồn gốc từ vi sinh vật thraustochytrid đã phân lập theo sáng chế là chủng đột biến.

Sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật đã được phân lập được lưu trữ dưới các số truy cập ATCC là PTA-9695, ATCC PTA-9696, ATCC PTA-9697 hoặc ATCC PTA-9698.

Sáng chế cũng đề xuất sinh khối thraustochytrid chứa chủng vi sinh vật bất kỳ trong các vi sinh vật thraustochytrid theo sáng chế hoặc các hỗn hợp của các chủng này.

Sáng chế cũng đề xuất sinh khối thraustochytrid đã phân tách, trong đó ít nhất có khoảng 50% theo trọng lượng của trọng lượng tế bào khô trong sinh khối là các axit béo,

và trong đó ít nhất có khoảng 50% theo trọng lượng của các axit béo là của các axit béo omega-3. Theo một số phương án, ít nhất có khoảng 50% theo trọng lượng của các axit béo là của axit docosahexaenoic. Sáng chế cũng đề xuất sinh khối *thraustochytrid* đã phân tách, trong đó ít nhất có khoảng 25% theo trọng lượng của trọng lượng tế bào khô trong sinh khối là của axit docosahexaenoic.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề xuất sinh khối *thraustochytrid* đã phân tách, trong đó có khoảng 10% theo trọng lượng hoặc ít hơn của các axit béo là của axit eicosapentaenoic, và trong đó tỷ lệ theo trọng lượng của axit docosahexaenoic so với axit eicosapentaenoic ít nhất là khoảng 5:1.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề xuất sinh khối *thraustochytrid* đã phân tách, trong đó có khoảng 1,5% theo trọng lượng hoặc ít hơn của các axit béo là của axit arachidonic, và trong đó tỷ lệ theo trọng lượng của axit docosahexaenoic so với axit arachidonic ít nhất là khoảng 20:1.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề xuất sinh khối *thraustochytrid* đã phân tách chứa axit docosahexaenoic và axit docosapentaenoic n-6 với tỷ lệ theo trọng lượng ít nhất là khoảng 10:1.

Sáng chế cũng đề xuất dịch nuôi cấy *thraustochytrid* đã phân lập chứa một chủng vi sinh vật bất kỳ trong các vi sinh vật *thraustochytrid* theo sáng chế hoặc các hỗn hợp của các chủng này. Theo một số phương án, dịch nuôi cấy này chứa ít nhất khoảng 5% oxy hoà tan.

Sáng chế cũng đề xuất sản phẩm thực phẩm, mỹ phẩm hoặc dược phẩm dành cho động vật hoặc người chứa chủng vi sinh vật bất kỳ trong các vi sinh vật *thraustochytrid* hoặc sinh khối theo sáng chế, hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế cũng đề xuất dầu vi sinh vật, chứa phân đoạn triglyxerit chiếm ít nhất là khoảng 70% theo trọng lượng, trong đó hàm lượng của axit docosahexaenoic trong phân đoạn triglyxerit ít nhất là khoảng 50% theo trọng lượng, và trong đó hàm lượng của axit docosapentaenoic n-6 trong phân đoạn triglyxerit là khoảng từ 0,5 % đến 6% theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật còn chứa axit arachidonic trong phân đoạn triglyxerit với hàm lượng khoảng 1,5% theo trọng lượng hoặc ít hơn.

Sáng chế cũng đề xuất dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit chiếm ít nhất là khoảng 70% theo trọng lượng, trong đó hàm lượng của axit docosahexaenoic trong phân đoạn triglyxerit ít nhất là khoảng 40% theo trọng lượng, hàm lượng của axit

docosapentaenoic n-6 trong phân đoạn triglyxerit ít nhất là khoảng từ 0,5 % đến 6% theo trọng lượng; và trong đó tỷ lệ của axit docosaheptaenoic so với axit docosapentaenoic n-6 là khoảng lớn hơn 6:1.

Sáng chế cũng đề xuất dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit chiếm ít nhất là khoảng 70% theo trọng lượng, trong đó hàm lượng của axit docosaheptaenoic trong phân đoạn triglyxerit ít nhất là khoảng 60% theo trọng lượng.

Theo một số phương án, ít nhất có khoảng 20% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit của dầu vi sinh vật chứa axit docosaheptaenoic ở hai vị trí trong triglyxerit được chọn từ hai vị trí bất kỳ trong số các vị trí *sn*-1, *sn*-2 và *sn*-3. Theo một số phương án, ít nhất có khoảng 5% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit của dầu vi sinh vật chứa axit docosaheptaenoic ở tất cả ba vị trí *sn*-1, *sn*-2 và *sn*-3 trong triglyxerit.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật còn chứa khoảng 5% hoặc ít hơn axit heptadecanoic theo trọng lượng.

Sáng chế cũng đề xuất sản phẩm thực phẩm, mỹ phẩm hoặc dược phẩm dành cho động vật hoặc người chứa dầu bất kỳ trong các dầu vi sinh vật theo sáng chế. Theo một số phương án, sản phẩm thực phẩm là sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh. Theo một số phương án, sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh thích hợp cho trẻ sơ sinh đẻ non. Theo một số phương án, sản phẩm thực phẩm là sữa, đồ uống, đồ uống trị liệu, đồ uống bổ dưỡng hoặc dạng kết hợp của chúng. Theo một số phương án, sản phẩm thực phẩm là chất phụ gia thực phẩm cho động vật hoặc người. Theo một số phương án, sản phẩm thực phẩm là sản phẩm bổ sung dinh dưỡng. Theo một số phương án, sản phẩm thực phẩm là thức ăn cho động vật. Theo một số phương án, thức ăn cho động vật là thức ăn dùng trong nuôi trồng thủy sản. Theo một số phương án, thức ăn cho động vật là thức ăn cho vật nuôi, thức ăn cho động vật vườn bách thú, thức ăn cho động vật cung cấp sức kéo-vận chuyển, thức ăn cho gia súc hoặc dạng kết hợp của các thức ăn này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất dầu vi sinh vật có chứa các axit béo omega-3, phương pháp này bao gồm: a) nuôi cấy vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật *thraustochytrid* đã phân lập hoặc hỗn hợp của các vi sinh vật này theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy để tạo ra sinh khối, và b) chiết lấy dầu chứa các axit béo omega-3 từ sinh khối này. Theo một số phương án, dịch nuôi cấy có chứa ít nhất khoảng 5% oxy hoà tan. Theo một số phương án, độ pH của dịch nuôi cấy được duy trì ở khoảng từ 6,5 đến 8,5. Theo một số phương án, nhiệt độ nuôi cấy được duy trì khoảng từ 17°C đến 30°C. Theo

một số phương án, dịch nuôi cấy có nồng độ glucoza khoảng từ 5 g/l đến 50 g/l.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất dầu vi sinh vật có chứa các axit béo omega-3; phương pháp này bao gồm việc chiết dầu chứa các axit béo omega-3 từ sinh khối bất kỳ trong các sinh khối theo sáng chế. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật được chiết bằng quy trình chiết với dung môi hexan. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật được chiết bằng quy trình chiết không dùng dung môi.

Theo một số phương án, trọng lượng tế bào khô trong sinh khối tách biệt từ mỗi lít của bất kỳ dịch nuôi cấy nào trong các dịch nuôi cấy theo sáng chế ít nhất là khoảng 50 g sau khi nuôi cấy trong thời gian 7 ngày, ở nhiệt độ khoảng từ 17°C đến 30°C, trong môi trường nuôi cấy có độ pH khoảng từ 6,5 đến 8,0 có chứa các nguồn cacbon, nitơ, các chất dinh dưỡng, và khoảng từ 950 ppm đến 8.500 ppm ion clorua.

Theo một số phương án, bất kỳ nuôi cấy nào trong các môi trường nuôi cấy theo sáng chế có năng suất axit béo omega-3 ít nhất là khoảng 2 g/l/ngày sau khi nuôi cấy trong thời gian khoảng 7 ngày, ở nhiệt độ khoảng từ 17°C đến 30°C, trong môi trường nuôi cấy có độ pH khoảng từ 6,5 đến 8,0 có chứa các nguồn cacbon, nitơ, các chất dinh dưỡng, và khoảng từ 950 ppm đến 8.500 ppm ion clorua.

Sáng chế cũng đề xuất dầu vi sinh vật được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng đối tượng bất kỳ trong số các vi sinh vật, các sinh khối đã được phân tách nêu trên, hoặc các dầu vi sinh vật theo sáng chế, hoặc dạng kết hợp của chúng, để sản xuất thuốc điều trị tình trạng viêm hoặc bệnh có liên quan đến viêm.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng đối tượng bất kỳ trong số các vi sinh vật, các sinh khối đã được phân tách nêu trên, hoặc các dầu vi sinh vật theo sáng chế, hoặc dạng kết hợp của chúng, để điều trị tình trạng viêm hoặc bệnh có liên quan đến viêm.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng đối tượng bất kỳ trong số các vi sinh vật, các sinh khối đã được phân tách nêu trên, hoặc các dầu vi sinh vật theo sáng chế, hoặc dạng kết hợp của chúng, để sử dụng trong điều trị tình trạng viêm hoặc bệnh có liên quan đến viêm.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị tình trạng viêm hoặc bệnh có liên quan đến viêm ở đối tượng cần điều trị như vậy, bao gồm việc sử dụng cho đối tượng này đối tượng bất kỳ trong các vi sinh vật, các sinh khối đã được phân tách nêu trên, hoặc các dầu

vi sinh vật theo sáng chế, hoặc dạng kết hợp của chúng, và vật liệu mang được dụng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các vi sinh vật *thraustochytrid* đã phân lập, cũng như các chủng và các thể đột biến của các vi sinh vật này, cũng như các sinh khối, các dầu vi sinh vật, các thành phần của các dầu đó và việc nuôi cấy các vi sinh vật nêu trên. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sản xuất các dầu vi sinh vật từ các *thraustochytrid* theo sáng chế, và các phương pháp sử dụng các *thraustochytrid*, các sinh khối và các dầu vi sinh vật. Các *thraustochytrid* nêu ở đây là các *thraustochytrid* có năng suất cao so với các *thraustochytrid* đã phân lập được trước đây và chúng sản xuất ra các thành phần axit béo độc đáo, một phần đặc trưng ở hàm lượng cao các axit béo omega-3, đặc biệt là hàm lượng cao của DHA.

Các vi sinh vật *thraustochytrid*

Sáng chế đề cập đến các *thraustochytrid* đã phân lập, bao gồm các thể đột biến, các thể tái tổ hợp và các thể biến dị của các vi sinh vật này.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến *thraustochytrid* thuộc loài được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695. *Thraustochytrid* đã phân lập ở đây cũng được gọi là *Schizochytrium sp.* ATCC PTA-9695. *Thraustochytrid* gắn liền với số truy cập ATCC PTA-9695 đã được lưu trữ theo Hiệp ước Budapest ngày 7 tháng 1 năm 2009 tại Trung tâm lưu trữ chủng giống chuẩn của Mỹ, kho lưu trữ vật liệu sáng chế, 10801 Đại lộ University, Manassas, VA 20110-2209.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chủng *thraustochytrid* đã phân lập được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật *thraustochytrid* đã phân lập của cùng loài như *thraustochytrid* được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến *thraustochytrid* đã phân lập có các đặc tính của loài được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695 hoặc của chủng có nguồn gốc từ đó. Các đặc tính của loài *thraustochytrid* được lưu trữ với số truy cập ATCC PTA-9695 bao gồm các tính chất sinh trưởng và các tính chất kiểu hình của nó (các ví dụ về các tính chất kiểu hình là tính chất hình thái học và tính chất sinh sản), các tính chất vật lý và hoá học của nó (ví dụ như các trọng lượng khô và thành phần lipid) và các trình tự gen của nó. Theo một số phương án, các *thraustochytrid* đã phân lập theo sáng chế có các tính chất kiểu hình về cơ bản là đồng nhất như *thraustochytrid* được lưu trữ với số truy

cập ATCC là PTA- 9695. Theo một số phương án, các thraustochytrid đã phân lập theo sáng chế có các tính chất sinh trưởng về cơ bản là đồng nhất như thraustochytrid được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến thể đột biến, thể biến dị hoặc thể tái tổ hợp của thraustochytrid đã phân lập theo sáng chế, trong đó toàn bộ các axit béo do thể đột biến, thể biến dị hoặc thể tái tổ hợp vừa nêu sản xuất ra, chứa khoảng 10% hoặc ít hơn axit eicosapentaenoic theo trọng lượng. Các chủng đột biến có thể được sản xuất ra bằng các kỹ thuật đã biết rõ. Các kỹ thuật thông thường bao gồm chiếu xạ; xử lý ở nhiệt độ cao; xử lý bằng tác nhân gây đột biến. Các chủng biến dị có thể là các sản phẩm tách biệt và/hoặc các sản phẩm tách biệt thứ cấp khác có trong tự nhiên của loài được nêu ở đây. Các chủng tái tổ hợp có thể được tạo ra bằng các phương pháp bất kỳ đã biết rõ trong sinh học phân tử để biểu hiện các gen ngoại sinh hoặc để làm thay đổi chức năng hoặc sự biểu hiện của gen ngoại sinh. Theo một số phương án, chủng đột biến, biến dị hoặc tái tổ hợp sản xuất ra các axit béo omega-3, bao gồm DHA và/hoặc EPA, với lượng cao hơn so với chủng kiểu dại. Theo một số phương án, chủng đột biến, biến dị hoặc tái tổ hợp sản xuất ra lượng thấp hơn của một hoặc vài axit béo, ví dụ như các lượng thấp hơn của EPA, ARA, DPA n-6, hoặc của tổ hợp các axit này. Theo một số phương án, chủng đột biến, biến dị hoặc tái tổ hợp sản xuất ra trọng lượng tế bào khô trên mỗi lít dịch nuôi cấy cao hơn so với chủng kiểu dại. Các chủng đột biến, biến dị hoặc tái tổ hợp này là các ví dụ về các chủng có nguồn gốc từ thraustochytrid đã phân lập theo sáng chế.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chủng đột biến của thraustochytrid được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695. Theo các phương án tiếp, chủng đột biến là các chủng được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9696, PTA-9697 hoặc PTA-9698. Các chủng thraustochytrid liên quan với các số truy cập ATCC PTA-9696, PTA-9697 và PTA-9698 được lưu trữ theo Hiệp ước Budapest ngày 7 tháng 1 năm 2009 tại Trung tâm lưu trữ chủng giống chuẩn của Mỹ, kho lưu trữ vật liệu sáng chế, 10801 đại lộ University, Manassas, VA 20110-2209. Các chủng đột biến được lưu trữ này là các chủng bắt nguồn từ thraustochytrid được lưu trữ với số truy cập ATCC PTA-9695.

Theo một số phương án, thraustochytrid đã phân lập theo sáng chế, bao gồm các thể đột biến, các thể biến dị hoặc các thể tái tổ hợp của các vi sinh vật này, chứa thành phần axit béo trong một hoặc vài phân đoạn phân lập từ thraustochytrid đó. Một hoặc vài phân đoạn tách biệt từ thraustochytrid này bao gồm phân đoạn axit béo toàn phần, phân

đoạn các este sterol, phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, phân đoạn phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và các tổ hợp của các phân đoạn nêu trên.

Nuôi cấy thraustochytrid và các sinh khối thraustochytrid đã phân tách

Sáng chế còn đề cập đến việc nuôi cấy, bao gồm một hoặc vài thraustochytrid đã phân lập theo sáng chế. Các thông số lên men khác nhau để cấy, gây tăng trưởng và thu hồi hệ vi sinh vật là các thông số đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ như được nêu trong bằng sáng chế Mỹ số 5,130,242. Bất kỳ môi trường nuôi cấy thông thường nào để nuôi cấy các thraustochytrid đều có thể được sử dụng. Các môi trường nuôi cấy dạng lỏng hoặc dạng rắn có thể chứa nước biển tự nhiên hoặc nước biển nhân tạo. Các nguồn cho cacbon bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, glucoza, fructoza, xyloza, saccaroza, maltoza, tinh bột hoà tan được, nước rỉ đường, fucoza, glucosamin, dextran, mỡ, dầu béo, glyxerol, natri axetat và manitol. Các nguồn cho nitơ bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, pepton, chiết phẩm nấm men, polypepton, chiết phẩm mạch nha, chiết phẩm từ thịt, hỗn hợp các axit amin thu được từ thủy phân casein, nước mật ngô, các nguồn nitơ hữu cơ, natri glutamat, ure, các nguồn nitơ vô cơ, amoni axetat, amoni sulfat, amoni clorua, amoni nitrat. Các môi trường điển hình được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1: Các môi trường nuôi cấy trong bình

Thành phần	Nồng độ	Khoảng
NaCl	g/l 12,5	0-25, 5-20 hoặc 10-15
KCl	g/l 1,0	0-5, 0,25-3 hoặc 0,5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/l 5,0	0-10, 2-8 hoặc 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/l 0,6	0-10; 0,25-5 hoặc 0,5-3
CaCl ₂	g/l 0,29	0,1-5; 0,15-3 hoặc 0,2-1
T 154 (chiết phẩm nấm men)	g/l 6,0	0-20; 1-15 hoặc 5-10
KH ₂ PO ₄	g/l 1,2	0,1-10; 0,5-5 hoặc 1-3

Sau khi xử lý trong nồi hấp (Các kim loại)

Axit xitric	mg/l 3,5	0,1-100, 1-50 hoặc 2-25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/l 10,30	0,1-100, 1-50 hoặc 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/l 3,10	0,1-100, 1-50 hoặc 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/l 3,10	0,1-100, 1-50 hoặc 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/l 0,04	0,001-1, 0,005-0,5 hoặc 0,01-0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/l 0,04	0,001-1, 0,005-0,05 hoặc 0,01-0,1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/l 2,07	0,1-100, 0,5-50 hoặc 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	mg/l 2,07	0,1-100, 0,5-50 hoặc 1-25

Sau khi xử lý trong nồi hấp (Các vitamin)

Thiamin**	mg/l 9,75	0,1-100, 1-50 hoặc 5-25
Vitamin B12**	mg/l 0,16	0,1-100, 0,1-10 hoặc 0,1-1
Ca ^{1/2} -pantotenat**	mg/l 3,33	0,1-100, 0,1-50 hoặc 1-10

Sau khi xử lý trong nồi hấp (Nguồn cacbon)

Glucosa	g/l 30,0	5-150, 10-100 hoặc 20-50
---------	----------	--------------------------

Nguồn nitơ:

Thành phần	Nồng độ	
NH ₄ OH	ml/l 21,6	0-150, 10-100 hoặc 15-50

Các điều kiện nuôi cấy kiểu mẫu như sau:

Độ pH	khoảng 6,5 – 8,5, khoảng 6,5 – 8,0 hoặc khoảng 7,0 – 7,5
Nhiệt độ:	khoảng 17 - 30 độ Celsius, khoảng 20 - 25 độ Celsius hoặc khoảng 22 đến 23 độ Celsius
Oxy hoà tan:	tỷ lệ so với mức bão hoà khoảng 5 -100%, tỷ lệ so với mức bão hoà khoảng 10-80% hoặc tỷ lệ so với mức bão hoà khoảng 20 - 50%
Glucosa được kiểm soát	: khoảng 5-50 g/l, khoảng 10-40 g/l hoặc khoảng 20 - 35 g/l.

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy chứa ít nhất khoảng 5%, ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80% hoặc ít nhất khoảng 90% oxy hoà tan, tức tỷ lệ phần trăm so với mức bão hoà. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy chứa khoảng 5% đến 20%, khoảng 5% đến 50%, khoảng 5% đến 100%, khoảng 10% đến 20%, khoảng 10% đến 50%, khoảng 10% đến 100%, khoảng 20% đến 50% hoặc khoảng 20% đến 100% oxy hoàn tan, tức tỷ lệ phần trăm so với mức bão hoà.

Sáng chế còn đề cập đến sinh khối đã được phân tách của *thraustochytrid* theo sáng chế. Sinh khối đã được phân tách của *thraustochytrid* theo sáng chế là sinh khối tế bào thu hoạch được tạo ra bằng phương pháp thông thường bất kỳ để phân tách sinh khối *thraustochytrid*, như được nêu trong bằng sáng chế Mỹ số 5,130,242 và công bố đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ số 2002/0001833.

Theo một số phương án, trọng lượng tế bào khô của sinh khối được phân lập từ mỗi lít dịch nuôi cấy ít nhất là khoảng 50 g, ít nhất là khoảng 60 g, ít nhất là khoảng 70 g, ít nhất là khoảng 80 g, ít nhất là khoảng 100 g, ít nhất là khoảng 120 g, ít nhất là khoảng 140 g, ít nhất là khoảng 160 g, ít nhất là khoảng 180 g, hoặc ít nhất là khoảng 200 g sau khi nuôi cấy trong thời gian khoảng 7 ngày ở nhiệt độ khoảng từ 17°C đến 30°C trong môi

trường nuôi cấy có độ pH khoảng 6,5 đến 8,5, có chứa các nguồn cacbon, nitơ, các chất dinh dưỡng và khoảng 950 ppm đến 8.500 ppm ion clorua. Theo một số phương án, trọng lượng tế bào khô của sinh khối được phân lập từ mỗi lít dịch nuôi cấy ít nhất là khoảng 50 g, ít nhất là khoảng 60 g, ít nhất là khoảng 70 g, ít nhất là khoảng 80 g, ít nhất là khoảng 100 g, ít nhất là khoảng 120 g, ít nhất là khoảng 140 g, ít nhất là khoảng 160 g, ít nhất là khoảng 180 g, hoặc ít nhất là khoảng 200 g sau khi nuôi cấy trong thời gian khoảng 7 ngày ở nhiệt độ khoảng 17°C, ở nhiệt độ khoảng 18°C, ở nhiệt độ khoảng 19°C, ở nhiệt độ khoảng 20°C, ở nhiệt độ khoảng 21°C, ở nhiệt độ khoảng 22°C, ở nhiệt độ khoảng 23°C, ở nhiệt độ khoảng 24°C, ở nhiệt độ khoảng 25°C, ở nhiệt độ khoảng 26°C, ở nhiệt độ khoảng 27°C, ở nhiệt độ khoảng 28°C, ở nhiệt độ khoảng 29°C, đến 30°C trong môi trường nuôi cấy có độ pH khoảng 6,5, có độ pH khoảng 7, có độ pH khoảng 7,5, có độ pH khoảng 8,0, hoặc có độ pH khoảng 8,5, có chứa các nguồn cacbon, nitơ, các chất dinh dưỡng và khoảng 950 ppm đến 8.500 ppm ion clorua. Theo một số phương án, trọng lượng tế bào khô của sinh khối được phân lập từ mỗi lít dịch nuôi cấy là khoảng 50 g đến 200 g sau khi nuôi cấy trong thời gian khoảng 7 ngày ở nhiệt độ khoảng từ 17°C đến 30°C trong môi trường nuôi cấy có độ pH khoảng 6,5 đến 8,5, có chứa các nguồn cacbon, nitơ, các chất dinh dưỡng và khoảng 950 ppm đến 8.500 ppm ion clorua. Theo một số phương án, trọng lượng tế bào khô của sinh khối được phân lập từ mỗi lít dịch nuôi cấy là khoảng 50 g đến 200 g sau khi nuôi cấy trong thời gian khoảng 7 ngày ở nhiệt độ khoảng 17°C, khoảng 18°C, khoảng 19°C, khoảng 20°C, khoảng 21°C, khoảng 22°C, khoảng 23°C, khoảng 24°C, khoảng 25°C, khoảng 26°C, khoảng 27°C, khoảng 28°C, khoảng 29°C hoặc khoảng 30°C, trong môi trường nuôi cấy có độ pH khoảng 6,5, có độ pH khoảng 7, có độ pH khoảng 7,5, có độ pH khoảng 8,0, hoặc có độ pH khoảng 8,5, có chứa các nguồn cacbon, nitơ, các chất dinh dưỡng và khoảng 950 ppm đến 8.500 ppm ion clorua.

