



(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)



1-0029228

(51)⁷ C12P 7/64

(13) B

(21) 1-2014-00559

(22) 20/07/2012

(86) PCT/US2012/047728 20/07/2012

(87) WO/2013/013208 24/01/2013

(30) 61/510,464 21/07/2011 US

(45) 25/08/2021 401

(43) 25/04/2014 313A

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

Het Overloon 1, NL- 6411 TE Heerlen, The Netherlands

(72) PFEIFER, III, Joseph W (US); HANSEN, Jon Milton (US); DONG, Xiao Daniel (CN); BEHRENS, Paul Warren (US); APT, Kirk E. (US).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SINH KHỐI VI SINH VẬT CÓ AXIT BÉO VÀ AXIT EICOSAPENTAENOIC (EPA), PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT DẦU VÀ SINH KHỐI THU ĐƯỢC

(57) Sáng chế đề cập đến các vi sinh vật được phân lập cũng như các chủng và các thể đột biến của nó, sinh khối, dầu vi sinh vật, các chế phẩm, và môi trường nuôi cấy, các quy trình sản xuất dầu từ vi sinh vật, sinh khối, và các đột biến; và các phương pháp sử dụng các vi sinh vật đã phân lập, sinh khối và dầu vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các vi sinh vật được phân lập cũng như các chủng và các đột biến của chúng, sinh khối, dầu vi sinh vật, các chế phẩm và môi trường nuôi cấy; phương pháp sản xuất dầu vi sinh vật, và các đột biến; và các phương pháp sử dụng các vi sinh vật được phân lập, sinh khối và dầu vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các axit béo được phân loại dựa vào độ dài và các đặc tính bão hòa của mạch cacbon. Các axit béo được gọi là axit béo mạch ngắn, mạch trung bình, hoặc mạch dài dựa vào số lượng cacbon có mặt trong mạch này, được gọi là axit béo bão hòa khi không còn liên kết đôi nào có mặt giữa các nguyên tử cacbon, và được gọi là axit béo không bão hòa khi còn các liên kết đôi. Các axit béo không bão hòa mạch dài là không bão hòa đơn khi chỉ còn một liên kết đôi có mặt và là không bão hòa đa khi nhiều hơn một liên kết đôi có mặt.

Các axit béo không bão hòa đa (polyunsaturated fatty acids: PUFAs) được phân loại dựa vào vị trí của liên kết đôi đầu tiên từ đầu metyl của axit béo này: axit béo omega-3 (n-3) chứa liên kết đôi đầu tiên ở cacbon thứ ba, trong khi đó axit béo omega-6 (n-6) chứa liên kết đôi đầu tiên ở cacbon thứ sáu. Ví dụ, axit docosahexaenoic ("DHA") là axit béo không bão hòa đa mạch dài omega-3 (LC-PUFA) có độ dài mạch là 22 cacbon và 6 liên kết đôi, thường được gọi là "22:6 n-3". Các omega-3 LC-PUFA khác bao gồm axit eicosapentaenoic ("EPA"), được ký hiệu là "20:5 n-3," và axit omega-3

docosapentaenoic ("DPA n-3"), được ký hiệu là "22:5 n-3". DHA và EPA được gọi là axit béo "thiết yếu". Các omega-6 LC-PUFA bao gồm axit arachidonic ("ARA"), được ký hiệu là "20:4 n-6," và axit omega-6 docosapentaenoic ("DPA n-6"), được ký hiệu là "22:5 n-6."

Các axit béo omega-3 là các phân tử quan trọng về mặt sinh học ảnh hưởng đến sinh lý tế bào do sự có mặt của chúng trong màng tế bào, điều hòa sự sản xuất và biểu hiện gen của các hợp chất có hoạt tính sinh học, và đóng vai trò là các cơ chất sinh tổng hợp. Roche, H. M., *Proc. Nutr. Soc.* 58: 397-401 (1999). Ví dụ, DHA chiếm xấp xỉ 15%-20% lipit trong vỏ não người, 30%-60% lipit trong võng mạc, được cô đặc trong tinh hoàn và tinh dịch, và là thành phần quan trọng của sữa mẹ. Bergé, J.P., and Barnathan, G., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 96:49-125 (2005). DHA chiếm đến 97% axit béo omega-3 trong não và đến 93% axit béo omega-3 trong võng mạc. Ngoài ra, DHA là thiết yếu đối với sự phát triển của cả bào thai và trẻ sơ sinh cũng như duy trì chức năng nhận thức ở người trưởng thành. *Id.* Vì axit béo omega-3 không được tổng hợp de novo (tổng hợp một phân tử phức tạp từ các phân tử đơn giản) trong cơ thể người, nên các axit béo này phải thu được từ các nguồn dinh dưỡng.

Tinh dầu hạt lanh và dầu cá được xem là các nguồn dinh dưỡng tốt chứa axit béo omega-3. Tinh dầu hạt lanh không chứa EPA, DHA, DPA, hoặc ARA nhưng có chứa các axit linolenic (C18:3 n-3), khối cơ bản cho phép cơ thể sản xuất EPA. Tuy nhiên, có bằng chứng là tốc độ chuyển hóa trao đổi chất có thể là chậm và thay đổi, đặc biệt là ở người có sức khỏe suy yếu. Dầu cá thay đổi nhiều về chủng loại và hàm lượng các thành phần axit béo, tùy theo loài cụ thể và chế độ ăn của chúng. Ví dụ, cá nuôi có xu hướng có hàm lượng axit béo omega-3 thấp hơn so với cá tự nhiên. Ngoài ra, dầu cá có nguy cơ chứa các tạp chất môi trường và có thể kèm theo các vấn đề về độ ổn định và mùi hoặc vị tanh.

Thraustochytrid là các vi sinh vật thuộc bộ Thraustochytriales. Thraustochytrid bao gồm các thành viên thuộc giống *Schizochytrium* và *Thraustochytrium* và được nhận ra là nguồn thay thế axit béo omega-3, bao gồm DHA và EPA. Xem patent Mỹ số 5,130,242. Dầu được sản xuất từ các vi sinh vật biển dị dưỡng này thường có các profin axit béo không bão hòa đa đơn giản hơn so với dầu cá hoặc dầu vi tảo. Lewis, T.E., *Mar. Biotechnol.* 1: 580-587 (1999). Các chủng của loài thraustochytrid đã được báo cáo là tổng hợp axit béo omega-3 vì tỉ lệ phần trăm trên tổng lượng axit béo cao được tổng hợp bởi các sinh vật này. Patent 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 được phân lập thay đổi về tính đồng nhất và lượng LC-PUFA được tổng hợp ra, khiến cho một số chủng đã được mô tả trước đây có thể có mức nồng độ axit béo omega-6 không mong muốn và/hoặc có thể có năng suất thấp trong môi trường nuôi cấy. Do đó, vẫn tồn tại nhu cầu phân lập các vi sinh vật có năng suất cao và các profin LC-PUFA mong muốn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tác giả sáng chế đã phát hiện ra là lượng EPA và DHA, được tổng hợp bởi Thraustochytrid mà tổng hợp sinh khối chứa ít nhất 3% EPA, có thể được điều hòa bằng cách làm thay đổi lượng cacbon dioxit (CO₂) hòa tan trong pha nước của canh trường lên men trong quá trình lên men của vi sinh vật này. Được đề xuất ở đây là phương pháp sản xuất sinh khối có axit béo và nồng độ EPA, bao gồm: lên men vi sinh vật này trong bình lên men có khí hòa tan trong canh trường lên men để tổng hợp sinh khối, trong đó vi sinh vật này bao gồm Thraustochytrid tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA theo tổng khối lượng các axit béo; và điều chỉnh mức CO₂ hòa tan trong khí hòa tan này. Theo một phương án, mức CO₂ hòa tan có thể được

điều chỉnh để đạt được mức EPA và/hoặc DHA mong muốn trong sinh khối này. Theo một phương án khác, lượng CO_2 hòa tan trong pha nước của canh trường lên men nằm trong khoảng từ 38 đến 600ppm tổng lượng khí hòa tan, và cụ thể là từ 38 đến 135ppm tổng lượng khí hòa tan.

Được đề xuất thêm ở đây là phương pháp tổng hợp sinh khối của vi sinh vật chứa các axit béo và nồng độ EPA, bao gồm: lên men vi sinh vật này trong bình lên men, chứa khí, để sản xuất sinh khối trong đó vi sinh vật này bao gồm *Thraustochytrid* tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA theo tổng khối lượng axit béo; và bổ sung vào khí này CO_2 . Bổ sung nghĩa là thêm vào hoặc nạp vào các bình này khí CO_2 với lượng cộng thêm lượng được sản xuất bởi quá trình lên men của các tế bào hoặc lượng ở các điều kiện xung quanh. Theo một phương án, CO_2 được bổ sung vào bình này để đạt được lượng EPA và/hoặc DHA mong muốn trong sinh khối này.

Cũng được đề xuất ở đây là phương pháp sản xuất sinh khối của vi sinh vật chứa axit béo và nồng độ EPA, bao gồm: lên men vi sinh vật này trong bình lên men để sản xuất sinh khối trong đó vi sinh vật này bao gồm *Thraustochytrid* tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA theo tổng khối lượng axit béo; và điều chỉnh lượng sinh khối trong bình này. Theo một phương án của sáng chế, sinh khối này được điều chỉnh để đạt được mức nồng độ EPA hoặc DHA mong muốn trong sinh khối.

Phương pháp sản xuất vi sinh vật có axit béo và nồng độ EPA, bao gồm: lên men vi sinh vật này trong bình lên men để sản xuất sinh khối, trong đó vi sinh vật này bao gồm *Thraustochytrid* tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA theo tổng khối lượng axit béo; và điều chỉnh áp suất trên sinh khối này, ví dụ, không giới hạn ở, kiểm soát đối áp suất của bình này. Theo một phương án, áp suất này được điều chỉnh để đạt được mức EPA hoặc DHA mong muốn trong sinh khối này.

Theo một phương án khác, được đề xuất ở đây là phương pháp sản xuất vi sinh vật có các axit béo và nồng độ EPA, bao gồm: lên men vi sinh vật này trong bình lên men để sản xuất ra canh trường lên men và sinh khối, trong đó vi sinh vật này bao gồm Thraustochytrid tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA theo tổng khối lượng axit béo; và điều chỉnh nhiệt độ trong canh thang này. Theo một phương án, nhiệt độ này được điều chỉnh để đạt được mức EPA và/hoặc DHA mong muốn trong sinh khối này.

Trong nhiều phương án khác nhau, lượng EPA và DHA cũng có thể được điều hòa bằng cách điều chỉnh lượng CO_2 hòa tan trong pha nước hoặc canh trường lên men của bình bằng cách làm tăng hoặc làm giảm lượng CO_2 trong bình này. Lượng CO_2 hòa tan có thể được điều chỉnh bằng cách điều chỉnh thêm lượng sinh khối được lên men. Ví dụ, bằng cách lên men tế bào trong bình thót cổ và các bình lên men lớn hơn. EPA và DHA cũng có thể thay đổi theo các phương án được đề xuất ở đây bằng cách làm thay đổi nhiệt độ. Lượng CO_2 hòa tan có thể được điều chỉnh thêm, ví dụ, bằng cách điều chỉnh nhiệt độ trong bình này. Ví dụ, nhiệt độ bình thấp hơn sẽ tạo ra các nồng độ EPA lớn hơn và nồng độ DHA thấp hơn. Lượng CO_2 hòa tan có thể được điều chỉnh thêm bằng cách điều chỉnh áp suất trong bình này. Ví dụ, việc gia tăng áp suất chắc chắn làm tăng CO_2 hòa tan, dẫn đến làm tăng lượng EPA và làm giảm lượng DHA trong sinh khối. Mỗi loại điều chỉnh được mô tả trên đây, ví dụ, bổ sung CO_2 , làm tăng hoặc làm giảm sinh khối, làm tăng hoặc làm giảm nhiệt độ, hoặc làm tăng hoặc làm giảm áp suất, có thể được kết hợp với bất kỳ trong số các điều chỉnh còn lại để đạt được mức EPA và DHA mong muốn trong sinh khối này và dầu bất kỳ được chiết ra từ sinh khối này. CO_2 hòa tan cũng có thể được điều chỉnh bằng cách làm thay đổi độ pH.

Theo một số phương án, tổng lượng EPA và DHA vẫn tương đối ổn định so với lượng, theo khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo và axit béo omega-3.

Theo các phương án khác, hàm lượng EPA hoặc DHA của sinh khối này được đo trước khi thực hiện việc điều chỉnh lượng CO₂ bổ sung vào, áp suất, nhiệt độ hoặc sinh khối.

Mặc dù không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết bất kỳ, giả thuyết rằng sự tăng hoặc giảm lượng EPA hoặc DHA có liên quan trực tiếp đến lượng CO₂ hòa tan trong pha nước của canh trường lên men và các điều chỉnh được mô tả trên đây về CO₂, áp suất, và nhiệt độ, làm thay đổi lượng CO₂ hòa tan trong sinh khối.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sinh khối của vi sinh vật có nồng độ EPA tăng, phương pháp này bao gồm nuôi vi sinh vật này trong môi trường nuôi cấy chứa ít hơn 0,1mg/l vitamin B12 để sản xuất sinh khối. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa ít hơn 0,01mg/l vitamin B12. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa ít hơn 0,001mg/l vitamin B12. Theo các phương án khác, môi trường nuôi cấy này chứa nồng độ vitamin B12 thấp hơn 0,0001mg/l. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này không chứa vitamin B12.

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa thêm ít hơn 1g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa thêm ít hơn 0,5g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid. Theo các phương án khác, môi trường nuôi cấy này chứa thêm ít hơn 0,1g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid.

Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 400% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển

trong môi trường nuôi cấy chứa nhiều hơn 0,1mg/l vitamin B12. Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 300% so với nồng độ EPA trong sinh khối từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nhiều hơn 0,01mg/l vitamin B12. Theo các phương án khác, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 200% so với nồng độ EPA trong sinh khối từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nhiều hơn 0,001mg/l vitamin B12. Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100% so với nồng độ EPA trong sinh khối từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nhiều hơn 0,0001mg/l vitamin B12.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sinh khối của vi sinh vật có nồng độ EPA tăng, bao gồm nuôi vi sinh vật này trong môi trường nuôi cấy chứa ít hơn 0,1mg/l coban để sản xuất sinh khối. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa ít hơn 0,01mg/l coban. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa ít hơn 0,001mg/l coban. Theo các phương án khác, môi trường nuôi cấy này chứa ít hơn 0,0001mg/l coban. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này không chứa coban.