Theo một số phương án, việc nuôi cấy *thraustochytrid* đã phân lập có năng suất axit béo omega-3 ít nhất là khoảng 2 g/l/ngày, ít nhất là khoảng 4 g/l/ngày, hoặc ít nhất là khoảng 8 g/l/ngày, sau khi nuôi cấy trong thời gian khoảng 7 ngày ở nhiệt độ khoảng từ 17°C đến 30°C, trong môi trường nuôi cấy có độ pH khoảng 6,5 đến 8,5, có chứa các nguồn cacbon, nitơ, các chất dinh dưỡng và khoảng 950 ppm đến 8.500 ppm ion clorua. Theo một số phương án, việc nuôi cấy *thraustochytrid* đã phân lập có năng suất axit béo omega-3 khoảng từ 1 g/l/ngày đến 20 g/l/ngày, khoảng từ 2 g/l/ngày đến 15 g/l/ngày, khoảng từ 2 g/l/ngày đến 10 g/l/ngày, khoảng từ 3 g/l/ngày đến 10 g/l/ngày hoặc khoảng

từ 4 g/l/ngày đến 9 g/l/ngày, sau khi nuôi cấy trong thời gian khoảng 7 ngày ở nhiệt độ khoảng từ 17°C đến 30°C, trong môi trường nuôi cấy có độ pH khoảng 6,5 đến 8,5, có chứa các nguồn cacbon, nito, các chất dinh dưỡng và khoảng 950 ppm đến 8.500 ppm ion clorua.

Theo một số phương án, thể tích lên men (tức thể tích nuôi cấy) ít nhất là khoảng 2 lít, ít nhất là khoảng 10 lít, ít nhất là khoảng 50 lít, ít nhất là khoảng 100 lít, ít nhất là khoảng 200 lít, ít nhất là khoảng 500 lít, ít nhất là khoảng 1.000 lít, ít nhất là khoảng 10.000 lít, ít nhất là khoảng 20.000 lít, ít nhất là khoảng 50.000 lít, ít nhất là khoảng 100.000 lít, ít nhất là khoảng 150.000 lít, ít nhất là khoảng 200.000 lít, hoặc ít nhất là khoảng 250.000 lít. Theo một số phương án, thể tích lên men là khoảng 2 lít đến 300.000 lít, khoảng 2 lít, khoảng 10 lít, khoảng 50 lít, khoảng 100 lít, khoảng 200 lít, khoảng 500 lít, khoảng 1.000 lít, khoảng 10.000 lít, khoảng 20.000 lít, khoảng 50.000 lít, khoảng 100.000 lít, khoảng 150.000 lít, khoảng 200.000 lít, khoảng 250.000 lít hoặc khoảng 300.000 lít.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến sinh khối *thraustochytrid* đã phân tách chứa thành phần axit béo theo sáng chế. Theo một số phương án, ít nhất có khoảng 50%, ít nhất có khoảng 60%, ít nhất có khoảng 70%, ít nhất có khoảng 80% trọng lượng tế bào khô của sinh khối là các axit béo. Theo một số phương án, có khoảng trên 50%, khoảng trên 55%, hoặc khoảng trên 60% trọng lượng tế bào khô của sinh khối là các axit béo. Theo một số phương án, có khoảng từ 50% đến 60%, khoảng từ 50% đến 70%, khoảng từ 50% đến 80%, khoảng từ 55% đến 70%, khoảng từ 55% đến 80%, khoảng từ 60% đến 70% hoặc khoảng từ 60% đến 80% theo trọng lượng của trọng lượng tế bào khô của sinh khối là các axit béo. Theo một số phương án, sinh khối có chứa ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70% hoặc ít nhất khoảng 80% theo trọng lượng các axit béo là của các axit béo omega-3. Theo một số phương án, sinh khối có chứa khoảng từ 50% đến 60%, khoảng từ 50% đến 70%, khoảng từ 50% đến 80% theo trọng lượng của các axit béo là các axit béo omega-3. Theo một số phương án, sinh khối có chứa ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 55%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75% hoặc ít nhất khoảng 80% theo trọng lượng các axit béo là của DHA. Theo một số phương án, sinh khối có chứa khoảng 50% đến 60%, ít nhất khoảng 50% đến 70% hoặc ít nhất khoảng 50% đến 80% theo trọng lượng các axit béo là của DHA. Theo một số phương án, ít nhất có khoảng 25%, ít nhất có khoảng 30%, ít nhất

có khoảng 40%, ít nhất có khoảng 50% hoặc ít nhất có khoảng 60% trọng lượng tế bào khô của sinh khối là của axit docosaehexaenoic. Theo một số phương án, có khoảng 25% đến 65%, khoảng 25% đến 50%, khoảng 30% đến 40% hoặc khoảng 25% đến 35% trọng lượng tế bào khô của sinh khối là của axit docosaehexaenoic. Theo một số phương án, sinh khối chứa khoảng 10% hoặc ít hơn, khoảng 9% hoặc ít hơn, khoảng 8% hoặc ít hơn, khoảng 7% hoặc ít hơn, khoảng 6% hoặc ít hơn, khoảng 5% hoặc ít hơn, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, khoảng 2% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 1% hoặc ít hơn tính theo trọng lượng các axit béo là của EPA. Theo một số phương án, sinh khối chứa khoảng 1% đến 10%, khoảng 1% đến 5%, khoảng 2% đến 5%, khoảng 3% đến 5%, hoặc khoảng 3% đến 10% tính theo trọng lượng các axit béo là của EPA. Theo một số phương án, về cơ bản sinh khối không chứa EPA. Theo một số phương án, sinh khối có tỷ lệ theo trọng lượng của DHA so với 14 EPA ít nhất là khoảng 5:1, ít nhất là khoảng 7:1, ít nhất là khoảng 10:1, ít nhất là khoảng 11:1, ít nhất là khoảng 14:1, ít nhất là khoảng 15:1, ít nhất là khoảng 17:1, ít nhất là khoảng 20:1, ít nhất là khoảng 25:1, ít nhất là khoảng 50:1, hoặc ít nhất là khoảng 100:1, trong đó sinh khối chứa khoảng 10% hoặc ít hơn trọng lượng các axit béo là của EPA. Theo một số phương án, sinh khối chứa khoảng 0,1% đến 0,2%, khoảng 0,1% đến 0,3%, khoảng 0,1% đến 0,4%, khoảng 0,1% đến 0,5% hoặc khoảng 0,1% đến 1,5% trọng lượng các axit béo là của ARA. Theo một số phương án, sinh khối chứa khoảng 1,5% hoặc ít hơn, khoảng 1% hoặc ít hơn, khoảng 0,5% hoặc ít hơn, khoảng 0,4% hoặc ít hơn, khoảng 0,3% hoặc ít hơn, khoảng 0,2 % hoặc ít hơn, hoặc khoảng 0,1% hoặc ít hơn trọng lượng các axit béo là của ARA. Theo một số phương án, về cơ bản sinh khối không chứa ARA. Theo một số phương án, sinh khối có tỷ lệ theo trọng lượng của DHA so với ARA ít nhất là khoảng 20:1, ít nhất là khoảng 40:1, ít nhất là khoảng 60:1, ít nhất là khoảng 80:1, ít nhất là khoảng 100:1, ít nhất là khoảng 150:1, ít nhất là khoảng 200:1, ít nhất là khoảng 250:1, hoặc ít nhất là khoảng 300:1. Theo một số phương án, sinh khối chứa khoảng 0,5% đến 1%, khoảng 0,5% đến 2%, khoảng 0,5% đến 5%, khoảng 0,5% đến 6%, khoảng 1% đến 5%, khoảng 1% đến 6%, khoảng 2% đến 5%, hoặc khoảng 2% đến 6% trọng lượng các axit béo là của DPA n- 6. Theo một số phương án, sinh khối chứa khoảng 6% hoặc ít hơn, khoảng 5% hoặc ít hơn, khoảng 2 % hoặc ít hơn, khoảng 1% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 0,5% hoặc ít hơn trọng lượng các axit béo là của DPA n-6. Theo một số phương án, về cơ bản sinh khối không chứa DPA n-6. Theo một số phương án, sinh khối có tỷ lệ theo trọng lượng của DHA so với DPA n-6 khoảng lớn hơn 6:1, ít nhất

là khoảng 8:1, ít nhất là khoảng 10:1, ít nhất là khoảng 15:1, ít nhất là khoảng 20:1, ít nhất là khoảng 25:1, ít nhất là khoảng 50:1, hoặc ít nhất là khoảng 100:1. Theo một số phương án, sinh khối chứa các axit béo với hàm lượng khoảng 5% hoặc ít hơn, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 2% hoặc ít hơn, tính theo trọng lượng từng axit trong các axit: axit linoleic (18:2 n-6), axit linolenic (18:3 n-3), axit eicosenoic (20:1 n-9) và axit eruxic (22:1 n-9).

Các đặc tính của sinh khối đã được phân tách theo sáng chế có liên quan với các tính chất nội sinh và các tính chất tự nhiên của sinh khối đã tách biệt mà không có liên quan với các vật liệu từ bên ngoài đưa vào.

Các dầu vi sinh vật

Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp sản xuất các dầu vi sinh vật. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy *thraustochyrid* theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy để tạo ra sinh khối và chiết dầu chứa các axit béo omega-3 từ sinh khối này. Có thể chiết dầu này từ sinh khối vừa mới thu hoạch hoặc chiết từ sinh khối đã thu hoạch từ trước, được bảo quản trong điều kiện ngăn ngừa sự hư hỏng. Có thể sử dụng các phương pháp đã biết để nuôi cấy *thraustochyrid* theo sáng chế, để tách biệt sinh khối từ dịch nuôi cấy, để chiết lấy dầu vi sinh vật từ sinh khối này và để phân tích thành phần axit béo của các dầu chiết từ sinh khối (chẳng hạn, xem bằng sáng chế Mỹ số 5,130,242).

Sáng chế còn đề cập đến dầu vi sinh vật có chứa thành phần axit béo theo sáng chế. Dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể là dầu bất kỳ có nguồn gốc từ vi sinh vật, chẳng hạn bao gồm: dầu còn thô được chiết xuất từ sinh khối vi sinh vật, không cần chế biến tiếp; dầu đã tinh luyện, thu được bằng cách xử lý dầu vi sinh vật thô theo các bước tiếp, như tinh luyện, tẩy trắng và/hoặc khử mùi; dầu vi sinh vật được pha loãng, thu được bằng cách pha loãng dầu vi sinh vật còn thô hoặc đã tinh luyện; hoặc dầu đã được làm giàu, chẳng hạn như thu được bằng cách xử lý dầu vi sinh vật còn thô hoặc đã tinh luyện bằng các phương pháp tinh chế tiếp để làm tăng nồng độ axit béo (ví dụ như DHA) trong dầu.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn các este sterol với hàm lượng khoảng 0%, ít nhất là khoảng 0,1%, ít nhất là khoảng 0,2%, ít nhất là khoảng 0,5%, ít nhất là khoảng 1%, ít nhất là khoảng 1,5%, ít nhất là khoảng 2% hoặc ít nhất là khoảng 5% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn các este sterol với hàm lượng khoảng từ 0% đến 1,5%, khoảng từ 0% đến 2%, khoảng từ 0%

đến 5%, khoảng từ 1% đến 1,5%, khoảng từ 0,2% đến 1,5%, khoảng từ 0,2% đến 2%, hoặc khoảng từ 0,2% đến 5% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn các este sterol với hàm lượng khoảng dưới 5%, khoảng dưới 4%, khoảng dưới 3%, hoặc khoảng dưới 2% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit với hàm lượng ít nhất là khoảng 65%, ít nhất là khoảng 70%, ít nhất là khoảng 75%, ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 85%, hoặc ít nhất là khoảng 90% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit với hàm lượng khoảng từ 65% đến 95%, khoảng từ 75% đến 95%, hoặc khoảng từ 80% đến 95% theo trọng lượng, hoặc là khoảng 97% tính theo trọng lượng, hay 98% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn axit béo tự do với hàm lượng ít nhất là khoảng 0,5%, ít nhất là khoảng 1%, ít nhất là khoảng 1,5%, ít nhất là khoảng 2%, ít nhất là khoảng 2,5%, hoặc ít nhất là khoảng 5% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn axit béo tự do với hàm lượng khoảng từ 0,5% đến 5%, khoảng từ 0,5% đến 2,5%, khoảng từ 0,5% đến 2%, khoảng từ 0,5% đến 1,5%, khoảng từ 0,5% đến 1%, khoảng từ 1% đến 2,5%, khoảng từ 1% đến 5%, khoảng từ 1,5% đến 2,5%, khoảng từ 2% đến 2,5%, hoặc khoảng từ 2% đến 5% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn các axit béo tự do với hàm lượng khoảng dưới 5%, khoảng dưới 4%, khoảng dưới 3%, khoảng dưới 2%, hoặc khoảng dưới 1% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn sterol với hàm lượng ít nhất là khoảng 0,5%, ít nhất là khoảng 1%, ít nhất là khoảng 1,5%, ít nhất là khoảng 2%, hoặc ít nhất là khoảng 5% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn sterol với hàm lượng khoảng từ 0,5% đến 1,5%, khoảng từ 1% đến 1,5%, khoảng từ 0,5% đến 2%, khoảng từ 0,5% đến 5%, khoảng từ 1% đến 2%, hoặc khoảng từ 1% đến 5% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn sterol với hàm lượng khoảng dưới 5%, khoảng dưới 4%, khoảng dưới 3%, khoảng dưới 2%, hoặc khoảng dưới 1% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn diglyxerit với hàm lượng ít nhất là khoảng 1,5%, ít nhất là khoảng 2%, ít nhất là khoảng 2,5%, ít nhất là khoảng 3%, ít nhất là khoảng 3,5%, hoặc ít nhất là khoảng 5% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn diglyxerit với hàm lượng khoảng từ 1,5% đến 3%, khoảng từ 2% đến 3%, khoảng từ 1,5% đến 3,5%, khoảng từ 1,5% đến 5%, khoảng từ 2,5% đến 3%, khoảng từ 2,5% đến 3,5%, hoặc

khoảng từ 2,5% đến 5% tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa các chất không thể xà phòng hoá, với hàm lượng khoảng dưới 2%, khoảng dưới 1,5%, khoảng dưới 1%, hoặc khoảng dưới 0,5% trọng lượng của dầu. Các loại lipit có trong dầu vi sinh vật, ví dụ như phân đoạn triglyxerit, có thể được chia tách bằng phương pháp sắc ký nhanh và phân tích bằng sắc ký lớp mỏng (TLC), hoặc chia tách và phân tích bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, chứa ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 45%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 55%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, hoặc ít nhất khoảng 80% theo trọng lượng là DHA. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, chứa khoảng từ 40% đến 45%, chứa khoảng từ 40% đến 50%, chứa khoảng từ 40% đến 60%, chứa khoảng từ 50% đến 60%, chứa khoảng từ 55% đến 60%, chứa khoảng từ 40% đến 65%, chứa khoảng từ 50% đến 65%, chứa khoảng từ 55% đến 65%, chứa khoảng từ 40% đến 70%, chứa khoảng từ 40% đến 80%, chứa khoảng từ 50% đến 80%, khoảng từ 55% đến 80%, khoảng từ 60% đến 80%, hoặc khoảng từ 70% đến 80% tính theo trọng lượng là DHA. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn các este sterol, mà phân đoạn này chứa khoảng 45% hoặc ít hơn, khoảng 40% hoặc ít hơn, khoảng 35% hoặc ít hơn, khoảng 30% hoặc ít hơn, khoảng 25% hoặc ít hơn, khoảng 20% hoặc ít hơn, khoảng 15% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 13% hoặc ít hơn DHA tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, chứa khoảng 10% hoặc ít hơn, khoảng 9% hoặc ít hơn, khoảng 8% hoặc ít hơn, khoảng 7% hoặc ít hơn, khoảng 6% hoặc ít hơn, khoảng 5% hoặc ít hơn, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, khoảng 2% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 1% hoặc ít hơn EPA tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, chứa khoảng từ 2% đến 3%, khoảng từ 2% đến 3,5%, khoảng từ 2,5% đến 3,5%, khoảng từ 2% đến 6%,

khoảng từ 2,5% đến 6%, khoảng từ 3,0% đến 6%, khoảng từ 3,5% đến 6%, khoảng từ 5% đến 6%, hoặc khoảng từ 2% đến 10% EPA tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, về cơ bản không chứa EPA. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, có tỷ lệ theo trọng lượng của DHA so với EPA ít nhất là khoảng 5:1, ít nhất là khoảng 7:1, ít nhất là khoảng 9:1, ít nhất là khoảng 10:1, ít nhất là khoảng 15:1, ít nhất là khoảng 20:1, ít nhất là khoảng 25:1, ít nhất là khoảng 30:1, hoặc ít nhất là khoảng 50:1, trong đó dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn nêu trên chứa 10% hoặc ít hơn EPA tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, có tỷ lệ theo trọng lượng của DHA so với EPA ít nhất là khoảng 5:1, nhưng vào khoảng thấp hơn 20:1. Theo một số phương án, tỷ lệ theo trọng lượng của DHA so với EPA là khoảng từ 5:1 đến 18:1, khoảng từ 7:1 đến 16:1, hoặc khoảng từ 10:1 đến 15:1. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, chứa khoảng từ 0,1% đến 0,25%, khoảng từ 0,2% đến 0,25%, khoảng từ 0,1% đến 0,5%, hoặc khoảng từ 0,1% đến 1,5% ARA theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, chứa khoảng 1,5% hoặc ít hơn, khoảng 1% hoặc ít hơn, khoảng 0,5% hoặc ít hơn, khoảng 0,2% hoặc ít hơn, khoảng 0,1% hoặc ít hơn ARA theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn

triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, về cơ bản không chứa ARA. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, có tỷ lệ theo trọng lượng DHA so với ARA ít nhất là khoảng 20:1, ít nhất là khoảng 30:1, ít nhất là khoảng 35:1, ít nhất là khoảng 40:1, ít nhất là khoảng 60:1, ít nhất là khoảng 80:1, ít nhất là khoảng 100:1, ít nhất là khoảng 150:1, ít nhất là khoảng 200:1, ít nhất là khoảng 250:1, hoặc ít nhất là khoảng 300:1. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, chứa khoảng từ 0,5% đến 1%, khoảng từ 0,5% đến 2%, khoảng từ 0,5% đến 2,5%, khoảng từ 0,5% đến 3%, khoảng từ 0,5% đến 3,5%, khoảng từ 0,5% đến 5%, khoảng từ 0,5% đến 6%, khoảng từ 1% đến 2%, khoảng từ 2% đến 3%, khoảng từ 2% đến 3,5%, khoảng từ 1% đến 2,5%, khoảng từ 1% đến 3%, khoảng từ 1% đến 3,5%, khoảng từ 1% đến 5%, hoặc khoảng từ 1% đến 6% DPA n-6 tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, chứa khoảng 6% hoặc ít hơn, khoảng 5% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, khoảng 2,5% hoặc ít hơn, khoảng 2% hoặc ít hơn, khoảng 1% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 0,5% hoặc ít hơn DPA n-6 tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, về cơ bản không chứa DPA n-6. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, có tỷ lệ theo trọng lượng của DHA so

với DPA n-6 khoảng lớn hơn 6:1, ít nhất là khoảng 8:1, ít nhất là khoảng 10:1, ít nhất là khoảng 15:1, ít nhất là khoảng 20:1, ít nhất là khoảng 25:1, ít nhất là khoảng 50:1, hoặc ít nhất là khoảng 100:1. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axil béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, chứa khoảng 5% hoặc ít hơn, chứa khoảng 4% hoặc ít hơn, chứa khoảng 3% hoặc ít hơn, chứa khoảng 2% hoặc ít hơn, chứa khoảng 1,5% hoặc ít hơn, chứa khoảng 1% hoặc ít hơn, hoặc chứa khoảng 0,5% hoặc ít hơn theo trọng lượng mỗi axit trong các axit: linoleic (18:2 n-6), linolenic (18:3 n-3), eicosenoic (20:1 11-9) và eruxic (22:1 n-9). Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này, được chọn từ phân đoạn các este sterol, phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, phân đoạn các chất phân cực (bao gồm phân đoạn phospholipit) và tổ hợp của các phân đoạn nêu trên, chứa khoảng 5% hoặc ít hơn, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, khoảng 2% hoặc ít hơn, khoảng 1,5% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 1% hoặc ít hơn axit heptadecanoic (17:0) tính theo trọng lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc vài phân đoạn của dầu này chứa khoảng từ 0,01% đến 5%, khoảng từ 0,05% đến 3%, hoặc khoảng từ 0,1% đến 1% axit heptadecanoic tính theo trọng lượng.

Phân tử triglyxerit chứa 3 nguyên tử cacbon nằm giữa ($Q_{sn-1}H_2R_1-C_{sn-2}HR_2-C_{sn-3}H_2R_3$), cho phép tạo ra các đồng phân vị trí khác nhau. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit mà trong đó ít nhất có khoảng 20%, ít nhất có khoảng 30%, ít nhất có khoảng 35%, hoặc ít nhất có khoảng 40% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit chứa DHA ở hai vị trí trong triglyxerit (được thể DHA ở hai vị trí); hai vị trí này được chọn là hai vị trí bất kỳ trong các vị trí *sn-1*, *sn-2* và *sn-3* và được xác định dựa trên phần trăm diện tích tương đối của các đỉnh trên sắc ký đồ HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit mà trong đó có khoảng từ 20% đến 40%, có khoảng từ 20% đến 35%, có khoảng từ 30% đến 40%, hoặc có khoảng từ 30% đến 35% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit chứa DHA ở hai vị trí trong triglyxerit được chọn là hai vị trí bất kỳ trong các vị trí *sn-1*, *sn-2* và *sn-3* và được xác định dựa trên phần trăm diện tích tương đối của các đỉnh trên sắc ký đồ HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit mà trong đó ít nhất có khoảng 5%, ít nhất có khoảng 10%, ít nhất có khoảng 15%, hoặc ít nhất có khoảng 20% các triglyxerit

trong phân đoạn triglyxerit chứa DHA ở tất cả các vị trí *sn-1*, *sn-2* và *sn-3* (được thể DHA ở ba vị trí), như được xác định dựa trên phần trăm diện tích tương đối của các đỉnh trên sắc ký đồ HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit mà trong đó có khoảng từ 5% đến 20%, có khoảng từ 5% đến 15%, có khoảng từ 10% đến 20%, hoặc có khoảng từ 10% đến 15% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit chứa DHA ở tất cả các vị trí *sn-1*, *sn-2* và *sn-3*, như được xác định dựa trên phần trăm diện tích tương đối của các đỉnh trên sắc ký đồ HPLC. Trái lại, loại hợp chất TAG (triacylglycerol) được thông báo trong bằng sáng chế Mỹ số 6,582,941 không chứa DHA ở tất cả ba vị trí đã nêu. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit mà trong đó ít nhất có khoảng 50%, ít nhất có khoảng 55%, ít nhất có khoảng 60%, ít nhất có khoảng 65%, ít nhất có khoảng 70%, hoặc ít nhất có khoảng 75% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit chứa DHA ở một vị trí được chọn là một vị trí bất kỳ trong các vị trí *sn-1*, *sn-2* và *sn-3*, như được xác định dựa trên phần trăm diện tích tương đối của các đỉnh trên sắc ký đồ HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit mà trong đó có khoảng từ 50% đến 75%, có khoảng từ 50% đến 70%, có khoảng từ 50% đến 65%, có khoảng từ 60% đến 75%, có khoảng từ 60% đến 70%, hoặc có khoảng từ 60% đến 65% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit chứa DHA ở một vị trí trong triglyxerit được chọn là một vị trí bất kỳ trong các vị trí *sn-1*, *sn-2* và *sn-3*, như được xác định dựa trên phần trăm diện tích tương đối của các đỉnh trên sắc ký đồ HPLC.