Theo một số phương án, vi sinh vật này là *Thraustochytrid*. Theo một số phương án, vi sinh vật này sản xuất ra ít nhất là 3% EPA theo tổng khối lượng axit béo.

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này có nồng độ CO₂ hòa tan ít nhất là 5%. Theo các phương án khác, môi trường nuôi cấy này có nồng độ CO₂ hòa tan ít nhất là 10%. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này có nồng độ CO₂ hòa tan ít nhất là 15%.

Sáng chế cũng đề xuất sinh khối được phân lập, và dầu vi sinh vật được chiết từ sinh khối của phương pháp bất kỳ trong các phương pháp ở đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Nhiều phương án khác nhau của sáng chế có thể được hiểu một cách đầy đủ từ phần mô tả chi tiết sau đây, các hình vẽ, và các mô tả trình tự kèm theo là một phần của đơn này.

FIG. 1 thể hiện hoạt động của PTA-9695 trong gradien thiamin.

FIG. 2 thể hiện hoạt động của PTA-9695 trong gradien vitamin B12.

FIG. 3 thể hiện hoạt động của PTA-9695 trong gradien biotin.

FIG. 4 thể hiện hoạt động của PTA-9695 trong gradien Ca-pantothenat.

FIG. 5 thể hiện hoạt động của PTA-9695 trong các chuẩn TSFM.

FIG. 6 – FIG. 19 thể hiện hoạt động của PTA-9695 trong gradien vitamin B12 ở 10% CO₂.

FIG. 20 – FIG. 49 thể hiện hoạt động của PTA-10208 trong gradien vitamin B12 ở 10% CO₂.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương pháp và chế phẩm được đề xuất ở đây có thể áp dụng được cho Thraustochytrid tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA theo tổng khối lượng axit béo mà nó sản xuất ra. Thraustochytrid cụ thể tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA được đề xuất ở đây là vi sinh vật được phân lập thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212. Vi sinh vật được phân lập có số đăng ký ATCC là PTA-10212 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest vào ngày 14 tháng 7, 2009 tại American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

Thraustochytrid tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA điển hình được chọn từ vi sinh vật được phân lập được lưu giữ với số đăng ký ATCC

là PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, hoặc PTA-10211.

Phương án cụ thể được đề xuất ở đây đề cập đến vi sinh vật được phân lập chứa 18s rARN chứa trình tự polynucleotit của SEQ ID NO:1 hoặc trình tự polynucleotit có sự tương đồng ít nhất là 94% với SEQ ID NO:1.

Phương án cụ thể được đề xuất ở đây đề cập đến vi sinh vật được phân lập chứa trình tự polynucleotit 18s rARN mà có sự tương đồng ít nhất là 94% với trình tự polynucleotit 18s rARN của vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212.

Thraustochytrid tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA điển hình được đề xuất ở đây là vi sinh vật được phân lập thuộc loài được lưu giữ dưới số đăng ký ATCC số PTA-10208

Phương án cụ thể được đề xuất ở đây đề cập đến vi sinh vật được phân lập thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208, trong đó tổng số axit béo được sản xuất bởi vi sinh vật này chứa nhiều hơn 10% axit eicosapentaenoic theo khối lượng.

Thraustochytrid tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA theo sáng chế là vi sinh vật được phân lập có các đặc điểm thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208, trong đó tổng số axit béo được sản xuất bởi vi sinh vật này chứa nhiều hơn 10% axit eicosapentaenoic theo khối lượng. Thraustochytrid tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA được đề xuất ở đây được chọn từ vi sinh vật được phân lập được chọn từ chủng đột biến được lưu giữ dưới số đăng ký ATCC là PTA-10209, PTA-10210, hoặc PTA-10211. Các vi sinh vật có số đăng ký ATCC là PTA-10209, PTA-10210, và PTA-10211 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest vào 25 tháng 9, 2009 tại American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

Các phương án được đề xuất ở đây đề cập đến các vi sinh vật đã được mô tả, trên đây, các chủng đột biến của chúng và các vi sinh vật này đã được xác định trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/729,013 được nộp kèm theo đây.

Phương án được đề xuất ở đây đề cập đến vi sinh vật được phân lập mà sản xuất ra phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó hàm lượng axit eicosapentaenoic của phân đoạn triacylglyxerol này ít nhất là khoảng 12% khối lượng.

Một phương án được đề xuất ở đây đề cập đến sinh khối được phân lập, trong đó ít nhất khoảng 20% khối lượng tính theo khối lượng tế bào khô của sinh khối này là các axit béo, trong đó khoảng hơn 10% khối lượng các axit béo này là axit eicosapentaenoic, và trong đó các axit béo này chứa khoảng dưới 5% khối lượng mỗi axit arachidonic và axit docosapentaenoic n-6. Theo một số phương án, ít nhất khoảng 25% khối lượng các axit béo này là axit docosahexaenoic.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến sinh khối được phân lập chứa triaxylglyxerol, trong đó ít nhất khoảng 12% khối lượng triaxylglyxerol là axit eicosapentaenoic.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến bất kỳ trong số các sinh khối được phân lập theo sáng chế, trong đó các axit béo này chứa thêm khoảng dưới 5% khối lượng mỗi axit oleic, axit linoleic, axit linolenic, axit eicosenoic, và axit erucic.

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật *thraustochytrid* được phân lập thuộc loài *thraustochytrid* được lưu giữ dưới số đăng ký ATCC là PTA-9695 hoặc chủng thu được từ đó, trong đó tổng số axit béo được tổng hợp bởi vi sinh vật này hoặc chủng thu được từ đó chứa khoảng 10% hoặc ít hơn khối lượng axit eicosapentaenoic. Một phương án được đề xuất ở đây đề cập đến vi sinh vật được mô tả trên đây hoặc chủng của nó và vi sinh vật có liên

quan khác được mô tả trong công bố đơn patent Mỹ số US 2010/0239533 được nộp kèm theo đây để tham khảo.

Cũng được đề xuất ở đây là phương pháp làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối của vi sinh vật có các axit béo và nồng độ EPA bao gồm: lên men vi sinh vật này trong bình lên men, chứa khí, để sản xuất sinh khối, trong đó vi sinh vật này bao gồm Thraustochytrid tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA theo tổng khối lượng axit béo; và bổ sung vào khí này CO₂ với lượng đủ để làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối này. Sự gia tăng nồng độ EPA này có thể được so sánh với, ví dụ, nồng độ EPA của vi sinh vật được lên men tương tự mà không được bổ sung thêm CO₂ hoặc khi so với vi sinh vật được lên men tương tự ở điều kiện xung quanh.

Theo một phương án khác, lượng CO₂ đủ để làm tăng nồng độ EPA là lớn hơn hoặc bằng 2% tổng lượng khí trong bình. Theo một phương án khác, lượng CO₂ trong bình này lớn hơn hoặc bằng 5% đến khoảng 20% tổng lượng khí trong bình. Theo một phương án khác, lượng CO₂ trong bình là lớn hơn hoặc bằng khoảng 5% đến khoảng 15% tổng lượng khí trong bình.

Theo một phương án khác, lượng CO₂ được bổ sung vào là lớn hơn hoặc bằng 2% tổng lượng khí trong bình để làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối đến lớn hơn 4%, khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo, cụ thể hơn là từ khoảng lớn hơn 4% đến khoảng 45%, khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo, cụ thể hơn là, từ khoảng lớn hơn 4% đến khoảng 40% theo tổng khối lượng axit béo.

Theo một phương án khác, lượng CO₂ được bổ sung vào là đủ để làm tăng nồng độ EPA từ khoảng 4% đến khoảng từ 6 đến 30% khối lượng theo tổng khối lượng axit béo. Theo một phương án khác, lượng CO₂ được cung cấp là đủ để làm tăng nồng độ của EPA từ khoảng 15% đến khoảng 40% khối lượng theo tổng khối lượng axit béo. Theo một phương án khác, lượng

CO₂ được cung cấp là đủ để làm tăng nồng độ của EPA lên lớn hơn 20% khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo. Theo một phương án khác, CO₂ được cung cấp với lượng đủ để làm tăng nồng độ EPA từ khoảng 20% đến khoảng 25%.

Theo một phương án khác, được đề xuất ở đây là phương pháp làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối của vi sinh vật có các axit béo và nồng độ EPA bao gồm: lên men vi sinh vật này trong bình lên men để sản xuất sinh khối; tạo áp suất trên sinh khối đủ để làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối này. Sự tăng nồng độ EPA này có thể được so sánh với, ví dụ, nồng độ EPA của vi sinh vật được lên men tương tự mà không được tạo áp suất hoặc khi so với vi sinh vật được lên men tương tự ở điều kiện xung quanh. Theo một phương án khác, áp suất được tạo ra trên sinh khối là khoảng 0,5psi (3,447kPa) trên áp suất khí quyển. Theo một phương án khác, bình này có áp suất cột nước (hoặc đối áp suất) là lớn hơn hoặc bằng 0,4psi (2,758kPa), cụ thể hơn là từ khoảng 0,4psi (2,758kPa) đến khoảng 30psi (206,82kPa), cụ thể hơn nữa là từ khoảng 1psi (6,894kPa) đến khoảng 30psi (206,82kPa). Theo một phương án khác, bình này có áp suất cột nước là từ khoảng 1psi (6,894kPa) đến khoảng 20psi (137,88kPa). Theo một phương án khác, áp suất được tạo ra trong khoảng thời gian đủ để điều chỉnh lượng EPA trong sinh khối, cụ thể là trong khoảng thời gian đến 120 giờ.

Theo một phương án khác, được đề xuất ở đây là phương pháp sản xuất sinh khối của vi sinh vật tổng hợp axit béo và nồng độ EPA bao gồm lên men vi sinh vật này trong bình lên men để sản xuất sinh khối, trong đó vi sinh vật này bao gồm Thraustochytrid tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA theo tổng khối lượng axit béo ở nhiệt độ đủ để làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối. Theo một số phương án, nhiệt độ đủ để làm tăng nồng độ EPA là thấp hơn 30°C, cụ thể hơn là thấp hơn hoặc bằng 22°C, và cụ thể

hơn là nhiệt độ này là ít hơn hoặc bằng 21°C . Sự tăng nồng độ EPA có thể được so sánh với, ví dụ, nồng độ EPA ở vi sinh vật được lên men tương tự nhưng nhiệt độ không được điều chỉnh hoặc khi so với vi sinh vật được lên men tương tự ở các điều kiện xung quanh.

Theo một phương án khác, các phương pháp được đề xuất ở đây khác nhau về lượng EPA được tạo ra trong quá trình lên men để sản xuất sinh khối, và dầu chiết được, trong đó lượng EPA được đề xuất là lớn hơn 4%, cụ thể là từ khoảng lớn hơn 4% đến khoảng 45%, cụ thể hơn là từ khoảng lớn hơn 4% đến khoảng 40% khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo. Theo một phương án khác, lượng EPA được tạo ra bởi phương pháp được đề xuất ở đây là lượng từ khoảng 6% đến khoảng 30% khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo. Theo một phương án khác, lượng EPA được tạo ra bởi phương pháp được đề xuất ở đây là lượng từ khoảng 15% đến khoảng 40% khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo. Theo một phương án khác, lượng EPA được tạo ra bởi phương pháp được đề xuất ở đây là lượng lớn hơn 20%, cụ thể hơn là từ khoảng 20% đến khoảng 25% khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo.

Theo một phương án khác, nồng độ EPA mong muốn được đề xuất là lớn hơn 4%, cụ thể là từ khoảng lớn hơn 4% đến khoảng 45%, cụ thể hơn là từ khoảng lớn hơn 4% đến khoảng 40% khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo. Theo một phương án khác, nồng độ EPA mong muốn được tạo ra bởi phương pháp được đề xuất ở đây là lượng từ khoảng 6% đến khoảng 30% khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo. Theo một phương án khác, nồng độ EPA mong muốn được tạo ra bằng phương pháp được đề xuất ở đây là lượng từ khoảng 15% đến khoảng 40% khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo. Theo một phương án khác, nồng độ EPA mong muốn được tạo ra bằng phương pháp được đề xuất ở đây là lượng lớn hơn 20%,

cụ thể hơn là từ khoảng 20% đến khoảng 25% khối lượng, theo tổng khối lượng axit béo.

Phương pháp làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối của vi sinh vật có axit béo và nồng độ EPA bao gồm: lên men vi sinh vật này trong bình lên men để sản xuất sinh khối, trong đó vi sinh vật này bao gồm Thraustochytrid tổng hợp sinh khối chứa ít nhất là 3% EPA theo tổng khối lượng axit béo; và làm tăng sinh khối với lượng đủ để làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối. Theo một số phương án, lượng sinh khối đủ để làm tăng nồng độ EPA có tỉ trọng lớn hơn hoặc bằng 10g/l. Theo một số phương án, lượng sinh khối đủ để làm tăng nồng độ EPA có tỉ trọng là khoảng 10g/l đến khoảng 250g/l. Sự gia tăng nồng độ EPA này có thể được so sánh với, ví dụ, nồng độ EPA ở vi sinh vật được lên men tương tự, trong đó sinh khối này không được gia tăng.

Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ CO₂ lớn hơn (ví dụ, trong bình chứa CO₂ với lượng lớn hơn hoặc bằng 2%, lớn hơn hoặc bằng 5%, lớn hơn hoặc bằng 10%, lớn hơn hoặc bằng 15%, lớn hơn hoặc bằng 20%, 5% đến 20%, hoặc 5% đến 15% tổng lượng khí trong bình) lớn hơn ít nhất là 10%, ít nhất là 50%, ít nhất là 100%, ít nhất là 250%, ít nhất là 500%, ít nhất là 750%, ít nhất là 1000%, ít nhất là 1100%, ít nhất là 1200%, ít nhất là 1300%, ít nhất là 1400%, ít nhất là 1500%, ít nhất là 1600%, ít nhất là 1700%, ít nhất là 1800%, ít nhất là 1900%, hoặc ít nhất là 2000% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ CO₂ thấp hơn (ví dụ, trong bình chứa CO₂ với lượng lần lượt là ít hơn 2%, ít hơn 5%, ít hơn 10%, ít hơn 15%, ít hơn 20%, 0% đến 4%, hoặc 1% đến 3% tổng lượng khí trong bình). Ví dụ, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ CO₂ lớn hơn (ví dụ, trong bình chứa CO₂ với lượng lớn hơn hoặc

bằng 2%, lớn hơn hoặc bằng 5%, lớn hơn hoặc bằng 10%, lớn hơn hoặc bằng 15%, lớn hơn hoặc bằng 20%, 5% đến 20%, hoặc 5% đến 15% tổng lượng khí trong bình) lớn hơn ít nhất là 10%, ít nhất là 50%, ít nhất là 100%, ít nhất là 250%, ít nhất là 500%, ít nhất là 750%, ít nhất là 1000%, ít nhất là 1100%, ít nhất là 1200%, ít nhất là 1300%, ít nhất là 1400%, ít nhất là 1500%, ít nhất là 1600%, ít nhất là 1700%, ít nhất là 1800%, ít nhất là 1900%, hoặc ít nhất là 2000% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được nuôi trong bình ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh.

Vitamin B12 trong môi trường nuôi cấy

Thuật ngữ "vitamin B12" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ lớp các hợp chất có liên quan về mặt hóa học ở dạng tự nhiên hoặc tổng hợp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vitamin B12, cobalamin, xyanocobalamin, và hydroxocobalamin. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối của vi sinh vật sản xuất EPA bằng cách nuôi vi sinh vật này trong môi trường nuôi cấy có nồng độ vitamin B12 thấp hoặc trong môi trường nuôi cấy không chứa vitamin B12. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp sản xuất sinh khối của vi sinh vật có nồng độ EPA tăng, bao gồm nuôi vi sinh vật này trong môi trường nuôi cấy chứa ít hơn 0,1mg/l vitamin B12 để sản xuất sinh khối. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa ít hơn 0,05mg/l, ít hơn 0,01mg/l, ít hơn 0,005mg/l, ít hơn 0,001mg/l, ít hơn 0,0005mg/l, ít hơn 0,0001mg/l, hoặc không chứa vitamin B12.

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa ít hơn 1g nguồn vitamin B12 (chẳng hạn như dịch chiết nấm men, bột ngâm ngô, bột đậu tương, và các nguồn nitơ phức tạp khác) trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa ít

hơn 0,8g, ít hơn 0,5g, ít hơn 0,3g, ít hơn 0,1g, ít hơn 0,05g, hoặc ít hơn 0,01g nguồn vitamin B12 này trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa thêm ít hơn 1g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, ít hơn 0,8g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, ít hơn 0,5g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, ít hơn 0,3g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, ít hơn 0,1g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, ít hơn 0,05g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, hoặc ít hơn 0,01g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sinh khối không chứa lipid” dùng để chỉ khối lượng tế bào khô không chứa chất béo đích của vi sinh vật này sau khi nuôi cấy.

Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ vitamin B12 thấp hơn (ví dụ, trong môi trường nuôi cấy chứa ít hơn 0,1mg/l, ít hơn 0,05mg/l, ít hơn 0,01mg/l, ít hơn 0,005mg/l, ít hơn 0,001mg/l, ít hơn 0,0005mg/l, ít hơn 0,0001mg/l, hoặc không chứa vitamin B12) lớn hơn ít nhất là 10%, ít nhất là 25%, ít nhất là 50%, ít nhất là 75%, ít nhất là 100%, ít nhất là 150%, ít nhất là 200%, ít nhất là 250%, ít nhất là 300%, ít nhất là 350%, ít nhất là 400%, ít nhất là 450%, ít nhất là 500%, ít nhất là 550%, ít nhất là 600%, ít nhất là 650%, hoặc ít nhất là 700% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ vitamin B12 lớn hơn (ví dụ, trong môi trường nuôi cấy lần lượt chứa ít nhất là 0,1mg/l, ít nhất là 0,05mg/l, ít nhất là 0,01mg/l, ít nhất là 0,005mg/l, ít nhất là 0,001mg/l, ít nhất là 0,0005mg/l, ít nhất là 0,0001mg/l, hoặc ít nhất là 0,00005mg/l vitamin B12). Ví dụ, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy không chứa vitamin B12 lớn hơn ít nhất là 10%, ít nhất là 25%, ít nhất là 50%, ít nhất là 75%, ít nhất là 100%, ít nhất

là 150%, ít nhất là 200%, ít nhất là 250%, ít nhất là 300%, ít nhất là 350%, ít nhất là 400%, ít nhất là 450%, ít nhất là 500%, ít nhất là 550%, ít nhất là 600%, ít nhất là 650%, hoặc ít nhất là 700% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa vitamin B12 (chẳng hạn ít nhất là 0,0001mg/l vitamin B12).

Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ vitamin B12 thấp hơn (ví dụ, trong môi trường nuôi cấy chứa ít hơn 0,1mg/l, ít hơn 0,05mg/l, ít hơn 0,01mg/l, ít hơn 0,005mg/l, ít hơn 0,001mg/l, ít hơn 0,0005mg/l, ít hơn 0,0001mg/l, hoặc không chứa vitamin B12) ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh lớn hơn ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ vitamin B12 lớn hơn (ví dụ, trong môi trường nuôi cấy lần lượt chứa ít nhất là 0,1mg/l, ít nhất là 0,05mg/l, ít nhất là 0,01mg/l, ít nhất là 0,005mg/l, ít nhất là 0,001mg/l, ít nhất là 0,0005mg/l, ít nhất là 0,0001mg/l, hoặc ít nhất là 0,00005mg/l vitamin B12) ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh. Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ vitamin B12 thấp hơn ở mức nồng độ CO₂ môi trường xung quanh lớn hơn từ 100% đến 700%, 150% đến 650%, 200% đến 600%, 250% đến 550%, hoặc 300% đến 500% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ vitamin B12 lớn hơn ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh. Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ vitamin B12 thấp hơn ở nồng độ CO₂ cao (ví dụ, nồng độ CO₂ hòa tan ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 15%, hoặc ít nhất là 20%) lớn hơn ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 15%, ít nhất là 20%, ít nhất là 25%, ít nhất là 30%, ít nhất là

40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, ít nhất là 90%, hoặc lớn hơn ít nhất là 100% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ vitamin B12 lớn hơn ở nồng độ CO₂ cao. Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ vitamin B12 thấp hơn ở nồng độ CO₂ cao (ví dụ, nồng độ CO₂ hòa tan ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 15%, hoặc ít nhất là 20%) là lớn hơn từ 5% đến 200%, 10% đến 175%, 15% đến 150%, 20% đến 125%, hoặc 25% đến 100% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa mức nồng độ vitamin B12 lớn hơn ở nồng độ CO₂ cao. Ví dụ, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy không chứa vitamin B12 ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh là lớn hơn ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa vitamin B12 (chẳng hạn như, ít nhất là 0,0001mg/l vitamin B12) ở mức nồng độ CO₂ môi trường xung quanh. Ví dụ khác là, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy không chứa vitamin B12 ở nồng độ CO₂ hòa tan ít nhất là 10% lớn hơn ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 15%, ít nhất là 20%, ít nhất là 25%, ít nhất là 30%, ít nhất là 40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, ít nhất là 90%, hoặc lớn hơn ít nhất là 100% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa vitamin B12 (chẳng hạn như, ít nhất là 0,0001mg/l vitamin B12) trong nồng độ CO₂ hòa tan ít nhất là 10%.

Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% trong sinh khối vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy có ít hơn

0,1mg/l vitamin B12 so với cùng vi sinh vật đó được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ vitamin B12 lớn hơn 0,1mg/l. Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% trong sinh khối của vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy có ít hơn 0,01mg/l vitamin B12 so với cùng vi sinh vật đó được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ vitamin B12 lớn hơn 0,01mg/l. Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% trong sinh khối của vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ vitamin B12 thấp hơn 0,001mg/l so với cùng vi sinh vật đó được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ vitamin B12 lớn hơn 0,001mg/l. Theo các phương án khác, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% trong sinh khối của vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ vitamin B12 thấp hơn 0,0001mg/l so với cùng vi sinh vật đó được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ vitamin B12 lớn hơn 0,0001mg/l. Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% trong sinh khối của vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy không chứa vitamin B12 so với cùng vi sinh vật đó được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa lượng vitamin B12. Có thể xác định sự tăng nồng độ EPA trong sinh khối bằng cách nuôi vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy có lượng vitamin B12 lớn hơn, nuôi cùng vi sinh vật đó trong môi trường nuôi cấy có lượng vitamin B12 thấp hơn, và so sánh nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ mỗi môi trường nuôi cấy. Trong phép xác định này, hàm lượng của môi trường nuôi cấy có lượng vitamin B12 thấp hơn hoặc lớn hơn là giống nhau ngoại trừ mức hàm lượng vitamin B12 của chúng.

Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa ít nhất là 0,1mg/l, ít nhất là 0,05mg/l, ít nhất là 0,01mg/l, ít nhất là 0,005mg/l, ít nhất là 0,001mg/l, ít nhất là 0,0005mg/l, hoặc ít nhất là 0,0001mg/l vitamin B12 là ít nhất là 1%, ít nhất là 2%, ít nhất là 3%, ít nhất là 4%, hoặc ít nhất là 5% EPA theo khối lượng của tổng lượng axit béo. Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối vi sinh vật này được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa ít nhất là 0,1mg/l, ít nhất là 0,05mg/l, ít nhất là 0,01mg/l, ít nhất là 0,005mg/l, ít nhất là 0,001mg/l, ít nhất là 0,0005mg/l, hoặc ít nhất là 0,0001mg/l vitamin B12 là từ 1% đến 50%, 1% đến 40%, 1% đến 30%, 1% đến 20%, 2% đến 50%, 2% đến 40%, 2% đến 30%, hoặc từ 2% đến 20% EPA theo khối lượng của tổng lượng axit béo.

Coban trong môi trường nuôi cấy

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sinh khối vi sinh vật có nồng độ EPA tăng, bao gồm nuôi vi sinh vật này trong môi trường nuôi cấy chứa ít hơn 0,1mg/l coban để sản xuất sinh khối. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa ít hơn 0,05mg/l, ít hơn 0,01mg/l, ít hơn 0,005mg/l, ít hơn 0,001mg/l, ít hơn 0,0005mg/l, ít hơn 0,0001mg/l, hoặc không chứa coban.

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa thêm ít hơn 1g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, ít hơn 0,8g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, ít hơn 0,5g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, ít hơn 0,3g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, ít hơn 0,1g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, ít hơn 0,05g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid, hoặc ít hơn 0,01g dịch chiết nấm men trong mỗi 50g sinh khối không chứa lipid.

Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ coban thấp hơn (ví dụ, trong môi trường nuôi cấy chứa ít hơn 0,1mg/l, ít hơn 0,05mg/l, ít hơn 0,01mg/l, ít hơn 0,005mg/l, ít hơn 0,001mg/l, ít hơn 0,0005mg/l, ít hơn 0,0001mg/l, hoặc không chứa coban) lớn hơn ít nhất là 10%, ít nhất là 25%, ít nhất là 50%, ít nhất là 75%, ít nhất là 100%, ít nhất là 150%, ít nhất là 200%, ít nhất là 250%, ít nhất là 300%, ít nhất là 350%, ít nhất là 400%, ít nhất là 450%, ít nhất là 500%, ít nhất là 550%, ít nhất là 600%, ít nhất là 650%, hoặc ít nhất là 700% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ coban lớn hơn (ví dụ, trong môi trường nuôi cấy chứa lần lượt ít nhất là 0,1mg/l, ít nhất là 0,05mg/l, ít nhất là 0,01mg/l, ít nhất là 0,005mg/l, ít nhất là 0,001mg/l, ít nhất là 0,0005mg/l, ít nhất là 0,0001mg/l, hoặc ít nhất là 0,00005mg/l coban). Ví dụ, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy không chứa coban lớn hơn ít nhất là 10%, ít nhất là 25%, ít nhất là 50%, ít nhất là 75%, ít nhất là 100%, ít nhất là 150%, ít nhất là 200%, ít nhất là 250%, ít nhất là 300%, ít nhất là 350%, ít nhất là 400%, ít nhất là 450%, ít nhất là 500%, ít nhất là 550%, ít nhất là 600%, ít nhất là 650%, hoặc ít nhất là 700% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật này được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa coban (chẳng hạn như, ít nhất là 0,0001mg/l coban).

Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ coban thấp (ví dụ, trong môi trường nuôi cấy chứa ít hơn 0,1mg/l, ít hơn 0,05mg/l, ít hơn 0,01mg/l, ít hơn 0,005mg/l, ít hơn 0,001mg/l, ít hơn 0,0005mg/l, ít hơn 0,0001mg/l, hoặc không chứa coban) ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh lớn hơn ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật này

được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ coban lớn hơn (ví dụ, trong môi trường nuôi cấy chứa lần lượt ít nhất là 0,1mg/l, ít nhất là 0,05mg/l, ít nhất là 0,01mg/l, ít nhất là 0,005mg/l, ít nhất là 0,001mg/l, ít nhất là 0,0005mg/l, ít nhất là 0,0001mg/l, hoặc ít nhất là 0,00005mg/l coban) ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh. Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ coban thấp hơn ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh lớn hơn từ 100% đến 700%, 150% đến 650%, 200% đến 600%, 250% đến 550%, hoặc 300% đến 500% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật này được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ coban lớn hơn ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh. Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ coban thấp dưới mức CO₂ cao (ví dụ, mức CO₂ hòa tan ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 15%, hoặc ít nhất là 20%) ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 15%, ít nhất là 20%, ít nhất là 25%, ít nhất là 30%, ít nhất là 40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 100% cao hơn nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật này được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ coban lớn hơn dưới mức CO₂ cao. Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ coban thấp hơn ở nồng độ CO₂ cao (ví dụ, nồng độ CO₂ hòa tan ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 15%, hoặc ít nhất là 20%) lớn hơn từ 5% đến 200%, 10% đến 175%, 15% đến 150%, 20% đến 125%, hoặc 25% đến 100% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật này được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ coban lớn hơn ở nồng độ CO₂ cao. Ví dụ, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy không chứa coban ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh lớn hơn ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%,

hoặc ít nhất là 500% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật này được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa coban (chẳng hạn như, ít nhất là 0,0001mg/l coban) ở nồng độ CO₂ môi trường xung quanh. Ví dụ khác là, nồng độ EPA của sinh khối được phát triển trong môi trường nuôi cấy không chứa coban ở nồng độ CO₂ hòa tan ít nhất là 10% là lớn hơn ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 15%, ít nhất là 20%, ít nhất là 25%, ít nhất là 30%, ít nhất là 40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 100% so với nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ vi sinh vật này được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa coban (chẳng hạn như, ít nhất là 0,0001mg/l coban) ở nồng độ CO₂ hòa tan ít nhất là 10%.

Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% trong sinh khối của vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ coban thấp hơn 0,1mg/l so với cùng vi sinh vật đó được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ coban lớn hơn 0,1mg/l. Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% trong sinh khối của vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ coban thấp hơn 0,01mg/l so với cùng vi sinh vật đó được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ coban lớn hơn 0,01mg/l. Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% trong sinh khối của vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ coban thấp hơn 0,001mg/l so với cùng vi sinh vật đó được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ coban lớn hơn 0,001mg/l. Theo các phương án khác, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% trong sinh khối của vi sinh vật được

phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ coban thấp hơn 0,0001mg/l coban so với cùng vi sinh vật đó được phát triển trong môi trường nuôi cấy có nồng độ coban lớn hơn 0,0001mg/l. Theo một số phương án, nồng độ EPA được gia tăng ít nhất là 100%, ít nhất là 200%, ít nhất là 300%, ít nhất là 400%, hoặc ít nhất là 500% trong sinh khối của vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy không chứa coban so với cùng vi sinh vật đó được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa một lượng coban. Việc xác định sự tăng nồng độ EPA trong sinh khối có thể được thực hiện bằng cách nuôi vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy có lượng coban cao, nuôi cùng vi sinh vật đó trong môi trường nuôi cấy có lượng coban thấp hơn, và so sánh nồng độ EPA trong sinh khối thu được từ mỗi môi trường nuôi cấy. Trong phép xác định này, thành phần của môi trường nuôi cấy có lượng coban lớn hơn hoặc thấp hơn là giống nhau ngoại trừ hàm lượng coban của chúng.

Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối của vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa ít nhất là 0,1mg/l, ít nhất là 0,05mg/l, ít nhất là 0,01mg/l, ít nhất là 0,005mg/l, ít nhất là 0,001mg/l, ít nhất là 0,0005mg/l, hoặc ít nhất là 0,0001mg/l coban là ít nhất là 1%, ít nhất là 2%, ít nhất là 3%, ít nhất là 4%, hoặc ít nhất là 5% EPA theo khối lượng của tổng lượng axit béo. Theo một số phương án, nồng độ EPA của sinh khối của vi sinh vật được phát triển trong môi trường nuôi cấy chứa ít nhất là 0,1mg/l, ít nhất là 0,05mg/l, ít nhất là 0,01mg/l, ít nhất là 0,005mg/l, ít nhất là 0,001mg/l, ít nhất là 0,0005mg/l, hoặc ít nhất là 0,0001mg/l coban là từ 1% đến 50%, 1% đến 40%, 1% đến 30%, 1% đến 20%, 2% đến 50%, 2% đến 40%, 2% đến 30%, hoặc 2% đến 20% EPA theo khối lượng của tổng lượng axit béo.

Môi trường nuôi cấy chứa lượng thấp vitamin B12, dịch chiết nấm men, và/hoặc coban có thể chứa thêm lượng CO₂ hòa tan ít nhất là 5%, ít

nhất là 10%, ít nhất là 15%, hoặc ít nhất là 20%. Sáng chế đề cập đến sinh khối được phân lập theo các phương pháp được mô tả ở đây, cũng như dầu vi sinh vật được chiết từ sinh khối theo các phương pháp này.

Sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy được phân lập chứa bất kỳ trong số các vi sinh vật theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế đề cập đến thực phẩm, mỹ phẩm, hoặc dược phẩm cho động vật không phải là người hoặc người, chứa bất kỳ trong số các vi sinh vật này hoặc sinh khối theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế đề cập đến dầu vi sinh vật chứa ít nhất khoảng 20% khối lượng axit eicosapentaenoic và ít hơn khoảng 5% khối lượng mỗi axit arachidonic, axit docosapentaenoic n-6, axit oleic, axit linoleic, axit linolenic, axit eicosenoic, axit erucic, và axit stearidonic. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa thêm ít nhất khoảng 25% khối lượng axit docosaheptaenoic.

Sáng chế đề cập đến dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triaxylglycerol chứa ít nhất khoảng 10% khối lượng, trong đó ít nhất khoảng 12% khối lượng axit béo trong phân đoạn triaxylglycerol là axit eicosapentaenoic, trong đó ít nhất khoảng 25% khối lượng axit béo trong phân đoạn triaxylglycerol là axit docosaheptaenoic, và trong đó ít hơn khoảng 5% khối lượng axit béo trong phân đoạn triaxylglycerol là axit arachidonic.

Sáng chế đề cập đến thực phẩm, mỹ phẩm hoặc dược phẩm cho động vật không phải là người hoặc người, chứa bất kỳ trong số các dầu vi sinh vật theo sáng chế. Theo một số phương án, thực phẩm này là sữa công thức cho trẻ sơ sinh. Theo một số phương án, sữa công thức cho trẻ sơ sinh là thích hợp cho trẻ sinh non. Theo một số phương án, thực phẩm này là sữa, đồ uống, đồ uống chữa bệnh, đồ uống dinh dưỡng, hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, thực phẩm này là chất phụ gia cho thức ăn của người hoặc động vật không phải là người. Theo một số phương án,

thực phẩm này là thực phẩm dinh dưỡng bổ sung. Theo một số phương án, thực phẩm này là thức ăn cho động vật. Theo một số phương án, thức ăn cho động vật này là thức ăn nuôi trồng thủy sản. Theo một số phương án, thức ăn của động vật này là thức ăn cho động vật trang trại, thức ăn cho động vật trong vườn bách thú, thức ăn cho động vật làm việc, thức ăn cho động vật nuôi, hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất dầu vi sinh vật chứa các axit béo omega-3, phương pháp này bao gồm: nuôi các vi sinh vật được phân lập theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng trong môi trường nuôi cấy để tạo ra dầu chứa axit béo omega-3. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm thêm bước chiết dầu.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất dầu vi sinh vật chứa axit béo omega-3, phương pháp này bao gồm chiết dầu chứa axit béo omega-3 từ bất kỳ trong số các sinh khối theo sáng chế. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này được chiết bằng cách sử dụng quy trình chiết dung môi hữu cơ, ví dụ, chiết bằng hexan. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật được chiết bằng cách sử dụng quy trình chiết không sử dụng dung môi.

Sáng chế đề cập đến dầu vi sinh vật được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sinh khối theo sáng chế, bao gồm: nuôi bất kỳ trong số các vi sinh vật được phân lập theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng trong môi trường nuôi cấy để sản xuất sinh khối.

Sáng chế đề cập đến sinh khối được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế.

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra chủng đột biến theo sáng chế, bao gồm: gây đột biến bất kỳ trong số các vi sinh vật theo sáng chế, và phân lập chủng đột biến.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng bất kỳ trong số các vi sinh vật được phân lập, sinh khối, hoặc dầu vi sinh vật theo sáng chế, hoặc hỗn hợp của chúng để sản xuất thuốc để điều trị bệnh viêm hoặc tình trạng liên quan đến bệnh này.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng bất kỳ trong số các vi sinh vật được phân lập, sinh khối, hoặc dầu vi sinh vật theo sáng chế, hoặc hỗn hợp của chúng, để điều trị bệnh viêm hoặc tình trạng có liên quan đến bệnh này.

Sáng chế đề cập đến bất kỳ trong số các vi sinh vật được phân lập, sinh khối, hoặc dầu vi sinh vật theo sáng chế, hoặc hỗn hợp của chúng, để sử dụng trong việc điều trị bệnh viêm hoặc tình trạng liên quan đến bệnh này.

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh viêm hoặc tình trạng liên quan đến bệnh này ở bệnh nhân cần được điều trị, bao gồm sử dụng cho bệnh nhân này bất kỳ trong số các vi sinh vật được phân lập, sinh khối, hoặc dầu vi sinh vật theo sáng chế, hoặc hỗn hợp của chúng, và chất mang được dụng.

Sáng chế đề cập đến phương pháp tổng hợp dầu vi sinh vật, và sinh khối, từ vi sinh vật theo sáng chế, và phương pháp sử dụng vi sinh vật, sinh khối, và dầu vi sinh vật này.

Vi sinh vật

Theo một số phương án, tế bào vi sinh vật để sử dụng theo sáng chế là vi sinh vật thuộc ngành Labyrinthulomycota. Theo một số phương án, tế bào vi sinh vật thuộc ngành Labyrinthulomycota là thraustochytrid, chẳng hạn như *Schizochytrium* hoặc *Thraustochytrium*. Theo sáng chế, thuật ngữ "thraustochytrid" dùng để chỉ thành viên bất kỳ thuộc bộ Thraustochytriales, bộ này bao gồm họ Thraustochytriaceae, và thuật ngữ "labyrinthulid" dùng để chỉ thành viên bất kỳ thuộc bộ Labyrinthulales, bao gồm họ Labyrinthulaceae.

Trước đây, thành viên của họ Labyrinthulaceae được xem là thành viên của bộ Thraustochytriales, nhưng trong các sửa đổi gần đây về phân loại taxonomic các sinh vật này, họ Labyrinthulaceae hiện nay được xem là thành viên của bộ Labyrinthulales. Cả Labyrinthulales và Thraustochytriales đều được xem là thành viên của ngành Labyrinthulomycota. Các nhà lý luận taxonomic hiện nay thường xếp cả hai nhóm vi sinh vật này cùng với tảo hoặc sinh vật đơn bào giống tảo thuộc dòng Stramenopile. Việc xếp phân loại hiện nay của thraustochytrid và labyrinthulids có thể được tổng kết như sau:

Giới: Stramenopila (Chromista)

Ngành: Labyrinthulomycota (Heterokonta)

Lớp: Labyrinthulomycetes (Labyrinthulae)

Bộ: Labyrinthulales

Họ: Labyrinthulaceae

Bộ: Thraustochytriales

Họ: Thraustochytriaceae

Với các mục đích của sáng chế, các chủng của tế bào vi sinh vật được mô tả là thraustochytrid bao gồm các vi sinh vật sau đây: Bộ: Thraustochytriales; Họ: Thraustochytriaceae; Loài: *Thraustochytrium* (Loài: sp., *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum*, và *striatum*), *Ulkenia* (Loài: sp., *amoeboidea*, *keruelensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrops*, *visurgensis*, *yorkensis*, và sp. BP-5601), *Schizochytrium* (Loài: sp., *aggregatum*, *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum*, và *octosporum*), *Japonochytrium* (Loài: sp., *marinum*), *Aplanochytrium* (Loài: sp., *haliotidis*, *keruelensis*, *profunda*, and *stocchinoi*), *Althornia* (Loài: sp., *crouchii*), hoặc *Elina* (Loài: sp., *marisalba*, and *sinorifica*). Với các mục đích theo sáng chế, các loài được mô tả trong *Ulkenia* sẽ được

xem là các thành viên của giống *Thraustochytrium*. *Aurantiacochytrium* và *Oblogospora* là hai giống bổ sung được bao gồm bởi ngành Labyrinthulomycota trong sáng chế. Theo một số phương án, tế bào vi sinh vật thuộc giống *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, và hỗn hợp của chúng.

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập và các chủng thu được từ nó. Chủng mà “thu được” từ vi sinh vật được phân lập theo sáng chế có thể là dẫn xuất tự nhiên hoặc nhân tạo, ví dụ, đột biến, biến thể hoặc chủng tái tổ hợp. Thuật ngữ “được phân lập” như được sử dụng ở đây không nhất thiết phải phản ánh mức độ mà thể phân lập này được tinh chế, mà chỉ ra sự phân lập hoặc tách khỏi dạng tự nhiên hoặc môi trường tự nhiên. Thể phân lập có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở, vi sinh vật được phân lập, sinh khối được phân lập, môi trường nuôi cấy được phân lập, dầu vi sinh vật được phân lập và trình tự được phân lập (chẳng hạn như, trình tự polynucleotit được phân lập đã mô tả ở đây). Thuật ngữ “vi sinh vật” như được sử dụng ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuật ngữ “vi tảo”, “thraustochytrid”, và phân loại taxonomic liên quan đến bất kỳ trong số các vi sinh vật đã được lưu giữ được mô tả ở đây. Thuật ngữ “Thraustochytriales,” “thraustochytrid,” “*Schizochytrium*,” và “*Thraustochytrium*” như được sử dụng khi đề cập đến bất kỳ trong số các vi sinh vật theo sáng chế, bao gồm các vi sinh vật lưu giữ đã được mô tả ở đây, là dựa vào phân loại taxon hiện nay bao gồm thông tin phát sinh loài sẵn có và không được dự định giới hạn vào hiện tượng mà phân loại taxonomic được sửa lại sau ngày nộp đơn này.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212. Vi sinh vật được lưu giữ liên quan đến số đăng ký ATCC là PTA-10212 còn được biết ở đây là *Thraustochytrium* sp. ATCC PTA-10212. Vi sinh vật được phân lập liên quan đến số đăng ký ATCC PTA-10212 được lưu giữ theo

Hiệp ước Budapest Treaty vào ngày 14, tháng 7, 2009 tại American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chủng được phân lập được lưu giữ dưới số đăng ký ATCC PTA-10212. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập được lưu giữ với số đăng ký ATCC PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, hoặc PTA-10211.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập có các đặc điểm thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212 hoặc chủng thu được từ loài này. Các đặc điểm của loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212 có thể bao gồm sự sinh trưởng của nó và các đặc điểm về kiểu hình (ví dụ về các đặc điểm kiểu hình bao gồm các đặc điểm về hình thái và sinh sản), các đặc điểm sinh lý và hóa học của nó (như khối lượng khô và profin lipid), trình tự gen của nó và các tổ hợp của nó, trong đó các đặc điểm này phân biệt loài này với các loài đã được xác định trước đây. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập có các đặc điểm của loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212, trong đó các đặc điểm này bao gồm 18s rARN chứa trình tự polynucleotit của SEQ ID NO:1 hoặc trình tự polynucleotit có sự tương đồng ít nhất là 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:1, các đặc điểm về hình thái và sinh sản của loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212, và các profin axit béo của loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212. Theo một số phương án, vi sinh vật được phân lập theo sáng chế có các đặc điểm kiểu hình gần như là giống với vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212. Theo một số phương án, vi sinh vật được lưu giữ theo sáng chế có các đặc điểm sinh trưởng gần như là giống với vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật

được phân lập chứa 18s rARN chứa trình tự polynucleotit của SEQ ID NO:1 hoặc trình tự polynucleotit có sự tương đồng ít nhất là 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập chứa trình tự polynucleotit của 18s rARN có sự tương đồng ít nhất là 94% với trình tự polynucleotit 18s rARN của vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chủng đột biến của vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212. Theo các phương án khác, chủng đột biến này là chủng được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10213, PTA-10214, hoặc PTA-10215. Các vi sinh vật liên quan đến số đăng ký ATCC PTA-10213, PTA-10214, và PTA-10215 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest vào ngày 14 tháng 7, 2009 tại American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208. Vi sinh vật được phân lập liên quan đến số đăng ký ATCC PTA-10208 còn được biết ở đây là *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-10208. Vi sinh vật liên quan đến số đăng ký ATCC PTA-10208 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest vào ngày 14 tháng 7, 2009 tại American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chủng được phân lập được lưu giữ dưới số đăng ký ATCC là PTA-10208.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208, trong đó tổng lượng axit béo được tạo ra bởi vi sinh vật này bao gồm hơn 10%, hơn 11%, hơn 12%, hơn 13%, hơn 14%, hơn 15%, hơn 16%, hơn 17%, hơn

18%, hơn 19%, hoặc hơn 20% EPA theo khối lượng. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208, trong đó tổng lượng axit béo được tạo ra bởi vi sinh vật này chứa khoảng 10% đến khoảng 55%, khoảng 10% đến khoảng 50%, khoảng 10% đến khoảng 45%, khoảng 10% đến khoảng 40%, khoảng 10% đến khoảng 35%, khoảng 10% đến khoảng 30%, khoảng 15% đến khoảng 55%, khoảng 15% đến khoảng 50%, khoảng 15% đến khoảng 45%, khoảng 15% đến khoảng 40%, khoảng 15% đến khoảng 35%, khoảng 15% đến khoảng 30%, khoảng 20% đến khoảng 55%, khoảng 20% đến khoảng 50%, khoảng 20% đến khoảng 45%, khoảng 20% đến khoảng 40%, khoảng 20% đến khoảng 35%, hoặc khoảng 20% đến khoảng 30% EPA theo khối lượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập có các đặc điểm của loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208, trong đó tổng lượng axit béo được tạo ra bởi vi sinh vật này chứa hơn 10% theo khối lượng axit eicosapentaenoic. Các đặc điểm của vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208 bao gồm các đặc điểm sinh trưởng và đặc điểm kiểu hình của nó (ví dụ về các đặc điểm kiểu hình bao gồm đặc điểm hình thái và sinh sản), các đặc điểm vật lý và hóa học của nó (như khối lượng khô và profin lipid), các trình tự gen của nó, và các tổ hợp của nó, trong đó các đặc điểm này phân biệt loài này với các loài đã được xác định trước đây. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập có các đặc điểm thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212, trong đó các đặc điểm này bao gồm 18s rARN chứa trình tự polynucleotit của SEQ ID NO:2, các đặc điểm hình thái và sinh sản thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208, và các profin axit béo của loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208. Theo một số phương án, vi sinh vật được phân lập theo sáng

chế có các đặc điểm vật lý và hóa học gần giống với của vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chủng đột biến của vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208. Theo các phương án khác, chủng đột biến này là chủng được lưu giữ với số đăng ký ATCC PTA-10209, PTA-10210, hoặc PTA-10211. Các vi sinh vật này liên quan đến số đăng ký ATCC PTA-10209, PTA-10210, và PTA-10211 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest ngày 25 tháng 9, 2009 tại American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập theo sáng chế tạo ra phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó hàm lượng EPA của phân đoạn triaxylglyxerol ít nhất là khoảng 12%, ít nhất là khoảng 13%, ít nhất là khoảng 14%, ít nhất là khoảng 15%, ít nhất là khoảng 16%, ít nhất là khoảng 17%, ít nhất là khoảng 18%, ít nhất là khoảng 19%, hoặc ít nhất là khoảng 20% khối lượng. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật được phân lập sản xuất phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó hàm lượng EPA của phân đoạn triaxylglyxerol này là khoảng 12% đến khoảng 55%, khoảng 12% đến khoảng 50%, khoảng 12% đến khoảng 45%, khoảng 12% đến khoảng 40%, khoảng 12% đến khoảng 35%, khoảng 12% đến khoảng 30%, khoảng 15% đến khoảng 45%, khoảng 15% đến khoảng 40%, khoảng 15% đến khoảng 35%, khoảng 15% đến khoảng 30%, hoặc khoảng 20% đến khoảng 30% khối lượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến thể đột biến, biến thể, hoặc thể tái tổ hợp của vi sinh vật được phân lập theo sáng chế mà tạo ra phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó hàm lượng EPA của phân đoạn triaxylglyxerol này ít nhất là khoảng 10%, ít nhất là khoảng 11%, ít nhất là khoảng 12%, ít nhất là khoảng 13%, ít nhất là khoảng 14%, ít nhất là

khoảng 15%, ít nhất là khoảng 16%, ít nhất là khoảng 17%, ít nhất là khoảng 18%, ít nhất là khoảng 19%, hoặc ít nhất là khoảng 20% khối lượng. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến đột biến, biến thể hoặc thể tái tổ hợp của vi sinh vật được phân lập theo sáng chế mà sản xuất ra phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó hàm lượng EPA của phân đoạn triaxylglyxerol này là khoảng 12% đến khoảng 55%, khoảng 12% đến khoảng 50%, khoảng 12% đến khoảng 45%, khoảng 12% đến khoảng 40%, khoảng 12% đến khoảng 35%, khoảng 12% đến khoảng 30%, khoảng 15% đến khoảng 55%, khoảng 15% đến khoảng 50%, khoảng 15% đến khoảng 45%, khoảng 15% đến khoảng 40%, khoảng 15% đến khoảng 35%, khoảng 15% đến khoảng 30%, khoảng 20% đến khoảng 55%, khoảng 20% đến khoảng 50%, khoảng 20% đến khoảng 45%, khoảng 20% đến khoảng 40%, khoảng 20% đến khoảng 35%, hoặc khoảng 20% đến khoảng 30% khối lượng. Các chủng ddb có thể được tạo ra bằng các quy trình đã được biết rõ. Các quy trình phổ biến bao gồm chiếu xạ, xử lý ở nhiệt độ cao, và xử lý bằng chất gây đột biến. Các chủng biến đổi có thể là các thể phân lập có trong tự nhiên và/hoặc các thể phân lập phụ của các loài được mô tả ở đây. Các chủng tái tổ hợp có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ đã được biết rõ trong lĩnh vực sinh học phân tử về biểu hiện gen ngoại sinh hoặc thay đổi chức năng hoặc sự biểu hiện gen nội sinh. Theo một số phương án, thể đột biến, biến thể, hoặc chủng tái tổ hợp này sản sinh ra lượng axit béo omega-3 lớn hơn, đặc biệt là EPA, so với chủng kiểu hoang. Theo một số phương án, chủng đột biến, biến thể hoặc chủng tái tổ hợp này sản sinh ra một hoặc nhiều axit béo với lượng thấp hơn, chẳng hạn như lượng DHA, ARA, DPA n-6, hoặc hỗn hợp của chúng thấp hơn. Theo một số phương án, chủng đột biến, biến thể hoặc chủng tái tổ hợp này sản sinh ra khối lượng tế bào khô lớn hơn trong mỗi lit môi trường nuôi cấy so với chủng

kiểu hoang. Các chủng đột biến, biến thể hoặc chủng tái tổ hợp này là các ví dụ về các chủng thu được từ vi sinh vật được phân lập theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến vi sinh vật *thraustochytrid* được phân lập có các đặc điểm của loài *thraustochytrid* được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695, trong đó tổng lượng axit béo được tạo ra bởi vi sinh vật này hoặc chủng thu được từ đó chứa khoảng 10% hoặc ít hơn theo khối lượng axit eicosapentaenoic.

Sáng chế cũng đề cập đến vi sinh vật *thraustochytrid* được phân lập, hoặc chủng thu được từ đó, chứa phân đoạn triglyxerit, trong đó hàm lượng axit docosaheptaenoic của phân đoạn triglyxerit này ít nhất là khoảng 40% khối lượng, trong đó hàm lượng axit docosapentaenoic n-6 của phân đoạn triglyxerit là từ ít nhất khoảng 0,5% khối lượng đến khoảng 6% khối lượng, và trong đó tổng lượng axit béo được sản sinh bởi vi sinh vật này hoặc chủng thu được từ đó chứa khoảng 10% hoặc ít hơn theo khối lượng axit eicosapentaenoic.

Sáng chế cũng đề cập đến vi sinh vật *thraustochytrid* được phân lập của cùng một loài với *thraustochytrid* được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695, hoặc chủng thu được từ đó, trong đó tổng lượng axit béo được tạo ra bởi vi sinh vật này hoặc chủng thu được từ đó chứa khoảng 10% hoặc ít hơn theo khối lượng axit eicosapentaenoic.

Theo một số phương án, chủng thu được từ vi sinh vật *thraustochytrid* được phân lập theo sáng chế là chủng đột biến.

Sáng chế cũng đề cập đến vi sinh vật được phân lập được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695, PTA-9696, PTA-9697, hoặc PTA-9698.

Sáng chế cũng đề cập đến sinh khối *athraustochytrid* chứa bất kỳ một trong số các vi sinh vật *thraustochytrid* theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế cũng đề cập đến sinh khối *thraustochytrid* được phân lập, trong đó ít nhất khoảng 50% theo khối lượng của khối lượng tế bào khô của sinh khối là các axit béo, và trong đó ít nhất khoảng 50% khối lượng các axit béo này là axit béo omega-3. Theo một số phương án, ít nhất khoảng 50% khối lượng các axit béo này là axit docosahexaenoic. Sáng chế cũng đề cập đến sinh khối *thraustochytrid* được phân lập, trong đó ít nhất khoảng 25% khối lượng theo khối lượng tế bào khô của sinh khối là axit docosahexaenoic.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề cập đến sinh khối *thraustochytrid* được phân lập, trong đó axit eicosapentaenoic chiếm khoảng 10% khối lượng các axit béo này hoặc ít hơn, và trong đó tỉ lệ khối lượng của axit docosahexaenoic so với axit eicosapentaenoic ít nhất là khoảng 5:1.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề cập đến sinh khối *thraustochytrid* được phân lập, trong đó khoảng 1,5% khối lượng các axit béo này hoặc thấp hơn là axit arachidonic, và trong đó tỉ lệ khối lượng của axit docosahexaenoic so với axit arachidonic ít nhất là khoảng 20:1.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề cập đến sinh khối *thraustochytrid* được phân lập chứa tỉ lệ khối lượng axit docosahexaenoic so với axit docosapentaenoic n-6 ít nhất là khoảng 10:1. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến *thraustochytrid* thuộc loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695. *Thraustochytrid* đã phân lập còn được biết ở đây là *Schizochytrium sp.* ATCC PTA-9695. *Thraustochytrid* có số đăng ký ATCC là PTA-9695 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest vào ngày 7, tháng 1, 2009 tại American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chủng *thraustochytrid* được phân lập được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695. Theo một

số phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật *thraustochytrid* được phân lập thuộc cùng một loài với *thraustochytrid* được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến *thraustochytrid* được phân lập có các đặc điểm của loài được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695 hoặc chủng thu được từ đó. Các đặc điểm của loài *thraustochytrid* được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695 bao gồm các đặc điểm sinh trưởng và đặc điểm kiểu hình của nó (ví dụ về các đặc điểm kiểu hình bao gồm các đặc điểm về hình thái và sinh sản), các đặc điểm vật lý và hóa học của nó (như khối lượng khô và profin lipid), và các trình tự gen của nó. Theo một số phương án, các *thraustochytrid* được phân lập theo sáng chế có các đặc điểm kiểu hình gần giống với các đặc điểm kiểu hình của *thraustochytrid* được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695. Theo một số phương án, *thraustochytrid* được phân lập theo sáng chế có các đặc điểm sinh trưởng gần giống với các đặc điểm sinh trưởng của *thraustochytrid* được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến đột biến, biến thể hoặc thể tái tổ hợp của *thraustochytrid* được phân lập theo sáng chế, trong đó tổng số axit béo được tổng hợp bởi đột biến, biến thể hoặc thể tái tổ hợp này chứa khoảng 10% khối lượng là axit eicosapentaenoic hoặc thấp hơn. Các chủng đột biến có thể được tổng hợp bằng các quy trình đã được biết rõ. Các quy trình phổ biến bao gồm chiếu xạ; xử lý ở nhiệt độ cao; xử lý bằng chất gây đột biến. Các chủng biến đổi có thể là các thể phân lập xuất hiện trong tự nhiên khác và/hoặc các thể phân lập phụ của các loài được mô tả ở đây. Các chủng tái tổ hợp có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã được biết rõ bất kỳ trong sinh học phân tử về biểu hiện gen ngoại sinh hoặc biến đổi chức năng hoặc sự biểu hiện gen nội sinh. Theo một số phương án, chủng đột biến, biến thể hoặc chủng tái tổ hợp tạo ra lượng axit béo omega-

3 lớn hơn, bao gồm DHA và/hoặc EPA, so với chủng kiểu hoang. Theo một số phương án, chủng đột biến, biến thể hoặc chủng tái tổ hợp này tạo ra một hoặc nhiều axit béo với lượng thấp hơn, chẳng hạn như lượng thấp hơn của EPA, ARA, DPA n-6, hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, chủng đột biến, biến thể hoặc chủng tái tổ hợp này tạo ra khối lượng tế bào khô lớn hơn trong mỗi lít môi trường nuôi cấy so với chủng kiểu hoang. Các chủng đột biến, biến thể hoặc chủng tái tổ hợp này là các ví dụ về các chủng thu được từ *thraustochytrid* được phân lập theo sáng chế.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chủng đột biến của *thraustochytrid* được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695. Theo các phương án khác, chủng đột biến này là chủng được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9696, PTA-9697, hoặc PTA-9698. Các chủng *thraustochytrid* có số đăng ký ATCC là PTA-9696, PTA-9697, và PTA-9698 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest vào 7, tháng 1, 2009 tại American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Các chủng đột biến được lưu giữ này là các dẫn xuất của *thraustochytrid* được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695.

Theo một số phương án, *thraustochytrid* được phân lập theo sáng chế, bao gồm các chủng đột biến, biến thể hoặc tái tổ hợp của nó, chứa profin axit béo trong một hoặc nhiều phân đoạn được phân lập từ *thraustochytrid* này. Một hoặc nhiều phân đoạn được phân lập từ *thraustochytrid* này bao gồm phân đoạn axit béo toàn phần, phân đoạn sterol este, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các tổ hợp của nó.

Sáng chế cũng đề cập đến môi trường nuôi cấy thraustochytrid được phân lập chứa bất kỳ một trong số các vi sinh vật thraustochytrid theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa ít nhất khoảng 5% oxy hòa tan.