Các chế phẩm

Sáng chế còn đề cập đến các chế phẩm chứa thraustochytrid theo sáng chế, sinh khối đã tách biệt theo sáng chế, dầu vi sinh vật theo sáng chế hoặc tổ hợp của các đối tượng nêu trên.

Thraustochytrid, sinh khối, dầu vi sinh vật theo sáng chế còn có thể tiếp tục được cải biến hoặc xử lý hoá học, hoặc xử lý vật lý, dựa theo yêu cầu đối với chế phẩm đó bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết.

Các tế bào hoặc các sinh khối thraustochytrid có thể được làm khô trước khi sử dụng trong chế phẩm bằng các phương pháp, bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là: làm đông khô, hong khô, sấy phun, sấy khô theo đường ống, làm khô (làm đông khô) trong chân không hoặc quy trình tương tự. Hay theo cách khác, sinh khối đã thu hoạch và đã rửa có thể được sử dụng trực tiếp trong hợp phần mà không làm khô (xem các bằng sáng chế Mỹ số 5,130,242 và 6,812,009).

Các dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể được sử dụng làm vật liệu dầu để sản xuất có hiệu quả hơn sản phẩm giàu axit béo, ví dụ như dầu DHA. Chẳng hạn, các dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể được xử lý bằng các kỹ thuật tinh chế khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như cất hoặc cho thêm ure, để tạo ra sản phẩm có hiệu lực cao hơn, với nồng độ cao hơn của DHA hoặc của axit béo khác. Các dầu vi sinh vật theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong các phản ứng hoá học để sản xuất ra các hợp chất dẫn xuất từ các axit béo có trong các dầu đó, ví dụ như các este và các muối của DHA hoặc của một axit béo khác.

Chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc vài tá chất. Theo như được sử dụng ở đây, “tá chất” chỉ cấu phần hoặc hỗn hợp các cấu phần được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế để đưa lại các đặc tính mong muốn cho chế phẩm đó, bao gồm các chế phẩm là thực phẩm, cũng như dược phẩm, mỹ phẩm và chế phẩm công nghiệp. Tá chất theo sáng chế có thể được gọi là tá chất “dược dụng” (tức tá dược) khi được thêm vào dược phẩm, có nghĩa là tá chất đó là hợp chất, vật liệu, chế phẩm, muối và/hoặc dạng liều, mà theo óc suy xét chắc chắn của thầy thuốc là thích hợp để cho tiếp xúc với các mô của cơ thể người và động vật mà không gây độc thái quá, không gây kích ứng, dị ứng hoặc các biến chứng phiền toái khác trong khoảng thời gian tiếp xúc mong muốn tương xứng với tỷ lệ hợp lý ích lợi/rủi ro. Theo một số phương án, thuật ngữ “dược dụng” có nghĩa là đã được phê chuẩn bởi cơ quan quản lý của chính phủ liên bang hoặc bang, hoặc được liệt kê trong Dược điển Mỹ hoặc trong dược điển quốc tế khác đã được thừa nhận rộng rãi để sử dụng ở động vật và, đặc biệt hơn, ở người. Có thể sử dụng các tá dược khác nhau. Theo một số phương án, tá dược có thể là, nhưng không phải chỉ giới hạn là, tác nhân kiềm, tác nhân ổn định, chất chống oxy hoá, tác nhân gây bám dính, tác nhân gây phân ly, tác nhân bao bọc, cấu phần pha ngoài, cấu phần giúp giải phóng thuốc có kiểm soát, dung môi, chất hoạt động bề mặt, chất làm ẩm, tác nhân đệm, chất độn, chất làm dịu da hoặc tổ hợp của các chất vừa nêu. Ngoài các tá dược được nêu ở đây, các tá dược còn được dẫn ra, mặc dù không phải chỉ giới hạn, trong cuốn *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st ed. (2005). Việc phân loại cụ thể tá dược ở đây (chẳng hạn như “dung môi”) là nhằm minh họa mà không giới hạn vai trò của tá dược. Một tá dược cụ thể có thể thuộc vào nhiều loại.

Các chế phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, các chế phẩm là thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm và chế phẩm công nghiệp.

Theo một số phương án, chế phẩm là thực phẩm. Thực phẩm này là thực phẩm bất kỳ dành cho động vật hoặc người và bao gồm cả chế phẩm dưới dạng rắn và dưới dạng lỏng. Thực phẩm có thể là phụ gia cho thực phẩm của động vật hoặc người. Các thực phẩm này bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, các thực phẩm thông thường; các thực phẩm lỏng, bao gồm sữa, đồ uống, các đồ uống có tác dụng điều trị và các đồ uống bổ dưỡng; các thực phẩm chức năng; các thực phẩm bổ sung; các thực phẩm bảo vệ sức khỏe; các thực phẩm công thức cho trẻ nhỏ, bao gồm các sữa công thức cho trẻ đẻ non; các thực phẩm cho phụ nữ mang thai hoặc cho con bú; các thực phẩm cho người lớn; các thực phẩm cho người già; các thực phẩm cho động vật.

Theo một số phương án, thraustochytrid, sinh khối hoặc dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể được sử dụng trực tiếp dưới dạng phụ gia hoặc được đưa vào dưới dạng phụ gia thuộc một hoặc vài thứ như sau: dầu, mỡ pha vào bánh, bơ để phết lên bánh, thành phần béo khác, đồ uống, nước sốt, thực phẩm trên cơ sở bơ sữa hoặc trên cơ sở đậu tương (như sữa, sữa chua, phomat và kem giải khát), sản phẩm nướng lò, sản phẩm bổ dưỡng, chẳng hạn như sản phẩm bổ sung dinh dưỡng (dưới dạng viên nang hoặc viên nén), bổ sung vitamin, bổ sung chế độ ăn, đồ uống dưới dạng bột để pha, thực phẩm dạng bột thành phẩm hoặc bán thành phẩm, và tổ hợp của các đối tượng nêu trên.

Danh sách không đầy đủ các chế phẩm thực phẩm, mà có thể bao gồm dầu vi sinh vật theo sáng chế bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, các sản phẩm trên cơ sở đậu tương (sữa, kem giải khát, sữa chua, đồ uống, kem phết, bơ phết, các chất làm trắng thực phẩm); súp và các thứ hỗn hợp để làm súp; bột nhào, bột nhào làm bánh và các thứ thực phẩm nướng lò, bao gồm chẳng hạn như đồ nướng cao cấp, đồ ngũ cốc điểm tâm, bánh ngọt, bánh kem, bánh nướng, bánh nướng nhỏ, bánh bao, bánh mì dài, bánh mì, ổ bánh mì nhỏ, bánh quy, bánh nướng xốp, bánh nướng mềm, bánh mì nướng để ăn súp, bánh quy giòn, đồ ngọt, bánh ăn nhanh, đồ nướng giòn điểm tâm/bánh điểm tâm dạng lát nhỏ và bánh nướng lò điện; kẹo; mứt kẹo cứng; sôcôla và các thứ mứt kẹo khác; kẹo cao-su; các thực phẩm lỏng ví dụ như sữa, đồ uống giàu năng lượng, thực phẩm công thức cho trẻ nhỏ, nước uống sô-đa, trà, thức ăn lỏng, nước hoa quả, đồ uống trên cơ sở hoa quả, đồ uống trên cơ sở thực vật; các sirô đa sinh tố, các sản phẩm thay thế bữa ăn, các thực phẩm thuốc và các thứ si-rô; các hỗn hợp đồ uống dạng bột; các thứ bột nhào; các sản phẩm cá đã qua chế biến; các sản phẩm thịt đã qua chế biến; các sản phẩm thịt gia cầm đã qua chế biến; nước hầm thịt và các thứ nước xốt; các đồ gia vị (nước xốt cà chua nấm, mai-ô-ne,

v.v...); các thứ thực phẩm phết trên cơ sở dầu thực vật; các sản phẩm bơ sữa; sữa chua; các thứ bơ; các sản phẩm bơ sữa đông lạnh; kem giải khát; các món tráng miệng đông lạnh; các thứ sữa chua đông lạnh; các thực phẩm dạng sền sệt như thực phẩm cho trẻ thơ; các thứ bánh priding và các món tráng miệng có gelatin; phomat đã qua chế biến và chưa qua chế biến; các hỗn hợp để làm bánh kẹp; các bánh dạng thỏi dài bao gồm dạng giàu năng lượng; các hỗn hợp để làm bánh quế; các đồ gia vị cho salad; các hỗn hợp thay thế trứng; các thứ đồ phết chứa nhân hạt và trên cơ sở nhân hạt; các đồ tráng miệng có muối như khoai tây chiên lát và các lát chiên hoặc chiên giòn khác, ngô chiên, bánh ngô chiên, đồ ăn nhanh ép, bỏng ngô, bánh quy xoắn, khoai tây chiên và các thứ nhân quả hạch; các món ăn nhanh đặc biệt như các thứ nước dầm, các món quả khô để ăn nhanh, các món thịt ăn nhanh, lớp vỏ cứng thịt lợn xông khói, các thỏi thực phẩm bồi dưỡng sức khoẻ và các thứ bánh gạo hoặc ngô.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể được sử dụng bổ sung vào thực phẩm công thức cho trẻ nhỏ. Thực phẩm công thức cho trẻ nhỏ có thể được bổ sung chỉ bằng riêng dầu vi sinh vật theo sáng chế hoặc có phối hợp với dầu đã tinh luyện bằng phương pháp vật lý có nguồn gốc từ vi sinh vật sản xuất ra axit arachidonic (ARA). Ví dụ về vi sinh vật sản xuất ra ARA là *Mortierella alpina* hoặc *Mortierella* sect. *schmuckeri*. Nói cách khác, các thực phẩm công thức cho trẻ nhỏ có thể được bổ sung bằng dầu vi sinh vật theo sáng chế, phối hợp với một dầu giàu ARA, bao gồm ARASCO® (Martek Biosciences, Columbia, MD).

Theo một số phương án, chế phẩm là thức ăn cho động vật. “Động vật” có nghĩa là bất kỳ sinh vật nào không phải là người, thuộc giới Động vật, và bao gồm, không giới hạn, các động vật thủy sinh và các động vật ở cạn. Thuật ngữ “thức ăn cho động vật” chỉ bất kỳ thực phẩm nào nhằm giành cho các động vật không phải là người: cho cá; cá thương mại; cá cảnh; cá bột; các động vật thân mềm hai mảnh vỏ; động vật nhuyễn thể; động vật giáp xác; động vật trai-sò; tôm; ấu trùng tôm; trùng muối; các vi sinh vật dạng vành; động vật ăn qua lọc; động vật lưỡng cư; động vật bò sát; động vật có vú; gia súc; động vật cày kéo; động vật vườn bách thú; động vật thể thao; động vật nhân giống; động vật đua; động vật trình diễn; động vật quý hiếm cần bảo vệ; động vật hiếm và có nguy cơ tuyệt chủng; động vật kèm đôi; động vật nuôi làm cảnh như chó, mèo, chuột lang, thỏ, chuột thân lớn, chuột nhắt hoặc ngựa; các động vật linh trưởng, như khỉ (chẳng hạn khỉ cebus, khỉ rhesus, khỉ mặt xanh lá châu Phi, khỉ patas, khỉ ăn cua và khỉ đuôi dài), khỉ

không đuôi, đuôi uoi, khỉ mõm chó, vượn và hắc tinh tinh; các động vật họ chó như chó nhà và chó sói; các động vật họ mèo như mèo, sư tử và hổ; các động vật họ ngựa như ngựa, lừa và ngựa vằn; các động vật nuôi lấy thịt hoặc sữa như bò, trâu, lợn và cừu; các động vật móng guốc như hươu và hươu cao cổ; các động vật gặm nhấm như chuột nhắt, chuột thân lớn, chuột túi má và chuột lang; v.v... Thức ăn cho động vật bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, thức ăn trong nuôi trồng thủy sản, thức ăn cho gia súc, bao gồm thức ăn cho động vật nuôi làm cảnh; thức ăn cho động vật vườn bách thú, thức ăn cho động vật cày kéo, thức ăn cho động vật nuôi hoặc tổ hợp các thức ăn này.

Theo một số phương án, chế phẩm là thức ăn hoặc bổ sung thức ăn cho bất kỳ động vật nào mà thịt hoặc các sản phẩm từ động vật đó được tiêu thụ bởi người, ví dụ như động vật mà từ đó thịt, trứng hoặc sữa được lấy để cho người tiêu thụ. Khi cho các động vật như vậy ăn, thì các chất dinh dưỡng như các axit béo đa không no mạch dài có thể được chuyển vào thịt, sữa, trứng hoặc các sản phẩm khác của các động vật đó để làm tăng hàm lượng các chất dinh dưỡng này trong các sản phẩm vừa nêu.

Theo một số phương án, chế phẩm là vật liệu sấy phun có thể bẻ vụn để tạo ra các hạt có kích thước thích hợp làm thức ăn cho các động vật nổi, trùng muối, vi sinh vật dạng vành và các động vật ăn qua lọc. Theo một số phương án, động vật nổi, trùng muối hoặc vi sinh vật dạng vành được cho ăn chế phẩm nêu trên, và các động vật này lại là thức ăn cho cá bột, động vật vỏ giáp, động vật nhuyễn thể hai nắp vỏ hoặc động vật tôm-cua.

Theo một số phương án, chế phẩm là dược phẩm. Các dược phẩm thích hợp bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, dược phẩm chống viêm, thuốc điều trị bệnh tim động mạch vành, thuốc điều trị bệnh xơ cứng động mạch, tác nhân hoá trị liệu, tá dược hoạt động, thuốc điều trị bệnh loãng xương, thuốc chống trầm cảm, thuốc giải co thắt, thuốc kháng *Helicobacter pylori*, thuốc điều trị bệnh thoái hoá thần kinh, thuốc điều trị bệnh thoái hoá gan, thuốc kháng sinh, thuốc hạ thấp lượng cholesterol và thuốc hạ thấp lượng triglycerit. Theo một số phương án, chế phẩm nêu trên là thực phẩm điều trị. Thực phẩm điều trị bao gồm thực phẩm nằm trong chế phẩm ăn vào hoặc được dùng theo đường dùng ngoài dưới sự giám sát của thầy thuốc và nhằm quản lý bệnh bằng chế độ ăn đặc biệt, mà đối với bệnh đó thì các yêu cầu đặc biệt về dinh dưỡng đã được đánh giá về phương diện y học dựa trên các nguyên lý khoa học đã được thừa nhận.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật có thể được bào chế thành dạng liều. Các dạng liều có thể bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, viên nén, viên nang, viên

nhện, viên nhỏ, viên tròn nhỏ, thuốc dạng bột và thuốc dạng cốm, cũng như các dạng liều dùng theo đường ngoài đường tiêu hoá, bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, các dung dịch, các huyền phù, các nhũ tương và các bột khô chứa lượng có hiệu lực của dầu vi sinh vật. Trong lĩnh vực kỹ thuật này người ta cũng đã biết rằng, các dạng bào chế như vậy cũng có thể chứa các vật liệu được dùng như vật liệu pha loãng, vật liệu độn, tác nhân gây rã thuốc, tác nhân kết dính, tác nhân làm trơn, chất hoạt động bề mặt, tá dược kỵ nước, tá dược tan được trong nước, tác nhân nhũ tương hoá, tác nhân đệm, tác nhân làm ẩm, tác nhân làm ướt, tác nhân làm tan, chất bảo quản và vật liệu tương tự. Các dạng liều dùng trong điều trị có thể bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, viên nén, viên bao đường, viên nang, viên nang nhỏ và viên tròn nhỏ, mà các dạng liều này chứa dầu vi sinh vật và một hoặc vài vật liệu mang được dùng thích hợp.

Để dùng theo đường uống, dầu vi sinh vật có thể được phối hợp với các vật liệu mang được dùng đã biết rõ trong lĩnh vực này. Các vật liệu mang này giúp cho các dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể được bào chế thành các dạng viên nén, viên tròn nhỏ, viên bao đường, viên nang, thuốc dạng lỏng, thuốc dạng gel, thuốc dạng si-rô, thuốc dạng huyền phù đặc, thuốc dạng huyền phù và dạng tương tự, để dùng theo đường uống cho đối tượng được điều trị. Theo một số phương án, dạng liều là viên nén, viên tròn nhỏ hoặc viên nang nhỏ. Có thể bào chế các dược phẩm dùng theo đường uống bằng cách thêm tá dược rắn, tùy ý nghiền hỗn hợp tạo thành, rồi xử lý hỗn hợp dạng hạt; nếu muốn, sau khi thêm các tá chất thích hợp, thì tạo các viên nén hoặc các lõi viên bao đường. Các tá dược thích hợp bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, các vật liệu độn như các đường, gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, lactoza, saccaroza, manitol và sorbitol; chế phẩm xenluloza như, nhưng không phải chỉ giới hạn là, tinh bột ngô, tinh bột lúa mì, tinh bột gạo, tinh bột khoai tây, gồm tragacan, metylxenluloza, hydroxypropylmetyl-xenluloza, natri carboxymetylxenluloza; và polyvinylpyrrolidon (PVP). Nếu muốn, có thể thêm các tác nhân gây rã thuốc, như, nhưng không phải chỉ giới hạn là, polyvinylpyrrolidon liên kết ngang, aga, hoặc axit alginic hay muối của axit này như natri alginat. Các dược phẩm có thể dùng theo đường uống bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, các viên nang bằng gelatin có hai nửa vỏ lòng khít, cũng như các viên nang mềm bằng gelatin và chất dẻo hoá như glyxerol hoặc sorbitol chỗ nổi có băng dán.

Theo một số phương án, chế phẩm là mỹ phẩm. Mỹ phẩm này bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, các nhũ tương, các thứ kem, các nước xức, các sản phẩm che

chấn, các thứ xà phòng, các dầu gội, các nước rửa, các kem xoa mặt, các thuốc dưỡng da, các sản phẩm trang điểm, các sữa tắm và các chất lỏng phân tán. Các mỹ phẩm này có thể có tác dụng như thuốc hoặc không như thuốc.

Theo một số phương án, chế phẩm là chế phẩm công nghiệp. Theo một số phương án, chế phẩm này là vật liệu đầu vào cho một hoặc vài công việc sản xuất. Việc sản xuất bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, sản xuất polyme; sản xuất vật liệu nhạy sáng trong chụp ảnh; sản xuất chất tẩy rửa; sản xuất dầu công nghiệp hoặc sản xuất chất tẩy rửa công nghiệp. Ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 7,259,006 đề cập đến việc sử dụng mỡ và dầu chứa DHA để sản xuất axit behenic và sản xuất các vật liệu nhạy sáng trong chụp ảnh nhờ sử dụng axit behenic.

Các phương pháp sử dụng chế phẩm

Theo một số phương án, các chế phẩm đã nêu có thể được sử dụng trong điều trị các bệnh ở người hoặc động vật.

Thuật ngữ “điều trị” chỉ cả điều trị chữa bệnh và các biện pháp dự phòng, trong đó đối tượng được ngăn ngừa hoặc được làm chậm sự diễn biến của tình trạng sinh lý không mong muốn, của bệnh hoặc rối loạn, hoặc để đạt được kết quả lâm sàng tốt hay kết quả lâm sàng mong muốn. Nhằm mục đích của sáng chế, kết quả lâm sàng tốt hay kết quả lâm sàng mong muốn bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, sự thuyên giảm các triệu chứng hoặc các dấu hiệu có liên quan với tình trạng, bệnh hoặc rối loạn; sự giảm mức độ của tình trạng, bệnh hoặc rối loạn; sự ổn định của tình trạng, bệnh hoặc rối loạn (tức là tình trạng, bệnh hoặc rối loạn không trở nên trầm trọng hơn); làm chậm sự khởi phát hoặc sự tiến triển của tình trạng, bệnh hoặc rối loạn; cải thiện tình trạng, bệnh hoặc rối loạn; làm thoái triển (dù là một phần hay toàn bộ, dù là có thể phát hiện được hay không thể phát hiện được) tình trạng, bệnh hoặc rối loạn; hay tình trạng, bệnh hoặc rối loạn chuyển biến tích cực hoặc theo chiều hướng tốt lên. Việc điều trị bao gồm kích thích tạo ra đáp ứng có ý nghĩa lâm sàng mà không gây ra tác dụng phụ thái quá. Việc điều trị cũng bao gồm kéo dài sự sống sót của bệnh nhân so với sự sống sót tiên liệu nếu không được điều trị.

Theo một số phương án, chế phẩm nêu trên được sử dụng để điều trị tình trạng, bệnh hoặc rối loạn như viêm nang lông, bệnh viêm cấp tính, bệnh điểm vàng có liên quan đến tuổi tác, dị ứng, viêm khớp Alzheimer, hen, vữa xơ động mạch, bệnh tự miễn, rối loạn lipid huyết, u nang vú, suy mòn, ung thư, tái phát hẹp mạch máu ở tim, các bệnh tim mạch,

bệnh viêm mãn tính, bệnh tim động mạch vành, u xơ bàng quang, rối loạn thoái hoá gan, đái tháo đường, eczema, rối loạn đường tiêu hoá, bệnh tim, lượng triglyxerit trong máu cao, tăng huyết áp, tăng hoạt động, các bệnh miễn dịch, tăng sinh u, các bệnh viêm, các rối loạn ở ruột, rối loạn chức năng thận, bệnh bạch cầu, cơn trầm cảm lớn, đa xơ cứng, rối loạn thoái hoá thần kinh, viêm xương-khớp, loãng xương, rối loạn thể peroxi, tiền sản giật, đẻ non, bệnh vẩy nến, rối loạn ở phổi, viêm khớp dạng thấp, nguy cơ mắc bệnh tim, hoặc chứng huyết khối.

Theo một số phương án, chế phẩm nêu trên được sử dụng để tăng thời gian mang thai trong vòng ba tháng cuối thời kỳ thai nghén.

Theo một số phương án, chế phẩm nêu trên được sử dụng để kiểm soát huyết áp.

Theo một số phương án, chế phẩm nêu trên được sử dụng để cải thiện hoặc duy trì chức năng nhận thức.

Theo một số phương án, chế phẩm nêu trên được sử dụng để cải thiện hoặc duy trì trí nhớ.

Chế phẩm hoặc dạng liều nêu trên có thể được sử dụng cho cơ thể của bệnh nhân theo bất kỳ đường dùng thuốc nào thích hợp với chế phẩm hoặc dạng liều đó. Một chất được xem là được “sử dụng trong điều trị” nếu như chất đó được đưa vào cơ thể của bệnh nhân bởi chính bệnh nhân hoặc bởi người khác, bằng máy móc hoặc dụng cụ. Bởi vậy “sử dụng trong điều trị” bao gồm, chẳng hạn, sự tự sử dụng trong điều trị, sự điều trị bởi những người khác và sự sử dụng điều trị gián tiếp. Thuật ngữ “liên tiếp”, theo như được sử dụng ở đây liên quan với “sự sử dụng trong điều trị”, có nghĩa là tần suất sử dụng trong điều trị ít nhất là một lần mỗi ngày. Tuy nhiên, cần lưu ý là, tần suất sử dụng trong điều trị có thể là nhiều hơn một lần mỗi ngày và vẫn còn là “liên tiếp”, chẳng hạn như hai lần hoặc thậm chí là ba lần mỗi ngày, miễn là vẫn không vượt quá các mức liều như được chỉ rõ trong sáng chế. Các phương tiện và các phương pháp sử dụng thuốc trong điều trị đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này; chuyên gia trong lĩnh vực này có thể tra cứu các hướng dẫn trong các tài liệu tra cứu dược lý khác nhau. Ví dụ, có thể tham khảo cuốn “Modern Pharmaceutics” Banker & Rhodes, Informa Healthcare, USA, 4th ed. (2002) và cuốn “Goodman & Gilman’s The Pharmaceutical Basis of Therapeutics” McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 10th ed. (2001).

Về các thuật ngữ “đối tượng”, “cá thể” hoặc “bệnh nhân” thì có nghĩa là bất kỳ đối tượng nào, người hoặc động vật, mà cần phải chẩn đoán, tiên lượng hoặc điều trị. Các đối

tượng là động vật có vú bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, người; gia súc; các động vật nông nghiệp; các động vật ở vườn bách thú; các động vật thể thao; các động vật nuôi làm cảnh như chó, mèo, chuột lang, thỏ, chuột thân lớn, chuột nhắt hoặc ngựa; các động vật linh trưởng như khỉ (chẳng hạn khỉ cebus, khỉ rhesus, khỉ mặt xanh lá châu Phi, khỉ patas, khỉ ăn cua và khỉ đuôi dài), khỉ không đuôi, đười ươi, khỉ mõm chó, vượn và hắc tinh tinh; các động vật họ chó như chó nhà và chó sói; các động vật họ mèo như mèo, sư tử và hổ; các động vật họ ngựa như ngựa, lừa và ngựa vằn; các động vật nuôi lấy thịt hoặc sữa như bò, trâu, lợn và cừu; các động vật móng guốc như hươu và hươu cao cổ; các động vật gặm nhấm như chuột nhắt, chuột thân lớn, chuột túi má và chuột lang; v.v... Thuật ngữ “đối tượng” cũng bao gồm các động vật được sử dụng làm mô hình thí nghiệm, chẳng hạn như các động vật làm mô hình nghiên cứu bệnh. Theo một số phương án, thuật ngữ “đối tượng” bao gồm các động vật có giá trị, hoặc về mặt kinh tế hoặc về phương diện khác, ví dụ như đàn giống sinh sản có tầm quan trọng kinh tế, các động vật đua, các động vật trình diễn, các động vật quý hiếm cần bảo vệ, các động vật hiếm và có nguy cơ tuyệt chủng, các động vật kèm đôi. Theo một số phương án, đối tượng nêu trên là người. Theo một số phương án, đối tượng nêu trên không phải là người.

Chế phẩm có thể được sử dụng với “lượng có hiệu lực điều trị”, “lượng có hiệu lực dự phòng”, “liều điều trị” hoặc “liều dự phòng”. “lượng có hiệu lực điều trị” hoặc “liều điều trị” chỉ lượng có hiệu lực với các liều lượng và được sử dụng trong các khoảng thời gian cần thiết để đạt được hiệu quả điều trị mong muốn. Ví dụ, hiệu quả điều trị có thể là làm giảm các triệu chứng, kéo dài thời gian sống sót, cải thiện vận động và hiệu quả tương tự. Hiệu quả điều trị không nhất thiết phải là “chữa khỏi”. “Lượng có hiệu lực dự phòng” hoặc “liều dự phòng” chỉ lượng có hiệu lực với các liều lượng và được sử dụng trong các khoảng thời gian cần thiết để đạt được hiệu quả dự phòng mong muốn. Thông thường, bởi vì lượng có hiệu lực dự phòng được sử dụng cho các đối tượng trước hoặc vào giai đoạn sớm của bệnh, nên lượng có hiệu lực dự phòng sẽ thấp hơn lượng có hiệu lực điều trị để điều trị giai đoạn tiến triển của bệnh.

Có thể sử dụng các liều lượng khác nhau của dược phẩm cho đối tượng, căn cứ vào lượng DHA hoặc cấu phần axit béo khác của thraustochytrid, của sinh khối hoặc của dầu vi sinh vật để sử dụng điều trị cho đối tượng đó. Các thuật ngữ “liều lượng mỗi ngày”, “mức liều lượng mỗi ngày” và “lượng mỗi ngày” dùng trong sáng chế chỉ tổng lượng DHA hoặc cấu phần axit béo khác được sử dụng mỗi ngày (tức cho mỗi khoảng thời gian

24 giờ) để điều trị. Như vậy, ví dụ, dùng DHA để điều trị cho bệnh nhân với liều mỗi ngày 2 mg có nghĩa là đối tượng đó được cho sử dụng tổng số 2 mg DHA trên cơ sở mỗi ngày, khi đó DHA được sử dụng dưới dạng liều đơn chứa 2 mg DHA, hay thay vì, dùng bốn dạng liều chứa 0,5 mg DHA mỗi dạng (tổng cộng là 2 mg DHA). Theo một số phương án, lượng mỗi ngày của DHA được sử dụng trong điều trị dưới dạng liều đơn, hoặc hai dạng liều. Các dạng liều theo sáng chế có thể được sử dụng làm một lần hoặc làm nhiều lần. Ví dụ, nếu dùng bốn viên nén mỗi ngày, mà mỗi viên nén chứa 0,5 mg DHA, thì có thể uống tất cả bốn viên một lần mỗi ngày, hoặc có thể uống mỗi lần 2 viên, hai lần mỗi ngày, hoặc cứ 6 tiếng thì uống một viên. Theo một số phương án, liều lượng mỗi ngày là khoảng từ 100 mg đến 15 g. Theo một số phương án, liều lượng mỗi ngày là khoảng từ 100 mg đến 250 mg, khoảng từ 100 mg đến 500 mg, khoảng từ 100 mg đến 1 g, khoảng từ 1 g đến 2,5 g, khoảng từ 1 g đến 5 g, khoảng từ 1 g đến 10 g, khoảng từ 1 g đến 15 g, khoảng từ 5 g đến 10 g, khoảng từ 5 g đến 15 g, khoảng từ 10 g đến 15 g, khoảng từ 100 mg đến 10 g, khoảng từ 100 mg đến 5 g, hoặc khoảng từ 100 mg đến 2,5 g.

Việc sử dụng các dược phẩm hoặc các dạng liều theo sáng chế có thể được thực hiện theo các chế độ khác nhau. Ví dụ, theo một số phương án, việc sử dụng trong điều trị được thực hiện hằng ngày vào các ngày liên tiếp; hoặc khác đi, được thực hiện cách ngày (cứ hai ngày một). Có thể sử dụng dược phẩm điều trị trong một hoặc vài ngày.

Việc sử dụng các dược phẩm và các dạng liều này có thể được phối hợp với các chế độ khác để điều trị bệnh. Ví dụ, phương pháp theo sáng chế có thể được phối hợp với chế độ ăn uống (chẳng hạn như chế độ ăn với lượng carbohydrat thấp, chế độ ăn với lượng protein cao, chế độ ăn với nhiều chất xơ, v.v...), chế độ tập luyện, chế độ giảm cân, chế độ ngừng hút thuốc lá hoặc tổ hợp các chế độ này. Phương pháp theo sáng chế cũng có thể được phối hợp với các dược phẩm khác trong điều trị bệnh. Các dược phẩm hoặc các dạng liều theo sáng chế có thể được sử dụng trước hoặc sau các chế độ hoặc các dược phẩm khác.

Các hộp chuyên dụng chứa các chế phẩm

Sáng chế còn đề cập đến các hộp hoặc các gói chứa một hoặc vài đơn vị chế phẩm theo sáng chế. Các hộp hoặc các gói này có thể bao gồm các đơn vị thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm hoặc chế phẩm công nghiệp, chứa thraustochytrid, sinh khối hoặc dầu vi sinh vật theo sáng chế hay tổ hợp của các thứ này. Các hộp hoặc các gói này cũng có thể bao gồm vật liệu phụ gia chứa thraustochytrid, sinh khối hoặc dầu vi sinh vật theo sáng

chế hay tổ hợp của các thứ này để tạo ra thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm hoặc chế phẩm công nghiệp.

Theo một số phương án, hộp hoặc gói nêu trên chứa một hoặc vài đơn vị dược phẩm để sử dụng trong điều trị theo các phương pháp của sáng chế. Hộp chuyên dụng hoặc gói đó có thể chứa một đơn vị liều hoặc hơn một đơn vị liều (tức nhiều đơn vị liều). Nếu có nhiều đơn vị liều trong hộp hoặc gói thuốc, thì các đơn vị liều này có thể được bố trí tùy ý để sử dụng liên tiếp.

Các hộp chuyên dụng theo sáng chế có thể tùy ý chứa các tài liệu hướng dẫn đi kèm với các đơn vị liều hoặc các dạng liều trong hộp. Các tài liệu hướng dẫn này có thể có dạng được quy định bởi cơ quan nhà nước quản lý về sản xuất, sử dụng hoặc bán dược phẩm để sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở người; các tài liệu này phản ánh sự phê chuẩn của cơ quan nhà nước quản lý về sản xuất, sử dụng hoặc bán dược phẩm để sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở người. Các tài liệu hướng dẫn có thể có dạng nào đó, truyền đạt thông tin về sử dụng các đơn vị liều hoặc các dạng liều trong hộp thuốc theo các phương pháp của sáng chế. Ví dụ, các tài liệu hướng dẫn có thể có dạng ấn phẩm hoặc phương tiện đã ghi sẵn thông tin trên đó.

Trong quá trình khám cho bệnh nhân, thầy thuốc chuyên khoa có thể xác định được là, việc sử dụng một trong các phương pháp của sáng chế là thích hợp cho bệnh nhân, hoặc thầy thuốc có thể xác định được rằng, có thể cải thiện bệnh của bệnh nhân bằng cách sử dụng một trong các phương pháp của sáng chế. Trước khi chỉ định bất kỳ một chế độ điều trị nào đó, thầy thuốc có thể trao đổi ý kiến với bệnh nhân về các rủi ro và ích lợi khác nhau có liên quan với chế độ điều trị. Bệnh nhân có thể được cung cấp bản mô tả đầy đủ về tất cả các rủi ro đã biết hoặc còn nghi ngờ, có liên quan với chế độ điều trị. Việc trao đổi ý kiến này có thể được thực hiện bằng lời nói cũng như bằng văn bản. Theo một số phương án, thầy thuốc có thể cung cấp cho bệnh nhân các tài liệu tham khảo về chế độ điều trị, ví dụ như thông tin về thuốc, tài liệu hướng dẫn và tài liệu tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp hướng dẫn người tiêu dùng về các phương pháp điều trị; phương pháp này bao gồm việc phân phát các dạng liều nêu trên cùng với thông tin hướng dẫn người tiêu dùng tại điểm bán dược phẩm. Theo một số phương án, việc phân phát đó sẽ được thực hiện tại điểm bán dược phẩm, với sự có mặt của dược sĩ hoặc nhân viên y tế.

Thuật ngữ “thông tin hướng dẫn người tiêu dùng” có thể bao gồm, nhưng không

phải chỉ giới hạn là, văn bản bằng tiếng Anh, văn bản bằng tiếng khác tiếng Anh, hình ảnh trực quan, biểu đồ, số điện thoại, trang web và cách truy cập trực tuyến đại diện bộ phận dịch vụ khách hàng. Theo một số phương án, thông tin hướng dẫn người tiêu dùng sẽ cung cấp các hướng dẫn về sử dụng các dạng liều theo các phương pháp của sáng chế, việc sử dụng phù hợp với tuổi, chỉ định, chống chỉ định, liều lượng thích hợp, các cảnh báo, số điện thoại của địa chỉ trang web. Theo một số phương án, phương pháp nêu trên còn bao gồm việc cung cấp thông tin chuyên môn nghiệp vụ về những người liên quan có trách nhiệm trả lời các câu hỏi của khách hàng về việc sử dụng các chế độ điều trị đã nêu theo các phương pháp của sáng chế. Thuật ngữ “thông tin chuyên môn nghiệp vụ” bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, thông tin về chế độ điều trị, khi được sử dụng điều trị theo các phương pháp của sáng chế, mà chế độ điều trị này đã được xây dựng để giúp người có chuyên môn y học trả lời các câu hỏi của khách hàng.

Ví dụ, “người có chuyên môn y học” bao gồm bác sĩ, trợ lý bác sĩ, y tá thực hành, dược sĩ và đại diện bộ phận dịch vụ khách hàng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế đã được mô tả một cách đại thể, nên có thể hiểu sâu hơn sáng chế thông qua các ví dụ nêu ra dưới đây. Các ví dụ này chỉ nhằm minh họa mà không giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1

Thraustochytrid đã phân lập được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695 đã được xác định đặc tính để phục vụ việc phân loại.

Các mẫu nghiên cứu đã được thu từ các sinh cảnh giữa hai mức triều trong thời gian nước triều xuống. Nước, chất lắng đọng, vật liệu thực vật sống và cặn bã phân huỷ của động/thực vật được lấy vào các ống nghiệm vô khuẩn có dung tích 50 ml. Các phần của mỗi mẫu cùng với nước được rải lên các phiến thạch trắng rửa sạch môi trường tách. Môi trường tách có thành phần gồm: 500 ml nước biển nhân tạo, 500 ml nước cất, 1 g glucoza, 1 g glyxerol, 13 g thạch trắng, 1 g glutamat, 0,5 g chiết phẩm nấm men, 0,5 g sản phẩm thuỷ phân casein, 1 ml dung dịch vitamin (100 mg/ml thiamin, 0,5 mg/l biotin, 0,5 mg B₁₂), 1 ml dung dịch chứa 7a dầu vết khoáng chất (các kim loại pn chứa trong mỗi lít: 6,0 g FeCl₃.6H₂O, 6,84 g H₃BO₃, 0,86 g MnCl₂.4H₂O, 0,06 g ZnCl₂, 0,026 g CoCl₂.6H₂O, 0,052 g NiSO₄.H₂O, 0,002 g CuSO₄.5H₂O và 0,005 Na₂MoO₄.2H₂O) và 500 ml mỗi

kháng sinh penicillin G và streptomycin sulfat. Các phiến thạch trắng được ủ trong tối ở nhiệt độ 20-25°C. Sau 2-4 ngày, các phiến thạch trắng được quan sát dưới kính phóng đại và các cụm tế bào đã được chọn nhặt ra bằng que nhặt vô khuẩn, rồi lại được rải trở lại thành vệt lên phiến mới chứa môi trường tách. Các tế bào đã được rải lặp đi lặp lại nhiều lần lên các môi trường tách mới để phân lập, cho đến khi loại bỏ được các sinh vật nhiễm bẩn.

Các cụm tế bào từ các phiến thạch trắng được chuyển sang các đĩa kính Petri có chứa nước biển nửa nồng độ và (1 ml) huyền phù ấu trùng trùng muối mới nở đựng trong nồi hấp. Các ấu trùng của trùng muối sinh trưởng rất mạnh, thành các cụm túi bào tử sau 2- 3 ngày. Các bào tử động giải phóng ra có hai lông roi lúc phóng ra, bơi khỏe thoát ra khỏi túi bào tử đã chín, lúc này nhìn thấy rõ các mảnh vụn của túi này (bằng kính hiển vi đối pha) sau khi bào tử được giải phóng. Các túi bào tử có đường kính từ 12,5 μm đến 25 μm và các bào tử động có kích thước 2,5 μm đến 2,8 μm x 4,5 μm đến 4,8 μm . Có từ 8 đến 24 bào tử ứng với mỗi túi bào tử riêng biệt. Các bào tử động đã lắng xuống phình ra và nhanh chóng chia đôi, tạo ra các bộ bốn, bộ tám và cuối cùng thành các đám túi bào tử. Sự tạo thành các bộ bốn bắt đầu diễn ra ở giai đoạn còn rất sớm trước khi các túi bào tử chín. Các đặc tính này nhất quán với giống *Schizochytrium*.

Thraustochytrid đã phân lập được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-9695 còn được đặc trưng dựa trên sự tương tự gen 18s rARN của nó với gen của loài đã biết. Toàn bộ ADN hệ gen từ *thraustochytrid* lưu trữ với số truy cập ATCC PTA-9695 đã được xác định bằng các phương pháp tiêu chuẩn (xem tài liệu: Sambrook J. and Russel D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York) và được sử dụng cho việc khuếch đại gen 18s rARN bằng PCR (phản ứng dây chuyền polymeraza). Việc khuếch đại bằng PCR gen 18s rARN đã được thực hiện với các đoạn mồi đã được mô tả trước đây (xem tài liệu: Honda et al., *J. Eukaryot. Microbiol* 46(6), 1999). Các điều kiện tiến hành PCR với khuôn ADN nhiễm sắc thể là như sau: 0,2 μM các dNTP; 0,1 μM mỗi đoạn mồi; 8% DMSO; 200 ng ADN nhiễm sắc thể; 2,5 U HS ADN polymeraza dung hợp II PfuUltra® (Stratagene) và 1X đệm PfuUltra® (Stratagene) trong tổng thể tích 50 μl . Thủ tục PCR gồm các bước sau: 1) 95°C trong thời gian 2 phút; 2) 95°C trong thời gian 45 giây; 3) 55°C trong thời gian 30 giây; 4) 72°C trong thời gian 2 phút; 5) lặp lại các bước từ 2 đến 4 trong 40 chu trình; 6) 72°C trong thời gian 5 phút; và 7) duy trì ở 6°C.

Khi dùng khuôn nhiễm sắc thể mô tả ở trên, sự khuếch đại bằng PCR cho sản phẩm ADN khác biệt, có kích thước mong muốn. Sản phẩm của PCR được nhân dòng vào vector pJET1.2/cun (Fermentas) dựa theo hướng dẫn của hãng sản xuất, còn trình tự đoạn xen được xác định bằng cách sử dụng các đoạn mồi tiêu chuẩn được cung cấp.

Bảng 2 trình bày sự so sánh trình tự của 18s rARN từ *thraustochytrid* được lưu trữ có số truy cập ATCC là PTA-9695 với các trình tự ADN ở cơ sở dữ liệu điện tử của Trung tâm Quốc gia về Thông tin Công nghệ sinh học (NCBI). Nói một cách vắn tắt, “% đồng nhất” được xác định bằng ma trận tính điểm “swgapdnamt” trong chương trình “AlignX” của chương trình VectorNTI (Invitrogen), là một chuẩn dùng cho sóng hàng so sánh ADN. “% tổng thể” được rút ra từ các kết quả tính toán bằng Công cụ Cơ bản Tìm kiếm Sóng hàng so sánh Cục bộ (BLAST) từ cơ sở dữ liệu điện tử NCBI và là phần trăm của độ dài vắn tin được đưa vào các đoạn được làm thẳng hàng để so sánh.

Bảng 2: So sánh các trình tự 18s rARN

Thraustochytrid	% Đồng nhất Phép tính số 1	% tổng thể Phép tính số 2
<i>Thraustochytrium aggregatum</i> (p)	98	90
<i>Thraustochutriidae</i> sp. HU1	84	86
<i>Thraustochutriidae</i> sp. 8-7	84	91
<i>Thraustochytrium multirudimentale</i>	81	88
<i>Thraustochutriidae</i> sp. PW19	81	85
<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	81	95

Ghi chú: (p): chỉ trình tự không đầy đủ

Như được nêu trong Bảng 2, đã xác định thấy rằng, về % đồng nhất, thì trình tự gen 18s rARN (SEQ ID NO: 1) từ *thraustochytrid* được lưu trữ có số truy cập ATCC là PTA-9695 có liên quan gần gũi với, mặc dù không phải là đồng nhất với, trình tự gen 18s rARN của *T. aggregatum* được đề xuất trong tài liệu Honda, D. et al, *J. Euk. Micro.* 46(6): 637-647 (1999). Trình tự gen 18s rARN được công bố cho *Thraustochytrium aggregatum* là trình tự không đầy đủ, với đoạn khuyết gồm xấp xỉ 71 nucleotit ADN ở giữa trình tự. Về phần trăm bao quát, thì trình tự gen 18s rARN của sản phẩm phân lập theo sáng chế có quan hệ gần gũi với *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 hơn so với *T. aggregatum*.

Các protein có mức bảo toàn cao như actin và beta-tubulin đã được sử dụng rộng rãi, cùng với gen 18s rARN, để làm dấu chuẩn đánh giá quan hệ phát sinh chủng loài giữa các sinh vật (xem tài liệu: Baldauf, S. M. *Am. Nat.* 154, S178 (1999)). Toàn bộ ADN hệ

gen từ *thraustochytrid* được lưu trữ có số truy cập ATCC là PTA-9695 cũng được sử dụng làm khuôn để khuếch đại cả gen actin và gen beta-tubulin bằng PCR. Sự khuếch đại bằng PCR này được tiến hành với các đoạn mồi dành cho các vùng được bảo toàn trong các trình tự ADN actin và beta-tubulin từ *T. aggregatum*.

Các điều kiện tiến hành PCR với khuôn ADN nhiễm sắc thể là như sau: 0,2 μ M các dNTP; 0,1 μ M mỗi đoạn mồi; 8% DMSO; 200 ng ADN nhiễm sắc thể; 2,5 U HS ADN polymeraza dung hợp II Herculase® (Stratagene) và 1X đệm Herculase® (Stratagene) trong tổng thể tích 50 μ l. Thủ tục PCR gồm các bước sau: 1) 95°C trong thời gian 2 phút; 2) 95°C trong thời gian 30 giây; 3) 55°C trong thời gian 30 giây; 4) 72°C trong thời gian 2 phút; 5) lặp lại các bước từ 2 đến 4 trong 40 chu trình; 6) 72°C trong thời gian 5 phút; và 7) duy trì ở 6°C.

Khi dùng khuôn nhiễm sắc thể mô tả ở trên, sự khuếch đại bằng PCR cho các sản phẩm ADN khác biệt, có kích thước mong muốn. Các sản phẩm tương ứng của PCR được nhân dòng vào vector pJET1.2/cun (Fermentas) dựa theo hướng dẫn của hãng sản xuất, còn trình tự đoạn xen của mỗi sản phẩm được xác định bằng cách sử dụng các đoạn mồi tiêu chuẩn được cung cấp.

Bảng 3 cho thấy độ đồng nhất về trình tự axit amin của actin (SEQ ID NO: 3) từ *thraustochytrid* được lưu trữ có số truy cập ATCC PTA-9695, so với các trình tự axi amin của actin ở cơ sở dữ liệu công cộng. Độ đồng nhất này được xác định bằng ma trận tính điểm “blosum62mt2” trong chương trình “AlignX” của chương trình VectorNTI (Invitrogen), là một chuẩn dùng để làm thẳng hàng so sánh protein.

Bảng 3: So sánh % đồng nhất về trình tự axit amin của protein actin

Các <i>thraustochytrid</i>	% Đồng nhất
<i>Thraustochytriidae sp.</i> RT49	98
<i>Schizochytrium sp.</i> ATCC 20888	96
<i>Thraustochytrium striatum</i>	96
<i>Thraustochytrium aggregatum</i>	96
<i>Japonochytrium marinum</i>	95
<i>Thraustochytrium aureum</i>	95

Bảng 4 cho thấy mức độ đồng nhất về trình tự axit amin của beta-tubulin (SEQ ID NO: 5) từ *thraustochytrid* được lưu trữ có số truy cập ATCC PTA-9695, khi so với các trình tự axi amin của beta-tubulin ở cơ sở dữ liệu công cộng. Mức độ đồng nhất này được xác định bằng ma trận tính điểm “blosum62mt2” trong chương trình “AlignX” của

chương trình VectorNTI (Invitrogen), là một chuẩn dùng để làm thẳng hàng so sánh protein.

Bảng 4: So sánh % đồng nhất về trình tự axit amin của protein beta-tubulin

Các thraustochytrid	% Đồng nhất
<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	100
<i>Aplanochytrium stocchinoi</i>	100
<i>Japonochytrium marinum</i>	100
<i>Labyrinthula sp. N8</i>	100
<i>Thraustochytriidae sp. RT49</i>	100
<i>Thraustochytrium aggregatum</i>	100
<i>Thraustochytriidae sp. HU1</i>	100
<i>Thraustochytrium aureum</i>	100
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	100
<i>Thraustochytriidae sp. #32</i>	100
<i>Thraustochytriidae sp. PW19</i>	100
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	100
<i>Schizochytrium sp. ATCC 20888</i>	100

Trên cơ sở các xác định đặc tính ở trên, thraustochytrid đã phân lập lưu trữ với số truy cập ATCC PTA-9695 được xem là một loài *Schizochytrium* mới và do đó cũng được đặt tên là *Schizochytrium sp. ATCC PTA-9695*.