Sáng chế cũng đề cập đến thực phẩm, mỹ phẩm, hoặc dược phẩm cho động vật hoặc người chứa bất kỳ một trong số các vi sinh vật thraustochytrid hoặc sinh khối theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng.

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

Sáng chế cũng đề cập đến dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit chiếm ít nhất khoảng 70% khối lượng, trong đó hàm lượng axit docosaheptaenoic của phân đoạn triglyxerit này chiếm ít nhất khoảng 40% theo khối lượng, trong đó hàm lượng axit docosapentaenoic n-6 của phân đoạn triglyxerit này là từ ít nhất khoảng 0,5% khối lượng đến khoảng 6% khối lượng, và trong đó tỉ lệ của axit docosaheptaenoic so với axit docosapentaenoic n-6 là lớn hơn 6:1.

Sáng chế cũng đề cập đến dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triglyxerit chiếm ít nhất khoảng 70% khối lượng, trong đó hàm lượng axit docosaheptaenoic của phân đoạn triglyxerit này chiếm ít nhất khoảng 60% khối lượng.

Theo một số phương án, ít nhất khoảng 20% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit của dầu vi sinh vật này chứa axit docosaheptaenoic ở

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

Theo một số phương án, vi sinh vật được phân lập theo sáng chế, bao gồm các chủng đột biến, biến thể và các thể tái tổ hợp của chúng, bao chứa profin axit béo trong một hoặc nhiều phân đoạn được phân lập từ vi sinh vật này. Một hoặc nhiều phân đoạn được phân lập từ vi sinh vật này bao gồm phân đoạn axit béo toàn phần, phân đoạn sterol este, phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các tổ hợp của nó. Profin axit béo cho phân đoạn cụ thể có thể bao gồm bất kỳ trong số các profin axit béo liên quan đến phân đoạn cụ thể này như được mô tả trên đây.

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra đột biến bao gồm gây đột biến bất kỳ trong số các vi sinh vật theo sáng chế và phân lập chủng đột biến này.

Môi trường nuôi cấy và sinh khối được phân lập

Sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy chứa một hoặc nhiều vi sinh vật được phân lập theo sáng chế. Nhiều tham số lên men khác nhau cho việc chủng, nuôi và thu hồi các vi khuẩn chí, như vi tảo và thraustochytrid, đã được biết trong lĩnh vực này, xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,130,242, được nộp kèm theo đây để tham khảo. Môi trường lỏng hoặc rắn có thể chứa nước biển tự nhiên hoặc nhân tạo. Nguồn cacbon cho sinh trưởng dị dưỡng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, glucoza, fructoza, xyloza, sacaroza, maltoza, tinh bột hòa tan, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, và mannitol. Các nguồn nito

bao gồm, nhưng không giới hạn ở, pepton, dịch chiết nấm men, polypepton, dịch chiết mạch nha, dịch chiết thịt, axit casamino, dịch chiết ngô cô đặc, các nguồn nitơ hữu cơ, natri glutamat, ure, các nguồn nitơ vô cơ, amoni axetat, amoni sulfat, amoni clorua, và amoni nitrat.

Môi trường điển hình để nuôi vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC PTA-10212 được thể hiện trong bảng 1:

Bảng 1: Môi trường nuôi cấy trong bình PTA-10212

<u>Thành phần</u>	<u>Nồng độ</u>	<u>Khoảng</u>
Na ₂ SO ₄	g/l 31,0	0-50, 15-45, hoặc 25-35
NaCl	g/l 0,625	0-25, 0,1-10, hoặc 0,5-5
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 0,44	0-10, 0,25-5, hoặc 0,05-3
MSG·1H ₂ O	g/l 6,0	0-10, 4-8 hoặc 5-7
CaCl ₂	g/l 0,29	0,1-5, 0,15-3, hoặc 0,2-1
T 154 (dịch chiết nấm men)	g/l 6,0	0-20, 0,1-10, hoặc 1-7
KH ₂ PO ₄	g/l 0,8	0,1-10, 0,5-5, hoặc 0,6-1,8
<u>Sau khi hấp trong nồi (kim loại)</u>		
Axit xitric	mg/l 3,5	0,1-5000, 10-3000, hoặc 3-2500
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	0,01-100, 1-50, hoặc 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/l 0,04	0-1, 0,001-0,1, hoặc 0,01-0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/l 0,04	0,001-1, 0,005-0,5, 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

<u>Sau khi hấp trong nồi</u>		
<u>(vitamin)</u>		
Thiamin	mg/l 9,75	0,1-100, 1-50, hoặc 5-25
Vitamin B12	mg/l 0,16	0,01-100, 0,05-5, hoặc 0,1-1
Ca ^{1/2} -pantothenate	mg/l 2,06	0,1-100, 0,1-50, hoặc 1-10
Biotin	mg/l 3,21	0,1-100, 0,1-50, hoặc 1-10
<u>Sau khi hấp trong nồi</u>		
<u>(cacbon)</u>		
Glycerol	g/l 30,0	5-150, 10-100, hoặc 20-50
<u>Thức ăn nitơ</u>		
MSG.1H ₂ O	g/l 17	0-150, 10-100, hoặc 15-50

Các điều kiện nuôi cấy điển hình bao gồm như sau:

Độ pH	Khoảng 6,5 đến khoảng 8,5, khoảng 6,5 đến khoảng 8,0, hoặc khoảng 6,8 đến khoảng 7,8;
Nhiệt độ	Khoảng 15 đến 30 độ Celsius, khoảng 18 đến 28 độ Celsius, hoặc khoảng 21 đến 23 độ Celsius;
Oxy hòa tan	Khoảng 0,1 đến 100% bão hòa khoảng 5 đến 50% bão hòa, hoặc khoảng 10 đến 30% bão hòa; và/hoặc
Glyxerol được kiểm soát @	Khoảng 5 đến 50g/l, khoảng 10 đến 40g/l, hoặc khoảng 15 đến 35g/l

Theo một số phương án, vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10212, hoặc đột biến, biến thể, hoặc thể tái tổ hợp của nó,

sinh trưởng dị dưỡng trên glyxerol là nguồn cacbon nhưng không sinh trưởng trên nguồn cacbon là glucoza.

Môi trường điển hình để nuôi vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-10208 được thể hiện trong bảng 2:

Bảng 2: Môi trường nuôi cấy trong bình PTA-10208

<u>Thành phần</u>	<u>Nồng độ</u>	<u>Khoảng</u>
Na ₂ SO ₄	g/l 8,8	0-25, 2-20, hoặc 3-10
NaCl	g/l 0,625	0-25, 0,1-10, hoặc 0,5-5
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 0,42	0-10, 0,25-5, hoặc 0,05-3
CaCl ₂	g/l 0,29	0,1-5, 0,15-3, hoặc 0,2-1
T 154 (dịch chiết nấm men)	g/l 1,0	0-20, 0,1-10, hoặc 0,5-5
KH ₂ PO ₄	g/l 1,765	0,1-10, 0,5-5, hoặc 1-3
<u>Sau khi hấp trong nồi (kim loại)</u>		
Axit xitric	mg/l 46,82	0,1-5000, 10-3000, hoặc 40-2500
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 9,3	0,01-100, 1-50, hoặc 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/l 0,04	0-1, 0,001-0,1, hoặc 0,01-0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/l 0,04	0,001-1, 0,005-0,5, 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
<u>Sau khi hấp trong nồi (vitamin)</u>		
Thiamin	mg/l 9,75	0,1-100, 1-50, hoặc 5-25
Ca ^{1/2} -pantothenat	mg/l 3,33	0,1-100, 0,1-50, hoặc 1-10

Biotin	mg/l 3,58	0,1-100, 0,1-50, hoặc 1-10
<u>Sau khi hấp trong nồi (cacbon)</u>		
Glucosa	g/l 30,0	5-150, 10-100, hoặc 20-50
<u>Thức ăn nitor</u>		
<u>Thành phần</u>		
NH ₄ OH	ml/l 23,6	0-150, 10-100, hoặc 15-50

Các điều kiện nuôi cấy cụ thể sẽ bao gồm như sau:

Độ pH	Khoảng 6,5 đến khoảng 8,5; khoảng 6,5 đến khoảng 8,0; hoặc khoảng 7,0 đến khoảng 8,0;
Nhiệt độ	Khoảng 17 đến khoảng 30 độ Celsius, khoảng 20 đến khoảng 28 độ Celsius, hoặc khoảng 22 đến 24 độ Celsius;
Oxy hòa tan	Khoảng 2 đến 100% bão hòa, khoảng 5 đến khoảng 50% bão hòa, hoặc khoảng 7 đến 20% bão hòa; và/hoặc
Glucosa được kiểm soát @	Khoảng 5 đến khoảng 50g/l, khoảng 10 đến khoảng 40g/l, hoặc khoảng 20 đến khoảng 35g/l

Theo một số phương án, thể tích lên men (thể tích môi trường nuôi cấy) ít nhất là khoảng 2 lit, ít nhất khoảng 10 lit, ít nhất khoảng 50 lit, ít nhất khoảng 100 lit, ít nhất khoảng 200 lit, ít nhất khoảng 500 lit, ít nhất

khoảng 1000 lit, ít nhất khoảng 10,000 lit, ít nhất khoảng 20,000 lit, ít nhất khoảng 50,000 lit, ít nhất khoảng 100,000 lit, ít nhất khoảng 150,000 lit, ít nhất khoảng 200,000 lit, hoặc ít nhất khoảng 250,000 lit. Theo một số phương án, thể tích lên men này là khoảng 2 lit đến khoảng 300,000 lit, khoảng 2 lit, khoảng 10 lit, khoảng 50 lit, khoảng 100 lit, khoảng 200 lit, khoảng 500 lit, khoảng 1000 lit, khoảng 10,000 lit, khoảng 20,000 lit, khoảng 50,000 lit, khoảng 100,000 lit, khoảng 150,000 lit, khoảng 200,000 lit, khoảng 250,000 lit, hoặc khoảng 300,000 lit.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến sinh khối được phân lập chứa profin axit béo theo sáng chế. Theo một số phương án, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, 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% khối lượng tế bào khô của sinh khối này là các axit béo. Theo một số phương án, khoảng hơn 20%, khoảng hơn 25%, khoảng hơn 30%, khoảng hơn 35%, khoảng hơn 40%, khoảng hơn 45%, khoảng hơn 50%, khoảng hơn 55%, hoặc khoảng hơn 60% khối lượng tế bào khô của sinh khối này là các axit béo. Theo một số phương án, khoảng 20% đến khoảng 55%, khoảng 20% đến khoảng 60%, khoảng 20% đến khoảng 70%, khoảng 20% đến khoảng 80%, khoảng 30% đến khoảng 55%, khoảng 30% đến khoảng 70%, khoảng 30% đến khoảng 80%, khoảng 40% đến khoảng 60%, khoảng 40% đến khoảng 70%, khoảng 40% đến khoảng 80%, khoảng 50% đến khoảng 60%, khoảng 50% đến khoảng 70%, khoảng 50% đến khoảng 80%, khoảng 55% đến khoảng 70%, khoảng 55% đến khoảng 80%, khoảng 60% đến khoảng 70%, hoặc khoảng 60% đến khoảng 80% khối lượng theo khối lượng tế bào khô của sinh khối này là các axit béo. Theo một số phương án, sinh khối này chứa hơn 10%, ít nhất khoảng 12%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất

khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, ít nhất khoảng 40%, hoặc ít nhất khoảng 45% khối lượng của axit béo này là EPA. Theo một số phương án, sinh khối này chứa khoảng 10% đến khoảng 55%, khoảng 12% đến khoảng 55%, khoảng 15% đến khoảng 55%, khoảng 20% đến khoảng 55%, khoảng 20% đến khoảng 40%, hoặc khoảng 20% đến khoảng 30% khối lượng các axit béo này là EPA. Theo một số phương án, sinh khối này chứa phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó ít nhất khoảng 12%, ít nhất khoảng 13%, ít nhất khoảng 14%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 16%, ít nhất khoảng 17%, ít nhất khoảng 18%, ít nhất khoảng 19%, hoặc ít nhất khoảng 20% khối lượng phân đoạn triaxylglyxerol này là EPA. Theo một số phương án, sinh khối này chứa phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó hàm lượng EPA của phân đoạn triaxylglyxerol này là từ ít nhất khoảng 12% đến khoảng 55%, khoảng 12% đến khoảng 50%, khoảng 12% đến khoảng 45%, ít nhất khoảng 12% đến khoảng 40%, ít nhất khoảng 12% đến khoảng 35%, hoặc ít nhất khoảng 12% đến khoảng 30%, khoảng 15% đến khoảng 55%, khoảng 15% đến khoảng 50%, khoảng 15% đến khoảng 45%, khoảng 15% đến khoảng 40%, khoảng 15% đến khoảng 35%, khoảng 15% đến khoảng 30%, khoảng 20% đến khoảng 55%, khoảng 20% đến khoảng 50%, khoảng 20% đến khoảng 45%, ít nhất khoảng 20% đến khoảng 40%, ít nhất khoảng 20% đến khoảng 35%, hoặc khoảng 20% đến khoảng 30% khối lượng. Theo một số phương án, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, hoặc ít nhất khoảng 60% khối lượng theo khối lượng tế bào khô của sinh khối này là DHA. Theo một số phương án, khoảng 20% đến khoảng 60%, khoảng 25% đến khoảng 60%, khoảng 25% đến khoảng 50%, khoảng 25% đến khoảng 45%, khoảng 30% đến khoảng 50%, hoặc khoảng 35% đến khoảng 50% khối lượng theo khối lượng tế bào khô của sinh khối này là DHA. Theo một số phương án, sinh khối này 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 theo khối lượng các axit béo này là DHA. Theo một số phương án, sinh khối này chứa khoảng 1% đến khoảng 10%, khoảng 1% đến khoảng 5%, khoảng 2% đến khoảng 5%, khoảng 3% đến khoảng 5%, hoặc khoảng 3% đến khoảng 10% khối lượng các axit béo này là DHA. Theo một số phương án, sinh khối này gần như không chứa DHA. Theo một số phương án, sinh khối này chứa khoảng từ 0,1% đến ít hơn khoảng 5%, khoảng 0,1% đến khoảng 4%, khoảng 0,1% đến khoảng 3%, khoảng 0,1% đến khoảng 2%, khoảng 0,2% đến ít hơn khoảng 5%, khoảng 0,2% đến khoảng 4%, khoảng 0,2% đến khoảng 3%, khoảng 0,2% đến khoảng 2%, khoảng 0,3% đến khoảng 2%, khoảng 0,1% đến khoảng 0,5%, khoảng 0,2% đến khoảng 0,5%, khoảng 0,1% đến khoảng 0,4%, khoảng 0,2% đến khoảng 0,4%, khoảng 0,5% đến khoảng 2%, khoảng 1% đến khoảng 2%, khoảng 0,5% đến khoảng 1,5%, hoặc khoảng 1% đến khoảng 1,5% khối lượng các axit béo này là ARA. Theo một số phương án, sinh khối này chứa ít hơn khoảng 5%, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, khoảng 2% hoặc ít hơn, 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 theo khối lượng các axit béo này là ARA. Theo một số phương án, sinh khối này gần như không chứa ARA. Theo một số phương án, sinh khối này chứa khoảng 0,4% đến khoảng 2%, khoảng 0,4% đến khoảng 3%, khoảng 0,4% đến khoảng 4%, khoảng 0,4% đến khoảng 5%, khoảng 0,4% đến ít hơn khoảng 5%, khoảng 0,5% đến khoảng 1%, khoảng 0,5% đến khoảng 2%, khoảng 0,5% đến khoảng 3%, khoảng 0,5% đến khoảng 4%, khoảng 0,5% đến khoảng 5%, khoảng 0,5% to ít hơn khoảng 5%, khoảng 1% đến khoảng

2%, khoảng 1% đến khoảng 3%, khoảng 1% đến khoảng 4%, khoảng 1% đến khoảng 5%, hoặc khoảng 1% đến ít hơn khoảng 5% khối lượng các axit béo này là DPA n-6. Theo một số phương án, sinh khối này chứa khoảng 5% hoặc ít hơn, ít hơn khoảng 5%, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, khoảng 2% hoặc ít hơn, khoảng 1% hoặc ít hơn, khoảng 0,75% hoặc ít hơn, khoảng 0,6% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 0,5% hoặc ít hơn theo khối lượng các axit béo này là DPA n-6. Theo một số phương án, sinh khối này gần như không chứa DPA n-6. Theo một số phương án, sinh khối này chứa các axit béo có khoảng 5% hoặc ít hơn, ít hơn khoảng 5%, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 2% hoặc ít hơn theo khối lượng là axit oleic (18:1 n-9), axit linoleic (18:2 n-6), axit linolenic (18:3 n-3), axit eicosenoic (20:1 n-9), axit erucic (22:1 n-9), hoặc hỗn hợp của chúng.

Các đặc điểm của sinh khối được phân lập theo sáng chế liên quan đến các đặc điểm nội sinh hoặc tự nhiên của sinh khối được phân lập này hơn là các nguyên liệu được đưa vào ngoại sinh. Theo một số phương án, sinh khối được phân lập này không chứa polyvinylpyrrolidon hoặc không được phân lập từ môi trường nuôi cấy chứa polyvinylpyrrolidon.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sinh khối. Theo một số phương án, phương pháp sản xuất sinh khối theo sáng chế bao gồm nuôi bất kỳ trong số các vi sinh vật được phân lập theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng trong môi trường nuôi cấy để sản xuất sinh khối. Sáng chế đề cập đến sinh khối được sản xuất bằng phương pháp này.

Theo một số phương án sinh khối này chứa axit béo, trong đó các axit béo này chứa thêm các axit béo omega-3 không bão hòa đa, trong đó các axit béo omega-3 không bão hòa đa này chứa DHA và EPA với lượng khoảng $\geq 90\%$, theo khối lượng của tổng lượng axit béo omega-3 không bão hòa đa và lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 6% đến khoảng 65%

của tổng lượng EPA và DHA. Được đề xuất cụ thể là sinh khối, trong đó lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 6% đến khoảng 28% tổng khối lượng của EPA và DHA. Được đề xuất thêm ở đây là sinh khối, trong đó lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 36% đến khoảng 65% tổng khối lượng của EPA và DHA. Cụ thể hơn, được đề xuất là sinh khối, trong đó lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 28% đến khoảng 36% tổng lượng EPA và DHA.

Một số phương án được đề xuất ở đây bao gồm sinh khối chứa các axit béo, trong đó các axit béo này chứa thêm DHA và EPA và lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 15 đến khoảng 60% tổng khối lượng EPA và DHA.

Một số phương án theo sáng chế đề cập thêm đến môi trường nuôi cấy chứa *thraustochytrid*, hoặc chủng đột biến, được lưu giữ với số đăng ký ATCC là PTA-9695. Nhiều tham số lên men khác nhau cho việc chủng, nuôi cấy, và thu hồi vi khuẩn chí đã được biết trong lĩnh vực này, như được mô tả trong patent Mỹ số 5,130,242. Môi trường thông thường bất kỳ để nuôi cấy *thraustochytrid* có thể được sử dụng. Các môi trường lỏng hoặc rắn có thể chứa nước biển tự nhiên hoặc nhân tạo. Các nguồn cacbon bao gồm, nhưng không giới hạn ở, glucoza, fructoza, xyloza, sacaroza, maltoza, tinh bột hòa tan, mật đường, fucoza, glucosamin, dextran, chất béo, dầu, glyxerol, natri axetat, và mannitol. Các nguồn nitơ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, pepton, dịch chiết nấm men, polypepton, dịch chiết mạch nha, dịch chiết thịt, axit casamino, dịch chiết ngô đậm đặc, nguồn nitơ hữu cơ, natri glutamat, urea, nguồn nitơ vô cơ, amoni axetat, amoni sulfat, amoni clorua, amoni nitrat, natri sulfat. Môi trường điển hình được thể hiện trong bảng 3:

Bảng 3: môi trường nuôi cấy bình PTA-9695

<u>Thành phần</u>	<u>Nồng độ</u>	<u>Khoảng</u>
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 (dịch chiết 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
<u>Sau khi hấp trong nồi (kim loại)</u>		
Axit xitric	g/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, 0,005-0,5 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
<u>Sau khi hấp trong nồi (vitamin)</u>		
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} -pantothenat**	mg/l 3,33	0,1-100, 0,1-50, hoặc 1-10
**: tiết trùng bằng cách lọc		
<u>Sau khi hấp trong nồi (cacbon)</u>		
Glucosa	g/l 30,0	5-150, 10-100, hoặc 20-50

<u>Thức ăn nitơ</u>		
<u>Thành phần</u>	<u>Nồng độ</u>	
NH ₄ OH	ml/l 21,6	0-150, 10-100, hoặc 15-50

Các điều kiện nuôi cấy điển hình bao gồm như sau:

Độ pH	Khoảng 6,5 đến khoảng 8,5; khoảng 6,5 đến khoảng 8,0; hoặc khoảng 7,0 đến khoảng 7,5;
Nhiệt độ	Khoảng 17 đến khoảng 30 độ Celsius, khoảng 20 đến khoảng 25 độ Celsius, hoặc khoảng 22 đến 23 độ Celsius;
Oxy hòa tan	Khoảng 5 đến 100% bão hòa, khoảng 10 đến khoảng 80% bão hòa, hoặc khoảng 20 đến 50% bão hòa; và/hoặc
Glucosa được kiểm soát @	Khoảng 5 đến khoảng 50g/l, khoảng 10 đến khoảng 40g/l, hoặc khoảng 20 đến khoảng 35g/l

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này 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 hòa tan, là tỉ lệ phần trăm mức bão hòa. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy này chứa từ khoảng 5% đến khoảng 20%, khoảng 5% đến khoảng 50%, khoảng 5% đến khoảng 100%, khoảng 10% đến khoảng 20%, khoảng 10% đến khoảng 50%, khoảng 10% đến khoảng 100%, khoảng 20% đến khoảng

50%, hoặc khoảng 20% đến khoảng 100% oxy hòa tan, như là tỉ lệ phần trăm nồng độ bão hòa.

Sáng chế đề cập thêm đến sinh khối được phân lập của *thraustochytrid* theo sáng chế. Sinh khối *thraustochytrid* được phân lập theo sáng chế là sinh khối tế bào thu hoạch được bằng phương pháp thông thường để phân lập sinh khối *thraustochytrid*, như được mô tả trong patent Mỹ số 5,130,242 và công bố đơn Mỹ số 2002/0001833.

Theo một số phương án, khối lượng khô của sinh khối được phân lập từ mỗi lit môi trường nuôi cấy ít nhất là khoảng 50 g, ít nhất là khoảng 60 g, ít nhất khoảng 70 g, ít nhất khoảng 80 g, ít nhất khoảng 100 g, ít nhất khoảng 120 g, ít nhất khoảng 140 g, ít nhất khoảng 160 g, ít nhất khoảng 180 g, hoặc ít nhất khoảng 200g sau khi nuôi trong khoảng 7 ngày ở khoảng 17°C đến khoảng 30°C trong môi trường nuôi cấy ở khoảng pH=6,5 đến khoảng 8,5 chứa nguồn cacbon, nitơ và các chất dinh dưỡng, và khoảng 950ppm đến khoảng 8500ppm ion clorua. Theo một số phương án, khối lượng tế bào khô của sinh khối phân lập được từ mỗi lit môi trường nuôi cấy ít nhất là khoảng 50g, ít nhất khoảng 60g, ít nhất khoảng 70g, ít nhất khoảng 80g, ít nhất khoảng 100g, ít nhất khoảng 120g, ít nhất khoảng 140g, ít nhất khoảng 160g, ít nhất khoảng 180g, hoặc ít nhất khoảng 200g sau khi nuôi trong khoảng 7 ngày ở khoảng 17°C, ở khoảng 18°C, ở khoảng 19°C, ở khoảng 20°C, ở khoảng 21°C, ở khoảng 22°C, ở khoảng 23°C, ở khoảng 24°C, ở khoảng 25°C, ở khoảng 26°C, ở khoảng 27°C, ở khoảng 28°C, ở khoảng 29°C, hoặc ở khoảng 30°C trong môi trường nuôi cấy ở khoảng pH=6,5, khoảng pH=7, khoảng pH=7,5, khoảng pH=8,0, hoặc khoảng pH=8,5 chứa nguồn cacbon, nitơ và các chất dinh dưỡng, và khoảng 950ppm đến khoảng 8500ppm ion clorua. Theo một số phương án, khối lượng tế bào khô của sinh khối phân lập được từ mỗi lit của môi trường nuôi cấy là từ khoảng 50g đến khoảng 200g sau khi nuôi

trong khoảng 7 ngày ở khoảng 17°C đến khoảng 30°C trong môi trường nuôi cấy ở khoảng độ pH=6,5 đến khoảng độ pH=8,5 chứa nguồn cacbon, nitơ và các chất dinh dưỡng, và khoảng 950ppm đến khoảng 8500ppm ion clorua. Theo một số phương án, khối lượng tế bào khô của sinh khối phân lập được từ mỗi lit của môi trường nuôi cấy là từ khoảng 50g đến khoảng 200g sau khi nuôi trong khoảng 7 ngày ở khoảng 17°C, ở khoảng 18°C, ở khoảng 19°C, ở khoảng 20°C, ở khoảng 21°C, ở khoảng 22°C, ở khoảng 23°C, ở khoảng 24°C, ở khoảng 25°C, ở khoảng 26°C, ở khoảng 27°C, ở khoảng 28°C, ở khoảng 29°C, hoặc ở khoảng 30°C trong môi trường nuôi cấy ở khoảng độ pH=6,5, khoảng độ pH=7, khoảng độ pH=7,5, khoảng độ pH=8,0, hoặc khoảng độ pH=8,5 chứa nguồn cacbon, nitơ và các chất dinh dưỡng, và khoảng 950ppm đến khoảng 8500ppm ion clorua.

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy *thraustochytrid* phân lập có năng suất axit béo omega-3 ít nhất là khoảng 2g/l/ngày, ít nhất khoảng 4g/l/ngày, hoặc ít nhất khoảng 8g/l/ngày sau khi nuôi trong khoảng 7 ngày ở khoảng 17°C đến khoảng 30°C trong môi trường nuôi cấy ở khoảng độ pH=6,5 đến khoảng pH=8,5 chứa nguồn cacbon, nitơ và các chất dinh dưỡng, và khoảng 950 ppm đến khoảng 8500 ppm ion clorua. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy *thraustochytrid* phân lập có năng suất axit béo omega-3 từ khoảng 1g/l/ngày đến khoảng 20g/l/ngày, từ khoảng 2g/l/ngày đến khoảng 15g/l/ngày, từ khoảng 2g/l/ngày đến khoảng 10g/l/ngày, từ khoảng 3g/l/ngày đến khoảng 10g/l/ngày, hoặc khoảng 4g/l/ngày đến khoảng 9g/l/ngày, sau khi nuôi trong khoảng 7 ngày ở khoảng 17°C đến khoảng 30°C trong môi trường nuôi cấy ở khoảng độ pH=6,5 đến khoảng pH=8,5 chứa nguồn cacbon, nitơ và các chất dinh dưỡng, và khoảng 950 ppm đến khoảng 8500 ppm ion clorua.