Ví dụ 2

Thraustochytrid đã phân lập lưu trữ với số truy cập ATCC PTA-9695 có mức sinh trưởng tế bào cao trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau, như được chỉ ra dưới đây. Các môi trường và điều kiện nuôi cấy thông thường được nêu ra trong Bảng 1. Ngoài ra, đã quan sát thấy hàm lượng lớn các axit béo và DHA (tức là trên 50% theo trọng lượng của trọng lượng tế bào khô là các axit béo và trên 50% theo trọng lượng của các methyl este axit béo là DHA).

Trong các môi trường nuôi cấy được cung cấp nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ, với 8.200 ppm Cl⁻ ở nhiệt độ 22,5°C, cùng với 20% oxy hoà tan ở pH = 7,0, thì sản phẩm phân lập cho trọng lượng tế bào khô là 140 g/l sau 7 ngày nuôi cấy, với hàm lượng axit béo là 70% theo trọng lượng. Nguồn dinh dưỡng ammoniac vòng kín được sử dụng và duy trì độ pH ở 7,0. Năng suất axit béo omega-3 là 8,92 g/(l*ngày) ở các điều kiện này, với 4,7 g/l EPA (chiếm 5% theo trọng lượng của các axit béo) và 56,3 g/l DHA (chiếm 57% theo trọng lượng của các axit béo) sau 7 ngày.

Trong các môi trường nuôi cấy được cung cấp nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ,

với 3.640 ppm Cl^- ở nhiệt độ $22,5^\circ\text{C}$, cùng với 20% oxy hoà tan ở pH = 7,0, thì sản phẩm phân lập cho trọng lượng tế bào khô là 82 g/l sau 7 ngày nuôi cấy, với hàm lượng axit béo là 58% theo trọng lượng. Năng suất axit béo omega-3 là 4,5 g/(l*ngày) ở các điều kiện này, với 2,1 g/l EPA (chiếm 4,3% theo trọng lượng của các axit béo) và 28,5 g/l DHA (chiếm 58,7% theo trọng lượng của các axit béo) sau 7 ngày.

Trong các môi trường nuôi cấy được cung cấp nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ, với 980 ppm Cl^- ở nhiệt độ $22,5^\circ\text{C}$, cùng với 20% oxy hoà tan ở pH = 7,0, thì sản phẩm phân lập cho trọng lượng tế bào khô là 60 g/l sau 7 ngày nuôi cấy, với hàm lượng axit béo là 53% theo trọng lượng. Năng suất axit béo omega-3 là 2,8 g/(l*ngày) ở các điều kiện này, với 1,1 g/l EPA (chiếm 3,4% theo trọng lượng của các axit béo) và 18,4 g/l DHA (chiếm 56,8% theo trọng lượng của các axit béo) sau 7 ngày.

Ví dụ 3

Các dầu được chiết từ mẫu sinh khối (mẫu A) của *thraustochytrid* đã phân lập được lưu trữ với số truy cập ATCC PTA-9695. Mẫu sinh khối này được sản xuất ra trong nuôi cấy có cung cấp nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ, với 980 ppm Cl^- ở nhiệt độ $22,5^\circ\text{C}$, cùng với 20% oxy hoà tan ở pH = 7,0. Các dầu đã được chiết xuất từ mẫu sinh khối A bằng quá trình chiết với hexan, cho mẫu dầu vi sinh vật A1. Nói một cách ngắn gọn, sinh khối khô được nghiền cùng với hexan trong các ống nghiệm bằng thép không gỉ nhờ các vòng bi bằng thép không gỉ trong thời gian khoảng 2 giờ. Huyền phù đặc được lọc hút chân không và thu lấy dịch lọc. Dung môi hexan được tách loại bằng máy cô quay. Các dầu cũng được chiết xuất từ mẫu sinh khối A bằng quy trình FRIOLEX® (GEA Westfalia Separator UK Ltd., Milton Keynes, Anh quốc), cho mẫu dầu vi sinh vật A2. Các loại lipid riêng biệt đã được phân tách từ các mẫu dầu vi sinh vật A1 và A2 bằng phương pháp sắc ký nhanh áp suất thấp và xác định phần trăm theo trọng lượng của mỗi loại lipid. Thành phần axit béo của mỗi loại lipid đã được xác định bằng sắc ký khí, với detector ion hoá ngọn lửa (GC-FID), dưới dạng các metyl este của axit béo (FAME).

Sắc ký nhanh - sắc ký nhanh được sử dụng để chia tách các loại lipid có trong các dầu thô và để xác định phần trăm theo trọng lượng của mỗi loại lipid trong các dầu đó. Hệ sắc ký sử dụng silicagel 60 (EMD Chemical, Gibbstown, NJ) với pha động gồm ete petrol và etyl axetat, tốc độ dòng 3 ml/phút. Gradient nấc được sử dụng để rửa giải chọn lọc mỗi loại lipid ra khỏi cột. Gradient pha động bắt đầu từ 100% ete petrol và kết thúc với 50% etyl axetat (sau đó rửa bằng metanol 100%). Các phân đoạn được thu vào các ống nghiệm

có dung tích 10 ml, sử dụng bộ thu phân đoạn có giá rộng Gilson FC 204 (Gilson, Inc., Middleton, WI). Từng ống nghiệm được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) và các ống chứa các loại lipit riêng biệt (được phán đoán bằng sự có mặt chỉ của một vết trên bản TLC VỚI hệ số giữ theo dự đoán (R_f)) được gộp lại, cô tới khô và cân. Sau đó, tổng hàm lượng phân đoạn được xác định bằng phương pháp trọng lượng.

Phân tích TLC - Phân tích bằng sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên các bản silicagel. Các bản này được giải hấp bằng hệ dung môi gồm ete petrol : etyl ete : axit axetic (80:20:1) và được hiện vết bằng hơi iot. Các giá trị R_f của mỗi vết sau đó được so sánh với các giá trị đã được thông báo trong tài liệu tham khảo cho mỗi loại lipit.

Phân tích axit béo - Các mẫu sinh khối và các loại lipit đã phân lập được phân tích về thành phần axit béo dưới dạng các metyl este của axit béo (các FAME). Các mẫu được cân trực tiếp trong các ống nghiệm với nắp có ren, rồi thêm vào mỗi ống 1 ml chuẩn nội C19:0 (NuCheck, Elysian, MN) trong toluen và 2 ml dung dịch HCl 1,5 N trong metanol. Các ống nghiệm được lắc tròn mạnh trong giây lát và đặt lên bộ gia nhiệt trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 100°C. Các ống được lấy ra khỏi bộ gia nhiệt, để nguội và thêm vào đó 1 ml dung dịch NaCl bão hoà trong nước. Các ống nghiệm lại được lắc tròn mạnh, ly tâm; phần lớp trên (lớp hữu cơ) được cho vào lọ GC (sắc ký khí) và phân tích bằng phương pháp GC-FID. Các FAME được định lượng nhờ sử dụng đồ thị chuẩn nội có ba điểm được xây dựng với chuẩn tham chiếu Nu-Chek-Prep GLC (Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN) và được nhận dạng thử dựa vào thời gian lưu. Các axit béo có mặt được biểu diễn hàm lượng bằng mg/g và bằng % trong tổng các FAME.

Mẫu A1 được chuẩn bị bằng cách hoà tan dầu thô trong hexan và đưa lên đầu cột sắc ký. Sau khi phân đoạn mẫu này bằng sắc ký nhanh, thì xác định được phân đoạn este sterol chiếm 1,2% theo trọng lượng, phân đoạn triaxylglycerol (TAG) chiếm 82,7% theo trọng lượng, phân đoạn axit béo tự do (FFA) chiếm 0,9% theo trọng lượng, và phân đoạn điaxylglycerol (DAG) chiếm 2,9% theo trọng lượng trong dầu thô. Toàn bộ thành phần axit béo của mẫu dầu thô AI và các phân đoạn phân lập được trình bày ở Bảng 5 và Bảng 6 dưới đây, tính theo mg/g và % FAME, tương ứng.

Bảng 5: Thành phần axit béo của mẫu A1 tính bằng miligam trên gam FAME

	Sinh khối	Dầu thô	Các este sterol	TAG	FFA	DAG
% Trọng lượng	Không phân tích	38%	1,2%	82,7%	0,9%	2,9%
Axit béo	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)

C12:0*	0,6	0,0	1,9	3,2	1,7	0,0
C14:0*	5,7	13,6	12,8	20,2	13,0	17,6
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	1,3	3,4	3,1	3,1	2,1	2,6
C16:0*	105,5	239,5	222,2	274,3	183,3	225,1
C16:1*	0,0	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0
C18:0*	6,4	16,4	43,1	16,8	9,8	14,0
C18:1 N9*	0,0	3,8	1,9	3,3	1,0	3,5
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:0*	1,8	5,5	13,0	4,7	2,0	2,9
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0*	0,0	0,8	7,3	0,8	0,0	1,2
C20:4 N7	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,0	3,4	0,0	2,6	2,0	1,9
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	1,5	4,1	1,5	3,5	2,1	2,1
C20:5 N3*	18,2	39,5	3,5	38,4	30,6	42,8
C24:0*	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	11,9	29,5	8,9	26,9	14,8	18,7
C22:5 N3*	1,1	4,7	0,9	3,6	3,4	2,7
C22:6 N3*	253,5	569,7	107,3	556,5	352,8	451,4
Tổng tất cả các FAME	408,6	934,0	435,4	958,0	620,1	786,4

Bảng 6: Thành phần axit béo của mẫu A1 tính bằng phần trăm trong tổng các FAME

	Sinh khối	Dầu thô	Các este sterol	TAG	FFA	DAG
Axit béo	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,1	0,0	0,4	0,3	0,3	0,0
C14:0*	1,4	1,5	2,9	2,1	2,1	2,2
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,3	0,4	0,7	0,3	0,3	0,3
C16:0*	25,8	25,6	51,0	28,6	29,6	28,6
C16:1*	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0
C18:0*	1,6	1,8	9,9	1,8	1,6	1,8
C18:1 N9*	0,0	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:0*	0,4	0,6	3,0	0,5	0,3	0,4
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0*	0,0	0,1	1,7	0,1	0,0	0,1
C20:4 N7	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	0,3	0,4	0,0	0,3	0,3	0,2
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3
C20:5 N3*	4,5	4,2	0,8	4,0	4,9	5,4
C24:0*	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	2,9	3,2	2,1	2,8	2,4	2,4
C22:5 N3*	0,3	0,5	0,2	0,4	0,5	0,3
C22:6 N3*	62,0	61,0	24,6	58,1	56,9	57,4
Tổng FAME, %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Mẫu A2 được chuẩn bị bằng cách hoà tan dầu thô trong hexan và đưa lên đầu cột sắc ký. Sau khi phân đoạn mẫu này bằng sắc ký nhanh, thì xác định được phân đoạn este sterol chiếm 0,8% theo trọng lượng, phân đoạn triaxylglyxerol (TAG) chiếm 83,4% theo trọng lượng, phân đoạn axit béo tự do (FFA) chiếm 1,8% theo trọng lượng, và phân đoạn điaxylglyxerol (DAG) chiếm 5,6% theo trọng lượng trong dầu thô. Toàn bộ thành phần axit béo của mẫu dầu thô A2 và các phân đoạn phân lập được trình bày ở Bảng 7 và Bảng 8 dưới đây, tính theo mg/g và % FAME, tương ứng.

Bảng 7: Thành phần axit béo của mẫu A2 tính bằng miligam trên gam FAME

	Sinh khối	Dầu thô	Các este sterol	TAG	FFA	DAG
% Trọng lượng	Không phân tích	Không phân tích	0,8%	83,4%	1,8%	5,6%
Axit béo	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0,6	0,0	0,0	1,5	0,0	1,0
C14:0*	5,7	13,2	8,9	14,1	9,5	5,4
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	1,3	3,3	2,8	3,4	2,1	2,2
C16:0*	105,5	233,7	183,8	246,1	159,7	137,3
C16:1*	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0
C18:0*	6,4	16,6	23,6	16,9	11,3	5,6
C18:1 N9*	0,0	7,6	5,0	4,3	2,4	2,6
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	2,2	0,7	1,6	0,8	5,1
C20:0*	1,8	5,2	12,1	5,5	2,6	1,1
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,8	1,0	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0

C22:0*	0,0	0,7	6,0	1,3	0,8	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,0	3,0	0,0	3,1	2,3	1,2
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	1,5	4,1	1,4	4,3	2,7	1,0
C20:5 N3*	18,2	38,6	2,7	38,6	39,5	45,5
C24:0*	0,0	0,0	4,7	0,6	0,0	0,3
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	11,9	28,2	8,6	29,6	18,0	14,7
C22:5 N3*	1,1	3,4	0,0	3,5	2,5	2,2
C22:6 N3*	253,5	566,7	102,2	575,0	475,3	447,2
Tổng tất các FAME	408,6	926,5	362,3	951,3	730,4	672,5

Bảng 8: Thành phần axit béo của mẫu A2 tính bằng phần trăm trọng lượng tổng các FAME

	Sinh khối	Dầu thô	Các sterol este	TAG	FFA	DAG
Axit béo	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2
C14:0*	1,4	1,4	2,4	1,5	1,3	0,8
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,3	0,4	0,8	0,4	0,3	0,3
C16:0*	25,8	25,2	50,7	25,9	21,9	20,4
C16:1*	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
C18:0*	1,6	1,8	6,5	1,8	1,5	0,8
C18:1 N9*	0,0	0,8	1,4	0,5	0,3	0,4
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	0,2	0,2	0,2	0,1	0,8
C20:0*	0,4	0,6	3,3	0,6	0,4	0,2
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0*	0,0	0,1	1,7	0,1	0,1	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	0,3	0,3	0,0	0,3	0,3	0,2
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

C20:4 N3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2
C20:5 N3*	4,5	4,2	0,7	4,1	5,4	6,8
C24:0*	0,0	0,0	1,3	0,1	0,0	0,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	2,9	3,0	2,4	3,1	2,5	2,2
C22:5 N3*	0,3	0,4	0,0	0,4	0,3	0,3
C22:6 N3*	62,0	61,2	28,2	60,4	65,1	66,5
Tổng FAME, %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Ví dụ 4

Các triaxylglyxerit (các TAG) được phân lập từ mẫu dầu vi sinh vật đã chiết xuất trước từ *thraustochytrid* phân lập lưu trữ với số truy cập ATCC PTA-9695, bằng cách chiết với hexan (mẫu A1) hoặc bằng quy trình FRIOLEX® (GEA Westfalia Separator UK Ltd., Milton Keynes, Anh quốc) (mẫu A2), như được trình bày ở Ví dụ 3. Phần trăm diện tích tương đối của mỗi đồng phân TAG được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo không chứa nước (NARP-HPLC) kết hợp với sự phát hiện bằng phổ khối ion hoá hoá học ở áp suất khí quyển (APCI-MS), và nhận dạng thử mỗi đồng phân vị trí bằng các kiểu phân mảnh trong phổ khối.

Các loại lipid riêng biệt, bao gồm các TAG, được phân tách bằng sắc ký nhanh. Phân tích phân đoạn TAG bằng HPLC/APCI-MS để xác định xem gốc axit nào có mặt trong mỗi loại TAG. Việc nhận dạng thử mỗi đỉnh TAG được thực hiện dựa vào thời gian lưu và phổ khối APCI ứng với mỗi đỉnh. Khi sử dụng NARP-HPLC thì thời gian lưu của mỗi TAG tăng theo số đương lượng cacbon (ECN), mà con số này được xác định là tổng số nguyên tử cacbon trong tất cả các mạch axyl trừ đi hai lần số liên kết đôi. Hơn nữa, khi sử dụng các điều kiện sắc ký tối ưu, thì các cặp TAG khó chia tách, có cùng ECN nhưng có sự phân bố khác nhau các gốc axit béo no và không no, cũng như các axit béo có độ dài mạch khác nhau, đều có thể chia tách được. Các phổ khối APCI ứng với mỗi đỉnh TAG cho biết các khối lượng của ion phân tử bị gắn thêm proton $[M + H]^+$, các ion cộng amoni $[M + NH_4]^+$ và các ion mảnh DAG. Mỗi TAG cho một phổ khối riêng, còn khối lượng của các ion mảnh DAG giúp nhận ra mỗi loại TAG. Ion mảnh ứng với sự mất một nhóm axyl từ vị trí *sn*-2 sẽ có cường độ thấp nhất trong phổ APCI bởi vì ion này kém thuận lợi hơn về mặt năng lượng so với sự mất nhóm axyl ở vị trí *sn*-1 hoặc vị trí *sn*-3 (xem tài liệu: *Modern Methods for Lipid Analysis by Liquid Chromatography Mass Spectrometry and Related Techniques* 276-297 (William Craig Byrdwell ed., 2005)).

Sắc ký nhanh - Sắc ký nhanh được sử dụng để chia tách các loại lipid có mặt trong dầu thô và để xác định phần trăm theo trọng lượng của mỗi loại lipid có mặt trong dầu này. Hệ sắc ký sử dụng silicagel 60 với pha động gồm ete petrol và etyl axetat, ở tốc độ dòng 3 ml/phút. Gradient nấc được sử dụng để rửa giải chọn lọc mỗi loại lipid ra khỏi cột. Gradient pha động bắt đầu từ 100% ete petrol và kết thúc với 50% etyl axetat (sau đó rửa bằng metanol 100%). Các phân đoạn được thu vào các ống nghiệm có dung tích 20 ml, sử dụng bộ thu phân đoạn có giá lộng Gilson FC 204 (Gilson, Inc., Middleton, WI). Từng ống nghiệm được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) và các ống chứa các loại lipid riêng biệt (được phán đoán bằng sự có mặt chỉ của một vết trên bản TLC với R_f theo dự đoán) được gộp lại, cô tới khô và cân. Sau đó, tổng hàm lượng phân đoạn được xác định bằng phương pháp trọng lượng.

Phân tích bằng TLC - Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên các bản trắng silicagel. Các bản này được rửa giải bằng hệ dung môi gồm ete petrol: etyl ete : axit axetic (80:20:1) và được hiện vết bằng hơi iot. Các giá trị R_f của mỗi vết sau đó được so sánh với các giá trị đã được thông báo trong tài liệu tham khảo cho mỗi loại lipid.

Phân tích HPLC/APCI-MS - Hệ thống LC/MS được sử dụng gồm thiết bị HPLC kiểu 1100 Hewlett Packard có trang bị phổ khối ion hoá hoá học ở áp suất khí quyển (APCI) và detector chọn lọc khối lượng (MSD) kiểu 1100 Hewlett Packard (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). Phương pháp HPLC này sử dụng hai cột C18 PHENOMENEX® (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m; Phenomenex, Inc. (Torrance, CA)) mắc nối tiếp với nhau, với tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích bơm mẫu 0,2 μ l và nhiệt độ cột 50°C. Pha động gồm 0,1% amoni axetat trong isopropanol (dung môi A) và axetonitril (dung môi B). Gradient tuyến tính được sử dụng bắt đầu từ tỷ lệ 20% dung môi A, tăng dần tới tỷ lệ 75% dung môi A trong thời gian 40 phút, duy trì ở tỷ lệ 75% trong thời gian 5 phút, rồi trở về tỷ lệ 20% dung môi A trong thời gian 1 phút, và duy trì ở tỷ lệ 20% dung môi A trong thời gian 9 phút nữa. Khoảng khối lượng của MSD được thiết lập ở m/z 400-1150, với thể của bộ phân mảnh là 150, tốc độ dòng khí làm khô 6 l/phút, áp suất của đầu phun 45 psig (=31 N/cm²), nhiệt độ của khí làm khô 350°C, nhiệt độ của bộ hoá hơi 325°C, điện thế của mao quản 3.500 V và cường độ dòng điện hóa 10 μ A.

Triđocosaheptaenoic (Tri-DHA) - Tri-DHA STD (NuCheck, Elysian, MN) được sử dụng để đánh giá hệ thống sắc ký và độ chính xác của đáp ứng detector. Thời gian lưu của đỉnh Tri-DHA là 22,5 phút và toàn bộ sắc ký đồ ion (TIC) có tỷ lệ tín hiệu/tiếng ồn

thích hợp. Các phổ khối APCI tương ứng với đỉnh Tri-DHA cho thấy ion phân tử được gắn với proton $[M + H]^+$ ở m/z 1.023,7, các ion cộng amoni $[M + NH_4]^+$ ở m/z 1.040,8 và một ion mảnh DAG đặc trưng ở m/z 695,5.

Mẫu phân đoạn TAG đã phân lập được chuẩn bị trong hexan và phân tích bằng phương pháp NARP HPLC/APCI-MS để nhận dạng các đồng phân TAG riêng biệt.

Phổ khối tương ứng với mỗi đỉnh được đánh giá và thử nhận dạng từng gốc axit béo; kết quả được tổng hợp trong các Bảng 9 và 10 dưới đây.

Bảng 9: Nhận dạng thử các loại TAG bằng LC/APCI-MS trong mẫu A1

Thời gian lưu	Đỉnh số	Nhận dạng thử (<i>sn-1/sn-2/sn-3</i>)	% Diện tích	$[M + H]^+$	$[M + NH_4]^+$	Các mảnh (DAG) chính
21,4	1	EPA/EPA/DHA	0,3	971,7	988,8	643,5; 669,3
21,9	2	DHA/DHA/EPA	4,4	997,8	1014,7	669,5; 695,5
22,4	3	DHA/DHA/DHA	11,6	1023,7	1040,7	695,5
23,3	4	DHA/ARA/DHA	0,5	999,6	1016,7	671,4
23,6	5	DHA/DPA/DHA	0,2	1025,9	1042,8	697,5
24,1	6	DHA/DHA/ARA	0,7	999,7	1016,8	671,5; 695,5
24,6	7	DHA/DHA/DPA	2,4	1025,7	1042,5	695,5; 697,4
25,3	8	EPA/14:0/DHA	0,3	897,6	914,6	569,4; 595,3
25,9	9	DHA/DHA/14:0	2,6	923,7	940,7	595,4; 695,5
27,2	10	DHA/DHA/15:0	0,4	937,8	954,7	609,5; 695,5
27,5	11	EPA/EPA/16:0	0,2	899,5	916,7	597,5; 643,5
28,0	12	DHA/16:0/EPA	4,7	925,8	942,7	597,4; 623,5; 669,5
28,5	13	DHA/DHA/16:0	30,8	951,7	968,7	623,7; 695,5
29,5	14	DHA/ARA/16:0	0,7	927,6	944,7	599,5; 671,5
29,7	15	DHA/DPA/16:0	0,9	953,7	970,8	625,5; 697,5
30,4	16	DHA/16:0/ARA	0,9	927,7	944,6	599,5; 623,5
30,8	17	DHA/16:0/DPA	4,5	953,8	970,7	623,4; 625,3
31,1	18	DHA/18:0/DHA	1,8	979,7	996,7	651,5
32,3	19	DHA/14:0/16:0	2,3	851,7	868,7	523,5
33,6	20	DHA/15:0/16:0 DHA/20:0/DHA	0,8	865,7 1007,8	882,7 1024,9	537,4 679,5
34,9	21	DHA/16:0/16:0	19,3	879,7	896,7	551,5; 623,5
36,1*	22	DHA/22:0/DHA	0,5	1035,8	1052,8	707,7
		DHA/18:0/15:0		893,8	910,8	565,5
		DPA/16:0/16:0		881,8	898,8	551,5; 625,4
37,4	23	DHA/16:0/18:0	3,7	907,7	924,7	579,5; 623,5
38,9	24	16:0/16:0/14:0	0,3	Không phân tích	796,7	523,4; 551,5
40,1	25	DHA chứa TAG	0,4	1117,9	1134,9	789,7
40,8	26	DHA chứa TAG	0,4	1091,9	1108,9	763,7

41,3	27	16:0/16:0/16:0	1,0	Không phân tích	824,6	551,5
42,0	28	DHA/16:0/22:0	0,2	963,8	980,8	623,3; 635,4
43,5*	29	DHA/20:0/22:1 16:0/20:0/14:0	0,3	1017,8 835,6	1034,8 852,8	689,7 579,5; 607,5
45,6*	30	DHA/22:0/22:1	0,7	1045,8	1062,8	717,7
46,3*	31	DHA/20:0/22:0	0,5	1019,8	1036,9	691,7

Bảng 10: Nhận dạng thử các loại TAG bằng LC/APCI-MS trong mẫu A2

Thời gian lưu	Đỉnh số	Nhận dạng thử (<i>sn-1/sn-2/sn-3</i>)	% Diện tích	[M + H] ⁺	[M + NH ₄] ⁺	Các mảnh (DAG)
21,4	1	EPA/EPA/DHA	0,3	971,7	988,8	643,5; 669,3
21,9	2	DHA/DHA/EPA	4,5	997,8	1014,7	669,5; 695,5
22,3	3	DHA/DHA/DHA	14,0	1023,7	1040,7	695,5
23,3	4	DHA/ARA/DHA	0,6	999,6	1016,7	671,4
23,6	5	DHA/DPA/DHA	0,3	1025,9	1042,8	697,5
24,1	6	DHA/DHA/ARA	0,9	999,7	1016,8	671,5; 695,5
24,6	7	DHA/DHA/DPA	3,0	1025,7	1042,5	695,5; 697,4
25,4	8	EPA/14:0/DHA	0,2	897,6	914,6	569,4; 595,3
25,9	9	DHA/DHA/14:0	2,1	923,7	940,7	595,4; 695,5
27,2	10	DHA/DHA/15:0	0,5	937,8	954,7	609,5; 695,5
27,6	11	EPA/EPA/16:0	0,2	899,5	916,7	597,5; 643,5
28,1	12	DHA/16:0/EPA	4,2	925,8	942,7	597,4; 623,5; 669,3
28,5	13	DHA/DHA/16:0	31,4	951,7	968,7	623,7; 695,5
29,6	14	DHA/ARA/16:0	0,7	927,6	944,7	599,5; 671,5
29,8	15	DHA/DPA/16:0	0,6	953,7	970,8	625,5; 697,5
30,4	16	DHA/16:0/ARA	0,9	927,7	944,6	599,5; 623,5
30,8	17	DHA/16:0/DPA	4,5	953,8	970,7	623,4; 625,3
31,1	18	DHA/18:0/DHA	2,2	979,7	996,7	651,5
32,4	19	DHA/14:0/16:0	1,5	851,7	868,7	523,5
33,6	20	DHA/15:0/16:0 DHA/20:0/DHA	0,9	865,7 1007,8	882,7 1024,9	537,4 679,5
34,9	21	DHA/16:0/16:0	16,1	879,7	896,7	551,5; 623,5
36,1*	22	DHA/22:0/DHA DHA/18:0/15:0 DPA/16:0/16:0	0,4	1035,8 893,8 881,8	1052,8 910,8 898,8	707,7 565,5 551,5; 625,4
37,3	23	DHA/16:0/18:0	3,4	907,7	924,7	579,5; 623,5
39,7	24	16:0/16:0/14:0	0,9	Không phân tích	796,7	523,4; 551,5
40,0	25	DHA chứa TAG	0,8	1117,9	1134,9	789,7
40,8	26	DHA chứa TAG	0,6	1091,9	1108,9	763,7
41,3	27	16:0/16:0/16:0	0,7	Không phân tích	824,6	551,5
42,1	28	DHA/16:0/22:0	0,3	963,8	980,8	623,3; 635,4

43,5*	29	DHA/20:0/22:1 16:0/20:0/14:0	0,2	1017,8 835,6	1034,8 852,8	689,7 579,5; 607,5
45,6*	30	DHA/22:0/22:1	0,8	1045,8	1062,8	717,7
46,3*	31	DHA/20:0/22:0	0,7	1019,8	1036,9	691,7

Ví dụ 5

Sau khi dầu được chiết từ canh lên men bằng quy trình Friolex như được trình bày ở Ví dụ 3, dầu thô tiếp tục được chế biến thông qua các bước tinh chế, tẩy trắng và khử mùi để thu được dầu cuối. Dầu cuối được pha loãng bằng dầu hướng dương có hàm lượng axit oleic cao để thu được dầu thương phẩm hoàn tất với hàm lượng DHA xấp xỉ 400 mg/g. Các loại lipit được tách thành loại riêng biệt và thành phần axit béo của mỗi loại lipit đã được xác định bằng sắc ký khí, với detector ion hoá ngọn lửa (GC-FID), dưới dạng các metyl este của axit béo (FAME).

Sắc ký nhanh - sắc ký nhanh được sử dụng để chia tách các loại lipit có trong dầu cuối và để xác định phần trăm theo trọng lượng mỗi loại lipit có trong dầu này. Hệ sắc ký sử dụng silicagel 60 (EMD Chemical, Gibbstown, NJ) với pha động gồm ete petrol và etyl axetat, ở tốc độ dòng 3 ml/phút. Gradient nấc được sử dụng để rửa giải chọn lọc mỗi loại lipit ra khỏi cột. Gradient pha động bắt đầu từ 100% ete petrol và kết thúc với 50% etyl axetat (sau đó rửa bằng metanol 100%). Các phân đoạn được thu vào các ống nghiệm có dung tích 10 ml, sử dụng bộ thu phân đoạn có giá rộng Gilson FC 204 (Gilson, Inc., Middleton, WI). Từng ống nghiệm được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) và các ống chứa các loại lipit riêng biệt (được phán đoán bằng sự có mặt chỉ của một vết trên bản TLC với hệ số giữ theo dự đoán (R_f)) được gộp lại, cô tới khô và cân. Sau đó, tổng hàm lượng phân đoạn được xác định bằng phương pháp trọng lượng.

Phân tích TLC - Phân tích bằng sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên các bản silicagel. Các bản này được giải hấp bằng hệ dung môi gồm ete petrol: etyl ete: axit axetic (80:20:1) và được hiện vết bằng hơi iot. Các giá trị R_f của mỗi vết sau đó được so sánh với các giá trị đã được thông báo trong tài liệu tham khảo cho mỗi loại lipit.

Phân tích axit béo - Mẫu dầu cuối và các loại lipit đã phân lập được phân tích về thành phần axit béo dưới dạng các metyl este của axit béo (các FAME). Các mẫu được cân trực tiếp trong các ống nghiệm với nắp có ren, rồi thêm vào mỗi ống 1 ml chuẩn nội 09:0 (NuCheck, Elysian, MN) trong toluen và 2 ml dung dịch HCl 1,5 N trong metanol. Các ống nghiệm được lắc tròn mạnh trong giấy lát và đặt lên bộ gia nhiệt trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 100°C. Các ống nghiệm được lấy ra khỏi bộ gia nhiệt, để nguội và thêm

vào đó 1 ml dung dịch NaCl bão hoà trong nước. Các ống nghiệm lại được lắc tròn mạnh, ly tâm; phần lớp trên (lớp hữu cơ) được cho vào lọ GC (sắc ký khí) và phân tích bằng phương pháp GC-FID. Các FAME được định lượng nhờ sử dụng đồ thị chuẩn nội có ba điểm được xây dựng với chuẩn tham chiếu Nu-Chek-Prep GLC (Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN) và được nhận dạng thử dựa vào thời gian lưu. Các axit béo có mặt được biểu diễn hàm lượng bằng mg/g và bằng % trong tổng các FAME.

Mẫu được chuẩn bị bằng cách hoà tan 250 mg dầu cuối trong 600 µl hexan và đưa lên đầu cột sắc ký. Sau khi phân đoạn mẫu này bằng sắc ký nhanh, thì xác định được phân đoạn este sterol chiếm 1,2% theo trọng lượng, phân đoạn triaxylglyxerol (TAG) chiếm 92,1% theo trọng lượng, phân đoạn axit béo tự do (FFA) chiếm 2,1% theo trọng lượng, phân đoạn sterol chiếm 1,1% theo trọng lượng và phân đoạn điaxylglyxerol (DAG) chiếm 2,8% theo trọng lượng, trong dầu cuối.

Phân tích bằng TLC các phân đoạn đã gộp lại cho thấy rằng, các phân đoạn FFA và sterol bị trộn lẫn với TAG và DAG, tương ứng. Toàn bộ thành phần axit béo của mẫu dầu cuối FRIOLEX® nêu trên và của các phân đoạn phân lập được trình bày ở Bảng 11 và Bảng 12 dưới đây, tính theo mg/g và % FAME, tương ứng.

Bảng 11: Thành phần axit béo trong dầu cuối tính bằng miligam trên gam FAME

	Dầu cuối	Các este sterol	TAG	FFA	Sterol	DAG
% Trọng lượng	Không phân tích	1,2	92,1	2,1	1,1	2,8
Axit béo	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0,0	0,0	1,0	0,0	1,2	0,6
C14:0*	11,5	5,1	11,3	6,0	9,6	5,7
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	2,3	0,0	2,3	1,2	2,0	1,9
C16:0*	183,3	80,0	180,8	99,9	149,3	132,2
C16:1*	0,0	0,0	0,9	0,0	0,8	0,6
C18:0*	19,6	17,5	19,6	7,5	16,2	6,7
C18:1 N9*	243,3	242,8	249,6	62,9	190,5	84,0
C18:1 N7	1,9	1,7	2,0	0,8	1,9	0,9
C18:2 N6*	13,8	5,6	13,8	6,2	14,3	9,1
C20:0*	4,3	6,6	4,5	1,5	3,6	1,4
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,7	1,3	0,9	0,4
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
C22:0*	3,3	61,0	3,2	1,1	3,0	1,2
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,7	0,0	2,3	1,4	1,9	1,3
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	2,4	4,5	3,0	2,2	2,6	1,3
C20:5 N3*	28,1	3,0	27,7	38,6	25,6	43,2
C24:0*	1,4	64,3	1,4	0,0	2,0	1,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	20,0	7,6	21,0	10,1	17,2	14,4
C22:5 N3*	2,8	0,0	3,1	3,7	3,4	2,9
C22:6 N3*	407,1	72,5	417,4	443,6	350,5	428,5
Tổng tất cả các FAME	936,1	572,1	967,6	688,0	797,3	737,3

Bảng 12: Thành phần axit béo của dầu cuối tính bằng phần trăm trong tổng FAME

	Dầu cuối	Các este sterol	TAG	FFA	Sterol	DAG
Axit béo	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1
C14:0*	1,2	0,9	1,2	0,9	1,2	0,8
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,3
C16:0*	19,6	14,0	18,7	14,5	18,7	17,9
C16:1*	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1
C18:0*	2,1	3,1	2,0	1,1	2,0	0,9
C18:1 N9*	26,0	42,4	25,8	9,1	23,9	11,4
C18:1 N7	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1
C18:2 N6*	1,5	1,0	1,4	0,9	1,8	1,2
C20:0*	0,5	1,1	0,5	0,2	0,5	0,2
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0*	0,4	10,7	0,3	0,2	0,4	0,2
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,3	0,8	0,3	0,3	0,3	0,2
C20:5 N3*	3,0	0,5	2,9	5,6	3,2	5,9
C24:0*	0,2	11,2	0,1	0,0	0,2	0,1
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	2,1	1,3	2,2	1,5	2,2	1,9
C22:5 N3*	0,3	0,0	0,3	0,5	0,4	0,4
C22:6 N3*	43,6	12,7	43,1	64,5	44,0	58,1

Tổng FAME, %	100	100	100	100	100	100
--------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Ví dụ 6

Việc phân tích các triaxylglyxerit (các TAG) trong dầu cuối trình bày ở Ví dụ 5 được thực hiện theo các kỹ thuật trình bày ở Ví dụ 4. Việc nhận dạng thử mỗi gốc axit béo đã được thực hiện; kết quả được tổng hợp trong các Bảng 13 và 14 dưới đây.

Bảng 13: Nhận dạng thử các loại TAG chính

Thời gian lưu của đỉnh, phút	Nhận dạng thử (<i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2/ <i>sn</i> -3)	Phần trăm diện tích
22,0	DHA/DHA/EPA	3,4
22,5	DHA/DHA/DHA	10,4
24,7	DHA/DHA/DPA	2,1
28,2	DHA/16:0/EPA	3,4
28,7	DHA/16:0/DHA	23,0
31,0	DHA/16:0/DPA	3,3
35,2	DHA/16:0/16:0	11,6
37,6	DHA/16:0/18:0	4,3
40,4	18:1/18:1/18:1	14,0

Bảng 14: Nhận dạng thử các loại TAG bằng LC/APCI-MS

Thời gian lưu	Đỉnh số	Nhận dạng thử (<i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2/ <i>sn</i> -3)	% Diện tích	[M + H] ⁺	[M + NH4] ⁺	Các mảnh (DAG)
21,5	1	EPA/EPA/DHA	0,4	971,7	988,7	643,5; 669,5
22,0	2	DHA/DH A/EPA	3,4	997,8	1014,7	669,4; 695,5
22,5	3	DHA/DHA/DHA	10,4	1023,8	1040,7	695,5
23,4	4	DHA/DHA/ARA	0,5	999,8	1016,7	671,4; 695,3
23,7	5	DHA/DPA/DHA	0,3	1025,7	1042,7	697,5
24,2	6	DHA/DHA/ARA	0,8	999,7	1016,8	671,5; 695,5
24,7	7	DHA/DH A/DPA	2,1	1025,7	1042,5	695,5; 697,4
25,6	8	EPA/14:0/DHA	0,2	897,7	914,8	569,4; 595,3
26,1	9	DHA/14:0/DHA	1,4	923,7	940,7	595,5; 695,5
27,4	10	DHA/15:0/DHA	0,3	937,8	954,8	609,3
27,7	11	EPA/16:0/EPA	0,2	899,5	916,7	597,5
28,2	12	DHA/16:0/EPA	3,4	925,7	942,7	597,5; 623,4; 669,3
28,7	13	DHA/16:0/DHA	23,0	951,7	968,7	623,5; 695,5
29,8	14	DHA/16:0/ARA	0,5	927,7	944,8	599,5; 623,5
30,0	15	DHA/16:0/DPA	0,7	953,8	970,8	623,4; 625,5
30,6	16	DHA/16:0/ARA	0,8	927,7	944,8	599,5; 623,5
31,0	17	DHA/16:0/DPA	3,3	953,7	970,7	623,4; 625,5
31,3	18	DHA/18:0/DHA	1,6	979,8	996,8	651,5
32,6	19	DHA/14:0/16:0	1,6	851,8	868,8	523,5
33,9	20	DHA/15:0/16:0	0,8	865,7	882,7	537,4
35,2	21	DHA/20:0/DHA	11,6	1007,8	1024,8	679,5
		DHA/16:0/16:0		879,7	896,8	551,5; 623,5
36,4	22	DHA/22:0/DHA		1035,8	1052,8	707,7
		DHA/18:0/15:0	0,5	893,8	910,8	565,5
		DPA/16:0/16:0		881,8	898,8	551,5; 625,4
37,6	23	DHA/16:0/18:0	4,3	907,8	924,8	579,5; 623,5
40,0	24	DHA/16:0/20:0	0,8	935,8	952,8	607,6; 623,5
40,4	25	18:1/18:1/18:1	14,0	885,8	902,8	603,5
40,7	26	18:1/16:0/18:1	2,2	859,8	876,8	577,5
41,1	27	DHA chứa TAG	1,6	1092,0	1108,8	763,7
42,4	28	24:0 chứa TAG	0,5	963,8	980,9	594,5
43,0	29	18:1/18:1/18:0	1,9	887,7	904,8	603,6; 605,6

45,9	30	DHA/22:0/22:1	0,9	1045,9	1062,9	717,6
46,6	31	DHA/20:0/22:0	0,7	1019,8	1036,8	691,5

Ví dụ 7

Bình chứa nguyên liệu cấy hai ngày tuổi *thraustochytrid* đã phân lập lưu trữ với số truy cập ATCC PTA-9695 được chuẩn bị nuôi cấy có cung cấp nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ, cùng với 980 ppm Cl⁻ (môi trường cho *thraustochytrid*).

Việc gây đột biến được thực hiện theo quy trình sau:

Nguyên liệu cấy T=2 ngày tuổi chứa trong bình vô khuẩn, dung tích khoảng 50 ml, được rót vào bình thủy tinh vô khuẩn để đồng thể hoá, có dung tích 40 ml. Dịch nuôi cấy được nghiền giã 50 lần trong bình đồng thể hoá. Dùng pipet lấy dịch nuôi cấy ra và lọc qua tấm lọc vô khuẩn có kích thước lỗ lọc 50 micron, tấm lọc này được đặt trong ống vô khuẩn có dung tích 50 ml (lỗ lọc được sử dụng làm phương tiện để giữ lại các cụm lớn hơn của các tế bào, trong khi cho các cụm nhỏ hơn và các tế bào đơn lẻ đi qua lỗ có kích thước 50 micron này). Toàn bộ dịch chiết đậm đặc được thu vào ống nghiệm vô khuẩn dung tích 50 ml. Dịch nuôi cấy đã ngâm chiết được lắc tròn mạnh và chuẩn bị các dung dịch loãng ở các mức pha loãng cho tới tỷ lệ 1:100 trong các ống nghiệm có chứa môi trường cho *thraustochytrid*. Các mẫu dịch chiết ngâm đã pha loãng này được lắc tròn mạnh trước khi thêm 200 µl nguyên liệu cấy vào đĩa kính Petri chứa thạch trắng môi trường *thraustochytrid*; đĩa này có kích thước 100 x 15 mm, chứa 4-5 viên bi thủy tinh (kích thước 3 mm). Từng đĩa được lắc nhẹ, cố gắng để các viên bi làm tán đều nguyên liệu cấy ra khắp đĩa. Các viên bi được lấy ra khỏi các đĩa và các đĩa được để yên cùng với nắp đậy trong thời gian khoảng 5 phút để làm khô. Các đèn ở cả chụp vô khuẩn và các vùng bên cạnh đều được tắt, bởi vì quy trình này được tiến hành trong ánh sáng mờ. Cần có ánh sáng ở mức tối thiểu mới có thể tiến hành quy trình này, song chỉ là ánh sáng gián tiếp và mờ.

Năm đĩa kính Petri thí nghiệm lập được đặt lên mặt sàn của thiết bị tạo liên kết ngang XL (Spectronics Corporation, New York) với nắp để ra ngoài, trong khi các mẫu được chiếu bức xạ. Năng lượng cung cấp cho thiết bị tạo liên kết ngang vào cỡ vài microjun và mức năng lượng được chọn để đạt được tỷ lệ Diệt 90%-95%. Năm đĩa đối chứng lập được cấy các tế bào không được gây đột biến theo cùng quy trình. Các số đếm tế bào này được sử dụng để tính tỷ lệ Diệt %. Khi việc chiếu xạ vừa kết thúc, thì các đĩa kính Petri được lấy ra, đậy nắp lại và bọc trong màng parafin, sau đó bọc bằng nhôm lá. Bắt buộc trong tuần đầu tiên, các đĩa đó phải được nuôi cấy trong tối để không có khả

năng sửa chữa các gen đã bị tổn thương.

Các đĩa kính được để trong phòng có nhiệt độ 22,5°C trong thời gian khoảng 10 ngày trước khi đếm các cụm tế bào. Khi đếm xong các con số cuối cùng, các cụm tế bào riêng biệt được nhặt ra bằng vòng cấy vô khuẩn và lại được rải thành vệt lên các đĩa Petri chứa môi trường *thraustochytrid* mới. Mỗi cụm tế bào được đưa lên một đĩa riêng. Khi các tế bào trên các đĩa đã mọc dày đặc thì dùng vòng cấy lấy mẫu ra và cấy vào bình lắc vô khuẩn có dung tích 250 ml, chứa 50 ml môi trường *thraustochytrid*. Bình này được đặt lên máy lắc, lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong phòng có nhiệt độ 22,5°C. Vào ngày T=7 thì sản phẩm nuôi cấy trong bình lắc được thu hoạch vào ống nghiệm vô khuẩn có dung tích 50 ml. Ghi lấy độ pH và quay ly tâm mẫu để thu lấy các viên sinh khối lắng xuống. Rửa từng mẫu và huyền phù hoá lại trong hỗn hợp có tỷ lệ 50:50 isopropyl alcol - nước cất trước khi quay ly tâm lại mẫu. Các viên tế bào được làm đông khô, cân và tiến hành phân tích FAME. Các số liệu trong các Bảng 15-21 trình bày các thể đột biến được tạo ra bằng quy trình nêu trên.

Bảng 15: Các thể đột biến của chủng *Thraustochytrid* có số truy cập ATCC PTA-9695

Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thể đột biến 1	Thể đột biến 2	Thể đột biến 3	Thể đột biến 4	Thể đột biến 5	Thể đột biến 8	Thể đột biến 9	Thể đột biến 10
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,10	0,10	0,08	0,08	0,13	0,07	0,11	0,08	0,08
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,11	0,17	0,13	0,12	0,18	0,11	0,15	0,14
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,85	1,49	1,37	2,36	1,29	1,85	1,72	1,57
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:0	30,98	28,75	29,96	29,97	30,33	29,86	30,97	30,11	29,20
% 16:1	0,27	0,20	0,31	0,14	0,25	0,27	0,16	0,27	0,24
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,15	0,13	0,17	0,27	0,12	0,16	0,13	0,13
% 18:0	1,29	1,22	1,38	1,47	1,22	1,57	1,25	1,34	1,34
% 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,03	0,00	0,00	0,07	0,00	0,03	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,36	0,42	0,45	0,34	0,46	0,37	0,40	0,40
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,38	0,32	0,42	0,44	0,32	0,41	0,33	0,36
% 20:4 ARA	0,55	0,55	0,94	0,57	0,80	0,89	0,60	0,73	0,75
% 20:5 n-3 EPA	2,62	2,94	3,01	2,40	3,64	2,83	2,54	2,81	2,81

Bảng 15 (tiếp)									
Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thế đột biến 1	Thế đột biến 2	Thế đột biến 3	Thế đột biến 4	Thế đột biến 5	Thế đột biến 8	Thế đột biến 9	Thế đột biến 10
% 22:0	0,08	0,08	0,09	0,09	0,07	0,10	0,07	0,09	0,09
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	3,19	3,19	2,94	3,43	3,35	2,87	3,34	3,01	3,15
% 22:5 n-3	0,18	0,18	0,21	0,23	0,20	0,18	0,20	0,17	0,18
% 22:6 n-3 DHA	56,88	58,63	57,56	57,85	54,87	57,98	56,62	57,53	58,52
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00
% Chất béo	46,83	46,10	31,23	47,39	49,78	30,62	54,71	37,72	37,87
% Chất không biết	0,85	0,46	0,35	0,51	0,51	0,36	0,50	0,38	0,39

Bảng 16: Các thể đột biến của chủng *Thraustochytrid* có số truy cập ATCC PTA-9695

Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thể đột biến 11	Thể đột biến 13	Thể đột biến 14	Thể đột biến 15	Thể đột biến 16	Thể đột biến 20	Thể đột biến 21	Thể đột biến 22
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,10	0,10	0,08	0,09	0,11	0,11	0,09	0,09	0,10
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,15	0,16	0,14	0,13	0,12	0,17	0,16	0,13
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,89	1,43	1,75	1,83	1,98	1,76	1,77	1,81
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:0	30,98	31,08	30,27	29,92	31,79	30,18	28,84	30,05	30,81
% 16:1	0,27	0,32	0,26	0,28	0,21	0,24	0,23	0,23	0,33
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,24	0,15	0,13	0,15	0,12	0,14	0,16	0,14
% 18:0	1,29	1,36	1,44	1,31	1,36	1,21	1,28	1,34	1,33
% 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,38	0,42	0,39	0,40	0,37	0,37	0,38	0,38
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,43	0,36	0,33	0,36	0,37	0,33	0,35	0,34
% 20:4 ARA	0,55	0,79	0,72	0,80	0,64	0,62	0,83	0,73	0,69
% 20:5 n-3 EPA	2,62	3,17	2,72	2,97	2,52	2,66	3,03	2,90	2,87
% 22:0	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bảng 16 (tiếp)

Các axil béo	Đối chứng	Thế đột biến 11	Thế đột biến 13	Thế đột biến 14	Thế đột biến 15	Thế đột biến 16	Thế đột biến 20	Thế đột biến 21	Thế đột biến 22
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	3,19	3,25	3,06	2,97	3,07	3,16	2,98	3,01	3,02
% 22:5 n-3	0,18	0,20	0,19	0,17	0,19	0,16	0,17	0,18	0,18
% 22:6 n-3 DHA	56,88	55,17	57,52	57,63	56,02	57,38	58,58	57,45	56,65
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,08
% Chất béo	46,83	46,19	37,00	38,41	48,46	47,32	37,71	40,23	43,55
% Chất không biết	0,85	0,47	0,39	0,36	0,47	0,44	0,37	0,39	0,38

Bảng 17: Các thể đột biến của chủng *Thraustochytrid* có số truy cập ATCC PTA-9695

Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thể đột biến 24	Thể đột biến 26	Thể đột biến 27	Thể đột biến 29	Thể đột biến 30	Thể đột biến 33	Thể đột biến 34	Thể đột biến 35
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,10	0,11	0,09	0,09	0,08	0,08	0,10	0,11	0,09
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,12	0,13	0,14	0,16	0,14	0,12	0,12	0,10
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,98	1,71	1,69	1,63	1,66	1,93	2,01	1,59
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,54	0,39
% 16:0	30,98	30,61	30,32	30,21	29,70	29,50	30,26	32,28	30,78
% 16:1	0,27	0,19	0,22	0,22	0,26	0,26	0,29	0,26	0,16
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,15	0,18	0,16	0,13	0,13	0,26	0,16	0,12
% 18:0	1,29	1,24	1,31	1,31	1,32	1,30	1,32	1,37	1,34
% 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,11	0,09
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,37	0,39	0,40	0,40	0,39	0,37	0,40	0,40
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,14
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,38	0,37	0,35	0,35	0,35	0,00	0,00	0,00
% 20:4 ARA	0,55	0,61	0,59	0,69	0,68	0,32	0,34	0,24	0,28
% 20:5 n-3 EPA	2,62	2,62	2,70	2,85	2,90	2,91	3,28	2,51	2,59
% 22:0	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bảng 17 (tiếp)

Các axit béo	Đối chứng	Thế đột biến 24	Thế đột biến 26	Thế đột biến 27	Thế đột biến 29	Thế đột biến 30	Thế đột biến 33	Thế đột biến 34	Thế đột biến 35
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	3,19	3,10	3,11	3,05	3,10	3,11	3,43	3,26	3,56
% 22:5 n-3	0,18	0,16	0,18	0,19	0,18	0,18	0,18	0,15	0,24
% 22:6 n-3 DHA	56,88	57,03	57,46	57,46	57,96	58,52	55,92	54,96	56,73
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,07	0,07
% Chất béo	46,83	47,80	43,50	38,86	38,60	38,16	46,95	46,43	51,55
% Chất không biết	0,85	0,45	0,42	0,39	0,37	0,82	1,25	1,23	1,25

Bảng 18: Các thể đột biến của chủng *Thraustochytrid* có số truy cập ATCC PTA-9695

Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thể đột biến 36	Thể đột biến 37	Thể đột biến 38	Thể đột biến 39	Thể đột biến 40	Thể đột biến 42	Thể đột biến 43	Thể đột biến 44
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,10	0,00	0,11	0,00	0,11	0,09	0,08	0,12	0,09
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,44	0,09	0,24	0,12	0,11	0,12	0,08	0,15
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,25	1,99	1,48	1,96	1,76	1,43	2,17	1,75
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	2,12	0,48	0,71	0,54	0,55	0,36	0,62	0,50
% 16:0	30,98	26,95	28,04	32,28	30,84	30,25	25,77	43,37	30,18
% 16:1	0,27	0,00	0,26	0,23	0,22	0,21	0,10	1,05	0,22
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,95	0,13	0,28	0,16	0,16	0,10	0,26	0,13
% 18:0	1,29	1,58	1,11	1,79	1,30	1,29	1,25	2,21	1,34
% 18:1 n-9	0,00	0,37	0,08	0,25	0,09	0,09	0,12	0,09	0,10
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,34	0,31	0,43	0,38	0,39	0,36	0,61	0,40
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,14	0,15	0,15	0,49
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:4 ARA	0,55	0,41	0,31	0,24	0,27	0,24	0,30	0,35	0,23
% 20:5 n-3 EPA	2,62	5,36	2,77	4,00	2,72	2,80	3,21	3,47	2,80
% 22:0	0,08	0,00	0,07	0,14	0,07	0,08	0,07	0,14	0,08
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bảng 18 (tiếp)

Các axit béo	Đối chứng	Thế đột biến 36	Thế đột biến 37	Thế đột biến 38	Thế đột biến 39	Thế đột biến 40	Thế đột biến 42	Thế đột biến 43	Thế đột biến 44
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	3,19	2,40	3,94	2,57	3,48	3,29	3,89	2,37	3,33
% 22:5 n-3	0,18	0,00	0,19	0,00	0,17	0,17	0,30	0,33	0,17
% 22:6 n-3 DHA	56,88	57,52	58,57	54,20	56,24	57,09	60,99	41,61	56,76
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08	0,09	0,08	0,06	0,09
% Chất béo	46,83	12,73	54,86	18,08	45,74	42,59	42,48	56,44	41,20
% Chất không biết	0,85	0,29	1,36	0,73	1,28	1,20	1,31	0,90	1,20

Bảng 19: Các thể đột biến của chủng *Thraustochytrid* có số truy cập ATCC PTA-9695

Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thể đột biến 45	Thể đột biến 46	Thể đột biến 47	Thể đột biến 48	Thể đột biến 49	Thể đột biến 50	Thể đột biến 51	Thể đột biến 52
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,10	0,10	0,13	0,11	0,07	0,09	0,09	0,09	0,11
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,11	0,10	0,09	0,13	0,09	0,13	0,10	0,09
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,79	2,07	1,86	1,52	1,62	1,78	1,78	1,85
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,41	0,76	0,57	0,46	0,48	0,55	0,53	0,53
% 16:0	30,98	28,79	24,90	30,07	29,07	31,21	30,46	30,79	32,53
% 16:1	0,27	0,19	0,24	0,18	0,17	0,17	0,18	0,21	0,22
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,11	0,24	0,16	0,12	0,14	0,17	0,18	0,15
% 18:0	1,29	1,24	1,07	1,28	1,41	1,43	1,36	1,48	1,35
% 18:1 n-9	0,00	0,08	0,07	0,09	0,09	0,08	0,10	0,09	0,06
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,12	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,36	0,29	0,37	0,42	0,42	0,39	0,40	0,41
% 20:1 n-9	0,00	0,15	0,13	0,11	0,24	0,13	0,19	0,16	0,19
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:4 ARA	0,55	0,29	0,65	0,26	0,18	0,21	0,22	0,24	0,24
% 20:5 n-3 EPA	2,62	3,05	4,28	2,66	2,93	2,46	2,71	2,94	2,44
% 22:0	0,08	0,07	0,06	0,07	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bảng 19 (tiếp)

Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thế đột biến 45	Thế đột biến 46	Thế đột biến 47	Thế đột biến 48	Thế đột biến 49	Thế đột biến 50	Thế đột biến 51	Thế đột biến 52
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,06	0,07	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	3,19	3,59	4,28	3,46	3,07	3,32	3,17	3,18	3,24
% 22:5 n-3	0,18	0,25	0,27	0,18	0,17	0,17	0,16	0,17	0,17
% 22:6 n-3 <i>DHA</i>	56,88	57,74	58,32	56,70	58,65	56,45	56,83	56,19	55,06
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,07	0,15	0,10	0,10	0,11	0,10	0,10	0,07
% Chất béo	46,83	48,91	58,95	54,80	35,41	48,60	44,93	43,01	51,93
% Chất không biết	0,85	1,55	1,63	1,57	1,09	1,35	1,31	1,28	1,19

Bảng 20: Các thể đột biến của chủng *Thraustochytrid* có số truy cập ATCC PTA-9695

Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thể đột biến 53	Thể đột biến 54	Thể đột biến 55	Thể đột biến 56	Thể đột biến 57	Thể đột biến 58	Thể đột biến 60	Thể đột biến 61	Thể đột biến 65
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,10	0,09	0,08	0,12	0,08	0,08	0,08	0,08	0,10	0,08
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,11	0,12	0,08	0,09	0,13	0,16	0,14	0,09	0,14
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,74	1,63	2,13	1,67	1,59	1,59	1,59	1,85	1,58
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,53	0,52	0,48	0,51	0,52	0,45	0,50	0,51	0,48
% 16:0	30,98	30,13	29,54	33,01	31,08	29,37	30,65	29,39	31,15	30,03
% 16:1	0,27	0,21	0,23	0,26	0,26	0,14	0,25	0,22	0,26	0,25
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,15	0,14	0,14	0,14	0,16	0,12	0,13	0,14	0,13
% 18:0	1,29	1,30	1,30	1,37	1,38	1,37	1,46	1,30	1,30	1,35
% 18:1 n-9	0,00	0,08	0,08	0,00	0,06	0,11	0,09	0,10	0,07	0,07
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,38	0,39	0,40	0,42	0,38	0,43	• 0,39	0,39	0,41
% 20:1 n-9	0,00	0,19	0,16	0,13	0,19	0,20	0,17	0,14	0,13	0,21
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:4 ARA	0,55	0,25	0,21	0,26	0,22	0,25	0,51	0,20	0,24	0,19
% 20:5 n-3 EPA	2,62	2,75	2,78	2,81	2,67	2,78	5,76	2,72	2,59	2,82
% 22:0	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bảng 20 (tiếp)

Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thẻ đột biến 53	Thẻ đột biến 54	Thẻ đột biến 55	Thẻ đột biến 56	Thẻ đột biến 57	Thẻ đột biến 58	Thẻ đột biến 60	Thẻ đột biến 61	Thẻ đột biến 65
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
% 22:5 n-6	3,19	3,47	3,20	3,25	3,19	3,43	2,62	3,30	3,42	3,18
% 22:5 n-3	0,18	0,18	0,18	0,17	0,17	0,20	0,59	0,17	0,17	0,17
% 22:6 n-3 DHA	56,88	56,99	58,07	54,04	56,38	57,76	54,09	58,21	55,91	57,56
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,09	0,09	0,07	0,10	0,09	0,11	0,10	0,07	0,08
% Chất béo	46,83	45,83	39,59	48,81	41,92	43,97	33,96	36,97	50,40	36,21
% Chất không biết	0,85	1,28	1,19	1,19	1,29	1,35	0,77	1,24	1,48	1,17

Bảng 21: Các thể đột biến của chủng *Thraustochytrid* có số truy cập ATCC PTA-9695

Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thể đột biến 66	Thể đột biến 67	Thể đột biến 68 ATCC PTA-9696	Thể đột biến 69	Thể đột biến 70 ATCC PTA-9697	Thể đột biến 71	Thể đột biến 72 ATCC PTA-9698	Thể đột biến 73	Thể đột biến 74
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	2,42	2,29	2,07	2,09	2,11	2,21	2,27	2,29	1,97	2,05
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,55	0,47	0,48	0,47	0,47	0,44	0,46	0,40	0,50	0,47
% 16:0	39,19	31,02	26,20	25,84	27,79	28,14	28,89	33,49	24,50	23,95
% 16:1	0,43	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,21	0,00	0,00
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
% 18:0	1,67	1,68	1,22	1,22	1,44	1,49	1,51	2,24	1,11	1,02
% 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,18	0,20	0,21	0,19	0,17	0,22	0,16	0,22	0,22
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,49	0,41	0,32	0,31	0,35	0,37	0,44	0,52	0,29	0,27
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:4 ARA	0,18	0,16	0,33	0,27	0,24	0,37	0,30	0,27	0,38	0,39
% 20:5 n-3 EPA	1,76	2,30	3,86	3,97	3,32	4,12	3,09	2,74	4,43	4,53
% 22:0	0,33	0,46	0,35	0,44	0,48	0,38	0,43	0,12	0,35	0,34
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bảng 21 (tiếp)

Các axit béo	Đối chứng ATCC PTA-9695	Thẻ đột biến 66	Thẻ đột biến 67	Thẻ đột biến ATCC PTA-9696	Thẻ đột biến 69	Thẻ đột biến ATCC PTA-9697	Thẻ đột biến 71	Thẻ đột biến ATCC PTA-9698	Thẻ đột biến 73	Thẻ đột biến 74
%22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	2,62	2,83	3,17	2,66	2,72	2,95	3,46	2,79	3,17	3,19
% 22:5 n-3	0,18	0,18	0,46	0,42	0,34	0,61	0,25	0,27	0,48	0,57
% 22:6 n-3 DHA	49,52	57,01	60,60	61,42	59,74	58,03	55,62	53,06	61,83	62,23
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% Chất béo	52,70	49,32	48,51	49,49	48,80	53,65	40,38	63,40	48,27	46,63
% Chất không biết	0,35	0,82	0,73	0,66	0,67	0,73	2,46	1,18	0,78	0,76

Ví dụ 8

Bốn mẫu thraustochytrid là lấy từ Trung tâm lưu trữ chủng giống chuẩn của Mỹ (ATCC) và mỗi mẫu được phân tích về thành phần axit béo của sinh khối, thành phần axit béo của dầu thô được chiết ra, thành phần axit béo của phân đoạn triaxylglyxerit (TAG) trong dầu thô và phân đoạn lipit phân cực (PL) trong dầu thô. Các mẫu được phân tích là các mẫu ATCC 34304, 20890, 20889 và 20892. Các chủng này được cấy vào bình lắc có dung tích 250 ml chứa 50 ml môi trường có thành phần như sau: 1 g pepton, 1 g chiết phẩm nấm men, 5 g glucoza trong 1 lít nước biển nhân tạo. Các dịch nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 20°C, đồng thời lắc với tốc độ 200 vòng/phút trên máy lắc tròn. Sau 7 ngày, các sản phẩm nuôi cấy được thu hoạch bằng ly tâm (5087 x g), rửa bằng hỗn hợp nước/isopropanol (tỷ lệ 1:1) và lại ly tâm. Các viên tạo thành do ly tâm được làm đông khô. Dầu thô được chiết từ sinh khối khô này theo phương pháp Bligh và Dyer (xem tài liệu: *Can. J. of Biol. And Phys.* 37: 911-917 (1959)). Các TAG và các PL được phân lập từ dầu thô bằng cách sử dụng phương pháp cải biến từ phương pháp chiết pha rắn (SPE) do Kaluzny et al. đề xướng (xem tài liệu: *J. Lipid Res.* 26: 135-140 (1959)). Dầu thô và các phân đoạn phân lập được phân tích về hàm lượng DHA và EPA cũng như hàm lượng axit béo toàn phần (dưới dạng các metyl este của axit béo).

Chiết lipit - Dầu thô được chiết từ sinh khối đã làm đông khô theo cách: cân 100 đến 200 mg cho vào ống nghiệm kích thước 1,5 x 10 cm, có nắp ren; thêm vào đó 8 ml hệ một pha là hỗn hợp gồm clorofom:metanol:nước (CHCl_3 :MeOH:H₂O) có tỷ lệ 1:2:0,8, rồi đồng thể hoá bằng cách sử dụng bộ thiết bị phân tán POLYTRON® PT 3100 có trang bị cụm máy PT-DA 3012/2. Mẫu được đồng thể hoá trong thời gian 2 phút ở tốc độ 10.000 vòng phút trong khi được ngâm vào bể cách nước đá. Hệ hai pha được tạo ra bằng cách thêm 2,1 ml CHCl_3 , lắc tròn mạnh trong thời gian 1 phút, thêm 1,7 ml H₂O, rồi lại lắc tròn mạnh trong thời gian 1 phút nữa. Lớp dưới (lớp hữu cơ) được lấy ra bằng pipet Pasteur và cho vào bình thu. Lớp MeOH- H₂O nằm lại trong ống nghiệm lại được chiết hai lần nữa bằng các phần 2,1 ml CHCl_3 . Các lớp chiết hữu cơ được gộp lại và làm khan dưới luồng khí nitơ.

Chiết pha rắn - Các phân đoạn TAG và PL được tách từ lipit thô bằng phương pháp SPE nhờ sử dụng các cột ngấn nhồi sẵn chứa 500 mg aminopropyl (Burdick & Jackson) đặt trong thiết bị Vac Elut. Ắn cột ngấn này được điều hoà bằng 5 ml hexan; 10 đến 20 mg mỗi mẫu được hoà tan trong 400 μl CHCl_3 và được đưa lên cột. Rửa cột bằng 4 ml hỗn hợp CHCl_3 :isopropyl alcol (IPA) có tỷ lệ 2:1 để giải hấp tất cả các lipit trung

tính; các lipit này được thu lấy và làm khô bằng luồng khí nitơ. Sau đó, các axit béo được giải hấp bằng 5 ml axit axetic (HOAc) 2% trong ete; các axit béo này bị loại bỏ. Phần PL được giải hấp bằng 5 ml MeOH; phần này được thu lấy và làm khô bằng luồng khí nitơ. Phân đoạn lipit trung tính được hoà tan lại trong 400 µl hexan và đưa lên cột aminopropyl thứ hai (được điều hoà trước bằng 5 ml hexan). Các este sterol được giải hấp bằng 5 ml etyl axetat (EtOAc) 1% trong hexan và được loại bỏ. Cuối cùng, các TAG được giải hấp bằng 5 ml EtOAc 3% trong hexan; các TAG này được thu lấy và làm khô bằng luồng khí nitơ.

Phân tích TLC - Phân tích bằng sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên các bản silicagel. Các bản này được giải hấp bằng hệ dung môi gồm ete petrol: etyl ete : axit axetic (80:20:1) và được hiện vết bằng hơi iot.

Phân tích axit béo - Các mẫu sinh khối, dầu thô, các phân đoạn TAG và PL đã phân lập được phân tích về thành phần axit béo dưới dạng các metyl este của axit béo (các FAME). Các mẫu được cân trực tiếp trong các ống nghiệm với nắp có ren, rồi thêm vào mỗi ống 1 ml chuẩn nội 09:0 trong toluen và 2 ml dung dịch HCl 1,5 N trong metanol. Các ống nghiệm được lắc tròn mạnh trong giây lát và đặt lên bộ gia nhiệt trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 100°C. Các ống được lấy ra khỏi bộ gia nhiệt, để nguội và thêm vào đó 1 ml dung dịch NaCl bão hoà trong nước. Các ống nghiệm lại được lắc tròn mạnh, ly tâm; phần lớp trên (lớp hữu cơ) được cho vào lọ GC (sắc ký khí) và phân tích bằng phương pháp GC-FID. Các FAME được định lượng nhờ sử dụng đồ thị chuẩn nội có ba điểm được xây dựng với chuẩn tham chiếu Nu-Chek-Prep GLC và được nhận dạng thử dựa vào thời gian lưu. Các axit béo có mặt được biểu diễn hàm lượng bằng mg/g và bằng % trong tổng các FAME.

ATCC 34304 - Hàm lượng lipit của sinh khối ATCC 34304 được đánh giá là 9,1% dưới dạng tổng FAME, còn lượng dầu thô thu được sau khi chiết bằng dung môi là 9,2% theo trọng lượng, cho tỷ lệ thu hồi 101% chất béo có trong sinh khối. Hàm lượng EPA và DHA của sinh khối được xác định là 4,8 mg/g và 38,7 mg/g, tương ứng. Dầu thô chiết được chứa 25,9 mg/g EPA và 238,7 mg/g DHA. TAG tách được chứa 13,9 mg/g EPA và 303,9 mg/g DHA, trong khi PL phân lập được chứa 38,7 mg/g EPA và 237,980 mg/g DHA. Các thành phần axit béo toàn phần của sinh khối, của dầu thô chiết được, của phân đoạn TAG và phân đoạn PL được nêu ra dưới đây, trong các Bảng 22 và 23, tính bằng mg/g và % FAME, tương ứng.

Bảng 22: Thành phần axit béo của ATCC 34304 tính bằng miligam trên gam

	Sinh khối	Dầu thô	TAG	PL
Axit béo	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	1,5	8,5	13,7	1,5
C14:1*	0,0	0,2	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	20,8	138,9	250,8	73,9
C16:1*	0,2	2,9	6,9	0,3
C18:0*	2,1	17,8	45,6	0,8
C18:1 N9*	3,8	29,8	74,2	4,2
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	1,5	12,0	31,0	2,5
C20:0*	0,1	0,7	1,7	0,1
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,1	0,3	0,0
C18:4 N3	0,0	8,5	0,3	0,0
C20:2 N6*	0,1	0,8	2,2	0,0
C20:3 N6	0,0	2,5	6,3	0,5
C22:0*	0,3	5,2	0,3	0,0
C20:4 N7	0,4	2,7	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,6	0,0
C20:4 N6*	3,4	20,8	20,9	27,5
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,1	0,6	1,3	0,3
C20:5 N3*	4,8	25,9	13,9	38,7
C24:0*	0,4	0,2	0,3	0,0
C22:4 N9	0,0	1,2	0,7	0,4
C24:1 N9*	0,9	6,9	18,2	0,8
C22:5 N6*	11,0	60,8	51,9	45,9
C22:5 N3*	0,4	3,1	6,8	1,0
C22:6 N3*	38,7	238,7	303,9	237,9
Tổng tất cả FAME	91,2	590,9	855,7	437,3

Bảng 23: Thành phần axit béo của ATCC 34304 tính bằng phần trăm trong tổng FAME

	Sinh khối	Dầu thô	TAG	PL
Axit béo	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	1,7	1,5	1,6	0,4
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	22,8	24,2	29,3	16,9
C16:1*	0,2	0,5	0,8	0,1

C18:0*	2,3	3,1	5,3	0,2
C18:1N9*	4,2	5,2	8,7	1,0
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	1,6	2,1	3,6	0,6
C20:0*	0,1	0,1	0,2	0,0
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:2 N6*	0,1	0,1	0,3	0,0
C20:3 N6	0,0	0,4	0,7	0,1
C22:0*	0,3	0,9	0,0	0,0
C20:4 N7	0,5	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,1	0,0
C20:4 N6*	3,7	3,4	2,4	6,3
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,1	0,1	0,2	0,1
C20:5 N3*	5,3	4,5	1,6	8,8
C24:0*	0,5	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,1	0,1
C24:1 N9*	1,0	1,2	2,1	0,2
C22:5 N6*	12,1	10,5	6,1	10,5
C22:5 N3*	0,5	0,5	0,8	0,2
C22:6 N3*	42,5	41,5	35,5	54,4
Tổng FAME, %	100,0	100,0	100,0	100,0

ATCC 20890 - Hàm lượng lipid của sinh khối ATCC 20890 được đánh giá là 9,2% dưới dạng tổng FAME, còn lượng dầu thô thu được sau khi chiết bằng dung môi là 10,2% theo trọng lượng, cho tỷ lệ thu hồi 111% chất béo có trong sinh khối. Hàm lượng EPA và DHA của sinh khối được xác định là 12,2 mg/g và 36,6 mg/g, tương ứng. Dầu thô chiết được chứa 64,7 mg/g EPA và 194,2 mg/g DHA. TAG tách được chứa 41,9 mg/g EPA và 230,2 mg/g DHA, trong khi PL phân lập được chứa 54,4 mg/g EPA và 149,5 mg/g DHA. Các thành phần axit béo toàn phần của sinh khối, của dầu thô chiết được, của phân đoạn TAG và phân đoạn PL được nêu ra dưới đây, trong các Bảng 24 và 25, tính bằng mg/g và % FAME, tương ứng.

Bảng 24: Thành phần axit béo của ATCC 20890 tính bằng miligam trên gam

	Sinh khối	Dầu thô	TAG	PL
Axit béo	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	0,6	5,2	22,6	3,2
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,2
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	25,4	161,1	206,1	142,5
C16:1*	0,2	1,3	4,7	0,8

C18:0*	1,8	12,1	58,9	7,1
C18:1 N9*	1,0	9,7	37,6	2,4
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,8	4,8	6,9	3,9
C20:0*	0,1	0,0	0,0	0,3
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:2 N6*	1,9	11,1	14,2	13,1
C20:3 N6	1,0	5,4	2,4	8,0
C22:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	5,3	33,6	35,8	35,3
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,2	0,0	0,0	1,1
C20:4 N3	0,1	2,2	0,0	3,1
C20:5 N3*	12,2	64,7	41,9	54,4
C24:0*	0,3	0,0	0,0	0,2
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,3	1,4	1,6	1,9
C22:5 N6*	0,5	2,4	1,4	3,0
C22:5 N3*	3,6	19,4	23,9	19,8
C22:6 N3*	36,6	194,2	230,2	149,5
Tổng tất cả FAME	92,3	535,1	735,0	450,9

Bảng 25: Thành phần axit béo của ATCC 20890 tính bằng phần trăm trong tổng FAME

	Sinh khối	Dầu thô	TAG	PL
Axit béo	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	0,7	1,0	3,1	0,7
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	27,6	30,1	28,0	31,6
C16:1*	0,2	0,3	0,6	0,2
C18:0*	2,0	2,3	8,0	1,6
C18:1 N9*	1,1	1,8	5,1	0,5
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,9	0,9	0,9	0,9
C20:0*	0,1	0,0	0,0	0,1
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:2 N6*	2,1	2,1	1,9	2,9
C20:3 N6	1,1	1,0	0,3	1,8
C22:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	5,8	6,3	4,9	7,8
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,2	0,0	0,0	0,3
C20:4 N3	0,1	0,4	0,0	0,7
C20:5 N3*	13,2	12,1	5,7	12,1
C24:0*	0,3	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,3	0,3	0,2	0,4
C22:5 N6*	0,6	0,4	0,2	0,7
C22:5 N3*	3,9	3,6	3,2	4,4
C22:6 N3*	39,7	36,3	31,3	33,2
Tổng FAME, %	100,00	100,0	100,0	100,0

ATCC 20889 - Hàm lượng lipid của sinh khối này được đánh giá là 3,3% dưới dạng tổng FAME, còn lượng dầu thô thu được sau khi chiết bằng dung môi là 3,4% theo trọng lượng, cho tỷ lệ thu hồi 103% chất béo có trong sinh khối. Hàm lượng EPA và DHA của sinh khối được xác định là 2,3 mg/g và 16,5 mg/g, tương ứng. Dầu thô chiết được chứa 26,8 mg/g EPA và 205,1 mg/g DHA. TAG tách được chứa 7,3 mg/g EPA và 185,9 mg/g DHA, trong khi PL phân lập được chứa 35,2 mg/p- EPA và 218,6 mg/g DHA. Các thành phần axit béo toàn phần của sinh khối, của dầu thô chiết được, của phân đoạn TAG và phân đoạn PL được nêu ra dưới đây, trong các Bảng 26 và 27, tính bằng mg/g và % FAME, tương ứng.

Bảng 26: Thành phần axit béo của ATCC 20889 tính bằng miligam trên gam

	Sinh khối	Dầu thô	TAG	PL
Axit béo	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	0,5	8,3	32,0	2,8
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,1
C16:0*	6,6	80,3	150,8	50,4
C16:1*	0,1	1,7	12,3	0,0
C18:0*	0,3	4,8	9,7	1,6
C18:1 N9*	0,6	6,6	7,6	1,2
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	0,4	1,1	0,1
C20:0*	0,0	0,1	2,1	0,0
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,1	0,7	0,1
C22:0*	0,0	0,0	0,1	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	0,4	1,4	1,1	7,2
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,0	0,5	0,9	0,5
C20:5 N3*	2,3	26,8	7,3	35,2
C24:0*	0,1	0,4	1,8	0,0
C22:4 N9	0,0	3,4	0,2	2,8
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,8	0,3
C22:5 N6*	5,0	63,6	76,2	45,9
C22:5 N3*	0,2	1,8	2,2	2,0
C22:6N3*	16,5	205,1	185,9	218,6
Tổng tất cả FAME	32,8	405,2	493,0	368,7

Bảng 27: Thành phần axit béo của ATCC 20889 tính bằng phần trăm trong tổng FAME

	Sinh khối	Dầu thô	TAG	PL
Axit béo	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	1,4	2,0	6,5	0,8
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	20,3	19,8	30,6	13,7
C16:1*	0,4	0,4	2,5	0,0
C18:0*	0,8	1,2	2,0	0,4
C18:1 N9*	1,8	1,6	1,5	0,3
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,1	0,1	0,2	0,0
C20:0*	0,0	0,0	0,4	0,0
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,1	0,0
C22:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,3	0,4	0,2	2,0
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,1	0,1	0,2	0,1
C20:5 N3*	7,0	6,6	1,5	9,5
C24:0*	0,3	0,1	0,4	0,0
C22:4 N9	0,0	0,8	0,0	0,8
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,2	0,1
C22:5 N6*	15,3	15,7	15,5	12,5
C22:5 N3*	0,5	0,5	0,5	0,5
C22:6 N3*	50,2	50,6	37,7	59,3
Tổng FAME, %	100,0	100,0	100,0	100,0

ATCC 20892 - Hàm lượng lipid của sinh khối này được đánh giá là 8,8% dưới dạng tổng FAME, còn lượng dầu thô thu được sau khi chiết bằng dung môi là 12,1% theo trọng lượng, cho tỷ lệ thu hồi 138% chất béo có trong sinh khối. Hàm lượng EPA và DHA của sinh khối được xác định là 8,3 mg/g và 43.3 mg/g, tương ứng. Dầu thô chiết được chứa 50,5 mg/g EPA và 260,1 mg/g DHA. TAG tách được chứa 98,7 mg/g EPA và 407,7 mg/g DHA, trong khi PL phân lập được chứa 50,4 mg/g EPA và 243,12 mg/g DHA. Các thành phần axit béo toàn phần của sinh khối, của dầu thô chiết được, của phân đoạn TAG và phân đoạn PL được nêu ra dưới đây, trong các Bảng 28 và 29, tính bằng mg/g và % FAME, tương ứng.

Bảng 28: Thành phần axit béo của ATCC 20892 tính bằng miligam trên gam

	Sinh khối	Dầu thô	TAG	PL
Axit béo	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	7,3	42,2	29,7	54,7
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,2
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	18,9	109,0	133,5	116,7
C16:1*	0,0	0,8	3,5	0,2
C18:0*	0,0	2,6	9,1	0,7
C18:1 N9*	0,6	7,3	22,0	1,3
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	1,4	9,7	0,4
C20:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,6	0,0	0,1
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,3	1,1	6,3	0,6
C22:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,3	7,6	15,8	7,8
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,3	1,5	4,7	1,4
C20:5 N3*	8,3	49,6	97,0	49,8
C24:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,2	0,0	0,0	0,1
C24:1 N9*	0,0	1,1	4,9	1,0
C22:5 N6*	2,8	16,1	25,3	15,8
C22:5 N3*	1,1	6,6	23,9	6,0
C22:6 N3*	43,4	254,3	398,3	239,5
Tổng tất cả FAME	87,5	508,0	800,7	498,2

Bảng 29: Thành phần axit béo của ATCC 20892 tính bằng phần trăm trong tổng FAME

	Sinh khối	Dầu thô	TAG	PL
Axit béo	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	8,3	8,3	3,6	11,0
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	21,6	21,4	16,4	23,4
C16:1*	0,0	0,2	0,5	0,0
C18:0*	0,0	0,5	1,1	0,1
C18:1 N9*	0,7	14	2,6	0,2
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	0,2	1,1	0,1
C20:0*	0,0	0,1	0,6	0,0

C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,1	0,0	0,0
C20:-2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,3	0,2	0,7	0,1
C22:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N7	1,9	0,8	1,6	0,2
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,4	1,5	1,9	1,6
C22:1N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,3	0,3	0,5	0,3
C20:5 N3*	9,5	9,7	11,9	10,0
C24:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,2	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,2	0,5	0,2
C22:5 N6*	3,2	3,1	3,0	3,2
C22:5 N3*	1,3	1,2	2,8	1,2
C22:6 N3*	49,6	49,8	49,0	48,0
Tổng FAME, %	100,0	100,0	100,0	100,0

Tất cả các ấn phẩm, các patent và các đơn yêu cầu cấp patent đã nêu trong phần mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn tới mức độ đường như mỗi ấn phẩm, bằng sáng chế hoặc đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế riêng biệt đó được chỉ ra một cách cụ thể và theo từng tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit ít nhất là 70% trọng lượng, trong đó hàm lượng axit docosahexaenoic của phân đoạn triglyxerit ít nhất là 40% trọng lượng, trong đó hàm lượng của axit docosapentaenoic n-6 của phân đoạn triglyxerit ít nhất là từ 0,5% trọng lượng đến 6% trọng lượng và trong đó
 - a) hàm lượng axit docosahexaenoic của phân đoạn triglyxerit ít nhất là 50% trọng lượng; hoặc
 - b) tỷ lệ của axit docosahexaenoic với axit docosapentaenoic n-6 lớn hơn 6:1.
2. Dầu vi sinh vật theo điểm 1, trong đó hàm lượng axit docosahexaenoic của phân đoạn triglyxerit ít nhất là 50% trọng lượng.
3. Dầu vi sinh vật theo điểm 2, trong đó dầu này còn chứa hàm lượng axit arachidonic của phân đoạn triglyxerit với lượng là 1,5% hoặc ít hơn.
4. Dầu vi sinh vật theo điểm 1, trong đó tỷ lệ của axit docosahexaenoic với axit docosapentaenoic n-6 lớn hơn 6:1.
5. Dầu vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó ít nhất 20% triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit chứa axit docosahexaenoic ở hai vị trí trong triglyxerit được chọn từ hai vị trí bất kỳ trong số sn-1, sn-2, và sn-3.
6. Dầu vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó ít nhất 5% triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit chứa axit docosahexaenoic ở tất cả ba vị trí sn-1, sn-2, và sn-3 trong triglyxerit.
7. Dầu vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dầu này chứa axit heptadecanoic với lượng 5% hoặc ít hơn.
8. Dầu vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó dầu này chứa axit eicosapentaenoic với lượng 10% hoặc ít hơn.
9. Dầu vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó dầu này là dầu thô được chiết từ sinh khối vi sinh vật mà không cần phải xử lý hoặc dầu tinh luyện thu được bằng cách xử lý dầu vi sinh vật thô với các bước xử lý thêm được chọn từ bước tinh luyện, tẩy trắng và/hoặc khử mùi.
10. Dầu vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó dầu này là dầu

thraustochytrid.

11. Sản phẩm thực phẩm để dùng cho động vật hoặc người, chứa dầu vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.
12. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 11, trong đó sản phẩm thực phẩm này là sữa công thức dùng cho trẻ sơ sinh.
13. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 12, trong đó sữa công thức dùng cho trẻ sơ sinh này thích hợp dùng cho trẻ sơ sinh thiếu tháng.
14. Sữa công thức dùng cho trẻ sơ sinh chứa dầu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 kết hợp với dầu tinh luyện vật lý thu được từ vi sinh vật tạo ra axit arachidonic.
15. Sữa công thức dùng cho trẻ sơ sinh theo điểm 14, trong đó vi sinh vật là *Mortierella alpina* hoặc *Mortierella* sect. *schmuckeri*.
16. Sữa công thức dùng cho trẻ sơ sinh được bổ sung dầu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 kết hợp với dầu giàu axit arachidonic.
17. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 11, trong đó sản phẩm thực phẩm này là sữa, đồ uống, đồ uống trị liệu, đồ uống bổ dưỡng hoặc dạng kết hợp của chúng.
18. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 11, trong đó sản phẩm thực phẩm này là chất phụ gia thực phẩm cho động vật hoặc người.
19. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 11, trong đó sản phẩm thực phẩm này là sản phẩm bổ sung dinh dưỡng.
20. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 11, trong đó sản phẩm thực phẩm này là thức ăn dùng cho động vật.
21. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 20, trong đó thức ăn dùng cho động vật này là thức ăn dùng cho nuôi trồng thủy sản hoặc trong đó thức ăn dùng cho động vật này là thức ăn dùng cho vật nuôi, thức ăn dùng cho động vật vườn thú, thức ăn dùng cho động vật làm việc, thức ăn dùng cho gia súc hoặc dạng kết hợp của chúng.
22. Mỹ phẩm dùng cho người chứa dầu vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.
23. Dược phẩm dùng cho người hoặc động vật chứa dầu vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Apt, Kirk
 Pfeifer III, Joseph W.
 Hansen, Jon Milton
 Behrens, Paul Warren
 Zirkle, Ross
 Stahl, Tracey Lynn

<120> Dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglycerit, thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm chứa dầu vi sinh vật này

<130> 2715.003PC00

<140> Được gán
 <141> kèm theo đây

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 1713
 <212> ADN
 <213> Schizochytrium sp.

<400> 1
 acctggttga tcctgccagc tgtcatttgc tcgtctaaaa gattaagcca tgcattgtcta 60
 agtataaaca aattatacgg tgaaactgcg aacggctcat tatatcagtt atagtttctt 120
 tgatagtgtg tttctatatc tatttgata actgtggcaa ttctagagct aacacatgct 180
 ttcgagtggg acttttttgt accactgcat ttattagatt ttgaagccaa cgtaaaattg 240
 gtgattcatg ataactttgc gaatcgcagt agcgtcttgt acgcggcgat gaatcattca 300
 agtttctgcc ccatacagctg tcgatggtag ggtattggcc taccatggct ttacgggtg 360
 acggagaatt agggtttgat tcgggagagg acgcttgaga gacggcgacc acatccaagg 420
 aaggcagcag gcgcgtaaat tacccaatgg ggactccccg aggtagtgc acgaaataaa 480
 aatgaggagc gctttgcgtt tttcaatttg aatgagagaa tcgtacaatc ctcatcgagg 540
 atcaattgga gggcaagtct ggtgccagca gccgcggtaa ctccagctcc aatagcaaatt 600
 attagagttg ttgcagttaa aaagctcgta gttgaatttc cgatagtctt tggccgtgtc 660
 cttggtctcg tatcatgggt ttattgtgcc aagatgatcg tcctctatgg ttagtgatag 720
 tcatagtctg ttactgtaaa aaaactggag tgtttaaagc atttctttgg gaaaggtaca 780
 tattagtata ggataattag ataggacctg tgattcttat ttggttggtt tgtgagtcac 840
 ggtaatgatt aatagggaca atcgggggta ttcgaattta attgtcagag gtgaaattct 900

tggattttaag aaagtogaac tactgcgaag gcattttacca aggatgtttt cattaataaaa 960
 gaacgaaagt taggggatcg aagatgatta gataccatcg tagtcttaac tgtaaactat 1020
 gccgacttgc gattgtccgt cgttggtttt tcaaaaaaga gacctgggca gcagcacatg 1080
 agaaatcaaa gtttttgggt tccgggggga gtatggtcgc aaggctgaaa cttaaaggaa 1140
 ttgacggaag ggcaccacca ggagtggagc ctgcggctta attcgactca acacgggaaa 1200
 acttaccagg tccagacata gtaaggattg acagattgag agctctttct tgattctatg 1260
 ggtggtggtg catggcogtt cttagttggt ggagtgatth gtctggttaa ttccgttaac 1320
 gaacgagacc tcagcctact aaatagtggg gcattattgtg agatatgtga caaaaatcgc 1380
 ttcttagagg gacatttcgg gtttaccgga aggaagtthg aggcaataac aggtctgtga 1440
 tgcccctaga tgttctgggc cgcacgcgcg ctacaatgac agattcaaca agtccggtag 1500
 tggagcttht gottctctat tattacttht ccgagaggaa tggttaatct tctaaatgtc 1560
 tgctgtgatg gggctagatt ttgcaatta ttaatctcca acgaggaatt cctagtaaac 1620
 gcaagtcac agcttgcat gattacgtcc ctgccctthg tacacaccgc ccgtcgcacc 1680
 taccgattga acggtctat gaaatcttcg gat 1713

<210> 2

<211> 924

<212> ADN

<213> Schizochytrium sp.

<400> 2

atcgaccaga aggatgccta cgtaggggac gaggcgcaga gcaagcgtgg tgtgctgacg 60
 ctcaagtacc cgatcgagca cggcatcgtg accaactggg acgacatgga gaagatctgg 120
 catcacacct totacaacga gotgcgcgtg gcgcgccgagg agcaccocgt gctgctcacc 180
 gagggcccc tcaaccccaa ggccaaccgc gagcgcata cccagatcat gttcgagacc 240
 ttcaacgtgc cggccatgta cgtcaacatc caggccgtgc tgtccctgta cgcttcgggc 300
 cgcaccaccg gcgcctgtct cgattcggga gatggcgtca cgcacacogt gccatctac 360
 gagggctacg cgctcccgca cgcggtgctg cgcacgacc tggctggcgc cgacctgacc 420
 gactacatga tgaagatcct gacggagcgc gggactactg tcacgacgac cgcgcagcgc 480
 gaaatcgtgc gcgacatcaa ggagaagctg tgctacgtgg cgctcgactt cgaccaggag 540
 atgaagacgg ccgccgagtc gtcgtcgtg gagaagagct acgagctgac ggacggcaac 600
 gtgatcacga tcggcaacga gcgcttcgcg tgccccgagg tgctcttcca gccgtcgttc 660

```

atcggcaagg aggccgccgg cgtgcacgag accatgttcc agacgatcat gaagtgcgac 720
gtcgatatcc gcaaggacct gtacgccaac atcgtcatgt ccggtggctc caccatgtac 780
gagggcatcg ccgcgcgcct ggagaaggag atggtgtcac tggcgccctc caccatgaag 840
atcaagggtg tcgcgcccc cgcgcgcaag tactcgggtg ggatcggcgg ctccatcctg 900
gcctcgctct ccaccttcca gcaa 924

```

```

<210> 3
<211> 291
<212> PRT
<213> Schizochytrium sp.

```

```
<400> 3
```

```

Val Leu Thr Leu Lys Tyr Pro Ile Glu His Gly Ile Val Thr Asn Trp
1             5             10             15

```

```

Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His His Thr Phe Tyr Asn Glu Leu Arg
20             25             30

```

```

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn
35             40             45

```

```

Pro Lys Ala Asn Arg Glu Arg Met Thr Gln Ile Met Phe Glu Thr Phe
50             55             60

```

```

Asn Val Pro Ala Met Tyr Val Asn Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr
65             70             75             80

```

```

Ala Ser Gly Arg Thr Thr Gly Ala Val Leu Asp Ser Gly Asp Gly Val
85             90             95

```

```

Thr His Thr Val Pro Ile Tyr Glu Gly Tyr Ala Leu Pro His Ala Val
100            105            110

```

```

Leu Arg Ile Asp Leu Ala Gly Arg Asp Leu Thr Asp Tyr Met Met Lys
115            120            125

```

```

Ile Leu Thr Glu Arg Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Thr Ala Glu Arg Glu
130            135            140

```

```

Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe
145            150            155            160

```

Asp Gln Glu Met Lys Thr Ala Ala Glu Ser Ser Ser Leu Glu Lys Ser
 165 170 175

Tyr Glu Leu Pro Asp Gly Asn Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe
 180 185 190

Arg Cys Pro Glu Val Leu Phe Gln Pro Ser Phe Ile Gly Lys Glu Ala
 195 200 205

Ala Gly Val His Glu Thr Met Phe Gln Thr Ile Met Lys Cys Asp Val
 210 215 220

Asp Ile Arg Lys Asp Leu Tyr Ala Asn Ile Val Met Ser Gly Gly Ser
 225 230 235 240

Thr Met Tyr Glu Gly Ile Ala Ala Arg Leu Glu Lys Glu Met Val Ser
 245 250 255

Leu Ala Pro Ser Thr Met Lys Ile Lys Val Val Ala Pro Pro Glu Arg
 260 265 270

Lys Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr
 275 280 285

Phe Gln Gln
 290

<210> 4
 <211> 918
 <212> ADN
 <213> Schizochytrium sp.

<400> 4
 gatctgcagc tggagcgcac caacgtgtac ttcaacgagg ccacggggcgg ccgctacgtg 60
 ccgcgcgcca tcctcatgga cctggagccc ggtacgatgg actctgtcog cgcgggcccc 120
 tttggccagc tcttcogccc agacaacttc gtcttcgggc agacggggcgc cggtaacaac 180
 tgggccaagg gccactacac tgagggcgcg gagcttatcg actcgggtgt cgaagtgggtg 240
 cgcaaggagg cagagtctgt cgactgcctg cagggcttcc agatcaccac ctcgctcggc 300
 ggcggcacgg gctccggtat gggcacgctt ctcatcagca agatccgoga ggagtacccc 360
 gaccgcatca tgctgacctt ctccatcgtg ccctcgccca aggtgtcggg caccgtcgtg 420

gagccctaca acggaagct ctcggtgcac cagctcgtgg agaagccga cgaggtcatg 480
 gtccctcgaca acgagggcgt gtacgacatc tgcttccgca cottgaagct caccacgccc 540
 acctacggcg acctcaacca cctcgtgtgc gccgccatga gcgggtgcac gtgctgcctg 600
 cgcttcccgg gccagctcaa ctcggaacctg cgcaagctgg ccgtcaacct ggtgcccttt 660
 ccgcgcctcc acttcttcat gatcggcttc tcgcccctca cctcgcgtgg ctgcgagcag 720
 taccgcgccc tgaccgttcc ggagctcacg cagcaggcgt ttgacgctaa gaacatgatg 780
 tgcgccgccc acccgogcca cggccgctac ctgacggcga cgacgtcttt ccgcgggcgc 840
 atgtcgacca aggaggtgga cgagcagatg ctcaacatcc agaacaagaa ctgctcgtac 900
 tttgtcgagt ggatcccc 918

<210> 5
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> Schizochytrium sp.

<400> 5

Asp Asp Leu Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Phe Asn Glu Ala Thr
 1 5 10 15

Gly Gly Arg Tyr Val Pro Arg Ala Ile Leu Met Asp Leu Glu Pro Gly
 20 25 30

Thr Met Asp Ser Val Arg Ala Gly Pro Phe Gly Gln Leu Phe Arg Pro
 35 40 45

Asp Asn Phe Val Phe Gly Gln Thr Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly His Tyr Thr Glu Gly Ala Glu Leu Ile Asp Ser Val Leu Asp Val
 65 70 75 80

Val Arg Lys Glu Ala Glu Ser Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Ile
 85 90 95

Thr His Ser Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu
 100 105 110

Ile Ser Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Met Leu Thr Phe
 115 120 125

Ser Ile Val Pro Ser Pro Lys Val Ser Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr
 130 135 140

Asn Ala Thr Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Ala Asp Glu Val
 145 150 155 160

Met Val Leu Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu
 165 170 175

Lys Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Cys Ala
 180 185 190

Ala Met Ser Gly Cys Thr Cys Cys Leu Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn
 195 200 205

Ser Asp Leu Arg Lys Leu Ala Val Asn Leu Val Pro Phe Pro Arg Leu
 210 215 220

His Phe Phe Met Ile Gly Phe Ser Pro Leu Thr Ser Arg Gly Ser Gln
 225 230 235 240

Gln Tyr Arg Ala Leu Thr Val Pro Glu Leu Thr Gln Gln Ala Phe Asp
 245 250 255

Ala Lys Asn Met Met Cys Ala Ala Asp Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu
 260 265 270

Thr Ala Thr Thr Leu Phe Arg Gly Arg Met Ser Thr Lys Glu Val Asp
 275 280 285

Glu Gln Met Leu Asn Ile Gln Asn Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu
 290 295 300

Trp Ile Pro
 305