Theo một số phương án, thể tích lên men (thể tích môi trường nuôi cấy) ít nhất là khoảng 2 lit, ít nhất khoảng 10 lit, ít nhất khoảng 50 lit, ít

nhất khoảng 100 lit, ít nhất khoảng 200 lit, ít nhất khoảng 500 lit, ít nhất khoảng 1000 lit, ít nhất khoảng 10.000 lit, ít nhất khoảng 20.000 lit, ít nhất khoảng 50.000 lit, ít nhất khoảng 100.000 lit, ít nhất khoảng 150.000 lit, ít nhất khoảng 200.000 lit, hoặc ít nhất khoảng 250.000 lit. Theo một số phương án, thể tích lên men này là khoảng 2 lit đến khoảng 300.000 lit, khoảng 2 lit, khoảng 10 lit, khoảng 50 lit, khoảng 100 lit, khoảng 200 lit, khoảng 500 lit, khoảng 1000 lit, khoảng 10.000 lit, khoảng 20.000 lit, khoảng 50.000 lit, khoảng 100.000 lit, khoảng 150.000 lit, khoảng 200.000 lit, khoảng 250.000 lit, hoặc khoảng 300.000 lit.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến sinh khối *thraustochytrid* được phân lập chứa profin axit béo theo sáng chế. Theo một số phương án, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, hoặc ít nhất khoảng 80% khối lượng tế bào khô của sinh khối là các axit béo. Theo một số phương án, khoảng hơn 50%, khoảng hơn 55%, hoặc khoảng hơn 60% khối lượng tế bào khô của sinh khối là các axit béo. Theo một số phương án, từ khoảng 50% đến khoảng 60%, khoảng 50% đến khoảng 70%, khoảng 50% đến khoảng 80%, khoảng 55% đến khoảng 70%, khoảng 55% đến khoảng 80%, khoảng 60% đến khoảng 70%, hoặc khoảng 60% đến khoảng 80% khối lượng theo khối lượng tế bào khô của sinh khối là các axit béo. Theo một số phương án, sinh khối này chứa ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, hoặc ít nhất khoảng 80% khối lượng các axit béo dưới dạng axit béo omega-3. Theo một số phương án, sinh khối này chứa từ khoảng 50% đến khoảng 60%, khoảng 50% đến khoảng 70%, khoảng 50% đến khoảng 80% khối lượng các axit béo dưới dạng axit béo omega-3. Theo một số phương án, sinh khối này 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% khối lượng các axit béo dưới dạng DHA. Theo một số phương án, sinh khối này

chứa từ khoảng 50% đến khoảng 60%, khoảng 50% đến khoảng 70%, hoặc khoảng 50% đến khoảng 80% khối lượng các axit béo dưới dạng DHA. Theo một số phương án, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, hoặc ít nhất khoảng 60% khối lượng theo khối lượng tế bào khô của sinh khối là axit docosahexaenoic. Theo một số phương án, khoảng 25% đến khoảng 65%, khoảng 25% đến khoảng 50%, khoảng 30% đến khoảng 40%, hoặc khoảng 25% đến khoảng 35% khối lượng theo khối lượng tế bào khô của sinh khối là axit docosahexaenoic. Theo một số phương án, sinh khối này 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 theo khối lượng là các axit béo ở dạng EPA. Theo một số phương án, sinh khối này chứa từ khoảng 1% đến khoảng 10%, khoảng 1% đến khoảng 5%, khoảng 2% đến khoảng 5%, khoảng 3% đến khoảng 5%, hoặc khoảng 3% đến khoảng 10% theo khối lượng các axit béo là EPA. Theo một số phương án, sinh khối này gần như không chứa EPA. Theo một số phương án, sinh khối này chứa tỉ lệ khối lượng DHA so với 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 khoảng 25:1, ít nhất khoảng 50:1, hoặc ít nhất khoảng 100:1, trong đó sinh khối này chứa EPA với lượng khoảng 10% hoặc ít hơn theo khối lượng của các axit béo. Theo một số phương án, sinh khối này chứa ARA với lượng từ khoảng 0,1% đến 0,2%, khoảng 0,1% đến khoảng 0,3%, khoảng 0,1% đến khoảng 0,4%, khoảng 0,1% đến khoảng 0,5%, hoặc khoảng 0,1% đến khoảng 1,5% theo khối lượng của các axit béo. Theo một số phương án, sinh khối này chứa ARA với lượng 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 theo khối lượng các axit béo. Theo một số phương án, sinh khối này gần như không chứa ARA. Theo một số phương án, sinh khối này chứa tỉ lệ khối lượng của DHA so với ARA ít nhất khoảng 20:1, ít nhất khoảng 40:1, ít nhất khoảng 60:1, ít nhất khoảng 80:1, ít nhất khoảng 100:1, ít nhất khoảng 150:1, ít nhất khoảng 200:1, ít nhất khoảng 250:1, hoặc ít nhất khoảng 300:1. Theo một số phương án, sinh khối này chứa DPA n-6 với lượng từ khoảng 0,5% đến khoảng 1%, khoảng 0,5% đến khoảng 2%, khoảng 0,5% đến khoảng 5%, khoảng 0,5% đến khoảng 6%, khoảng 1% đến khoảng 5%, khoảng 1% đến khoảng 6%, khoảng 2% đến khoảng 5%, hoặc khoảng 2% đến khoảng 6% theo khối lượng các axit béo. Theo một số phương án, sinh khối này chứa DPA n-6 với lượng 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 theo khối lượng của các axit béo. Theo một số phương án, sinh khối này gần như không chứa DPA n-6. Theo một số phương án, sinh khối này chứa tỉ lệ khối lượng của DHA so với DPA n-6 là khoảng hơn 6:1, ít nhất khoảng 8:1, ít nhất khoảng 10:1, ít nhất khoảng 15:1, ít nhất khoảng 20:1, ít nhất khoảng 25:1, ít nhất khoảng 50:1, hoặc ít nhất khoảng 100:1. Theo một số phương án, sinh khối này chứa các axit béo với khoảng 5% hoặc ít hơn, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 2% hoặc ít hơn theo khối lượng là mỗi axit linoleic (18:2 n-6), axit linolenic (18:3 n-3), axit eicosenoic (20:1 n-9), và axit erucic (22:1 n-9).

Theo một phương án khác, được đề xuất ở đây là sinh khối chứa các axit béo, trong đó các axit béo này chứa thêm axit béo omega-3 không bão hòa đa, trong đó các axit béo omega-3 không bão hòa đa chứa DHA và EPA với lượng khoảng lớn hơn hoặc bằng khoảng 58-68%, cụ thể là khoảng 60% theo khối lượng, trên tổng lượng axit béo omega-3 không bão

hòa đa và lượng EPA, theo khối lượng là từ khoảng 5% đến khoảng 60% trên tổng khối lượng EPA và DHA.

Các đặc điểm của sinh khối được phân lập theo sáng chế có liên quan đến các đặc điểm nội sinh hoặc tự nhiên của sinh khối được phân lập hơn là nguyên liệu được đưa vào ngoại sinh.

Dầu vi sinh vật

Được đề xuất ở đây là dầu, dầu vi sinh vật đặc biệt, được sản xuất bởi các phương pháp được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa các axit béo, trong đó các axit béo này chứa thêm các axit béo omega-3 không bão hòa đa trong đó các axit béo omega-3 không bão hòa đa này chứa DHA và EPA với lượng là khoảng $\geq 90\%$, theo khối lượng trên tổng lượng axit béo omega-3 không bão hòa đa và lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 6% đến khoảng 65% tổng lượng EPA và DHA. Được đề xuất cụ thể là dầu vi sinh vật, trong đó lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 6% đến khoảng 28% tổng lượng EPA và DHA. Được đề xuất thêm ở đây là dầu vi sinh vật, trong đó lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 36% đến khoảng 65% tổng lượng EPA và DHA. Được đề xuất thêm là dầu vi sinh vật, trong đó lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 28% đến khoảng 36% tổng lượng EPA và DHA.

Theo một phương án khác, được đề xuất ở đây là dầu vi sinh vật chứa các axit béo, trong đó các axit béo này chứa thêm DHA và EPA và lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 15 đến khoảng 60% tổng khối lượng EPA và DHA.

Theo một phương án khác, được đề xuất ở đây là dầu vi sinh vật chứa axit béo, trong đó các axit béo này chứa thêm các axit béo omega-3 không bão hòa đa, trong đó các axit béo omega-3 không bão hòa đa chứa

DHA và EPA với lượng là khoảng lớn hơn hoặc bằng khoảng 58-68%, cụ thể là khoảng 60%, theo khối lượng, tổng lượng các axit béo omega-3 không bão hòa đa và lượng EPA, theo khối lượng, là từ khoảng 5% đến khoảng 60% tổng khối lượng EPA và DHA.

Sáng chế đề cập đến dầu vi sinh vật chứa profin axit béo theo sáng chế. Dầu vi sinh vật theo sáng chế là “dầu thô” hoặc “dầu tinh luyện” chứa phân đoạn triaxylglyxerol ít nhất là khoảng 35% khối lượng. “Dầu thô” là dầu được chiết từ sinh khối của vi sinh vật này mà không xử lý thêm. “Dầu tinh luyện” là dầu thu được bằng cách xử lý dầu thô bằng quy trình tinh luyện, tẩy và/hoặc khử mùi chuẩn. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,130,242, được nộp kèm theo đây. Dầu vi sinh vật cũng bao gồm “dầu thành phẩm” như được mô tả ở đây, dầu này là dầu tinh luyện đã được pha loãng với dầu thực vật. Theo một số phương án, dầu thành phẩm là dầu tinh luyện mà đã được pha loãng với dầu hoa hướng dương oleic cao. Thuật ngữ “vi sinh vật” như được sử dụng ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuật ngữ “vi tảo”, “*thraustochytrid*,” và các phân loại taxonomic liên quan đến bất kỳ trong số các vi sinh vật đã lưu giữ được mô tả ở đây. Thuật ngữ “*Thraustochytriales*,” “*thraustochytrid*,” “*Schizochytrium*,” và “*Thraustochytrium*” như được sử dụng để đề cập đến bất kỳ trong số các dầu vi sinh vật của các vi sinh vật được lưu giữ đã được mô tả ở đây là dựa trên các phân loại taxonomic hiện nay, bao gồm thông tin phả hệ sẵn có và không được dự định giới hạn ở các sự kiện mà các phân loại taxonomic được xem xét lại sau ngày nộp đơn của đơn này.

Theo một số phương án, axit béo như được mô tả ở đây có thể là các este axit béo. Theo một số phương án, este axit béo bao gồm bao gồm este của axit béo omega-3, axit béo omega-6, và các tổ hợp của nó. Theo một số phương án, este axit béo này là este DHA, este EPA, hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, dầu hoặc phân đoạn của chúng như được

mô tả ở đây được este hóa để tạo ra dầu hoặc phân đoạn của nó chứa các este của axit béo. Thuật ngữ “este” dùng để chỉ sự thay thế hydro trong nhóm axit carboxylic của phân tử axit béo bằng nhóm thế khác. Các este điển hình đã được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, thảo luận về chúng được cung cấp bởi Higuchi, T. và V. Stella trong *Pro-drugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, *Biorceversible Carriers in Drug Design*, Ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association, Pergamon Press, 1987, and *Protective Groups in Organic Chemistry*, McOmie ed., Plenum Press, New York, 1973. Ví dụ về các este bao gồm metyl, etyl, propyl, butyl, pentyl, t-butyl, benzyl, nitrobenzyl, methoxybenzyl, benzhydryl, và trichloroetyl. Theo một số phương án, este này là nhóm este bảo vệ axit carboxylic, este với aralkyl (ví dụ, benzyl, phenetyl), este với alkenyl thấp hơn (ví dụ, allyl, 2-butenyl), este với alkyl thấp hơn-alkoxy thấp hơn (ví dụ methoxymetyl, 2-methoxyetyl, 2-ethoxyetyl), este với alkanoyloxy thấp hơn-alkyl thấp hơn (ví dụ, axetoxymetyl, pivaloyloxymetyl, 1-pivaloyloxyetyl), este với alkoxycarbonyl thấp hơn-alkyl thấp hơn (ví dụ, methoxycarbonylmetyl, isopropoxycarbonylmetyl), este với carboxy-alkyl thấp hơn (ví dụ carboxymetyl), este với alkoxycarbonyloxy thấp hơn-alkyl thấp hơn (ví dụ, 1-(ethoxycarbonyloxy)etyl, 1-(xyclohexyloxycarbonyloxy)etyl), este với carbamoyloxy-alkyl thấp hơn (ví dụ, carbamoyloxymetyl), và tương tự. Theo một số phương án, nhóm thế được bổ sung vào là nhóm hydrocacbon mạch thẳng hoặc vòng, ví dụ, C1-C6 alkyl, C1-C6 xycloalkyl, C1-C6 alkenyl, hoặc C1-C6 aryl este. Theo một số phương án, este này là alkyl este, ví dụ, a metyl este, etyl este hoặc propyl este. Theo một số phương án, nhóm thế este được bổ sung vào phân tử axit béo tự do khi axit béo này ở trạng thái tinh khiết hoặc bán tinh khiết. Ngoài ra, este axit béo này được tạo ra khi chuyển hóa triaxylglyxerol thành este.

Sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất dầu vi sinh vật. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm nuôi bất kỳ trong số các vi sinh vật được phân lập theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng trong môi trường nuôi cấy để tạo ra dầu vi sinh vật chứa axit béo omega-3. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm thêm bước chiết dầu vi sinh vật. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước chiết dầu vi sinh vật chứa axit béo omega-3 từ bất kỳ trong số các sinh khối theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi sinh vật đã phân lập, trong đó môi trường nuôi cấy này chứa nguồn cacbon như được mô tả ở đây. Dầu vi sinh vật này có thể được chiết từ sinh khối mới được thu hoạch hoặc có thể được chiết từ sinh khối đã được thu hoạch trước đó mà đã được dự trữ trong các điều kiện tránh bị hỏng. Các phương pháp đã biết có thể được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế, để phân lập sinh khối từ môi trường nuôi cấy, để chiết dầu vi sinh vật từ sinh khối, và để phân tích profile axit béo hoặc dầu đã được chiết từ sinh khối, xem, ví dụ patent Mỹ số 5,130,242, được nộp kèm theo đây. Sáng chế đề cập đến dầu vi sinh vật được sản xuất bởi phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này được chiết bằng phương pháp chiết enzym. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này được chiết bằng phương pháp chiết cơ học. Theo một số phương án, phương pháp chiết cơ học này bao gồm một hoặc nhiều bước sau: (1) xử lý canh trường lên men đã tiệt trùng qua máy làm đồng nhất để giúp tế bào dung giải và giải phóng dầu từ các tế bào; (2) bổ sung rượu isopropyl vào canh trường lên men sau khi đồng nhất hóa để phá vỡ nhũ tương dầu và nước; (3) ly tâm hỗn hợp này để thu hồi pha dầu; và (4) làm khô trong chân không bằng cách bổ sung chất chống oxy hóa. Theo một số phương án, dầu thô này được tinh chế. Theo một số phương án, việc tinh chế dầu thô này bao gồm

một hoặc nhiều bước: (1) bơm dầu thô vào thùng tinh luyện và gia nhiệt dầu, sau đó bổ sung dung dịch axit kèm theo trộn đều; (2) bổ sung dung dịch ăn da vào dầu sau khi xử lý axit; (3) gia nhiệt lại dầu thô này và sau đó ly tâm để tách pha nặng khỏi dầu đã tinh luyện; (4) loại bỏ các hợp chất có cực còn lại, vết kim loại và các sản phẩm oxy hóa khỏi dầu tinh luyện bằng cách sử dụng, ví dụ, axit, TriSyl®, đất sét, và/hoặc lọc; (5) lọc lạnh dầu đã tẩy để loại bỏ thêm các thành phần có điểm nóng chảy cao khỏi dầu này để đạt được mức độ trong mong muốn; (6) gia nhiệt dầu này, sau đó dầu này được làm mát và được giữ trong một khoảng thời gian để làm cho triglyxerit có điểm nóng chảy cao và sáp kết tinh; (7) bổ sung chất trợ lọc vào dầu lạnh và sau đó loại bỏ các chất rắn đã kết tinh bằng cách lọc; (8) sử dụng chất khử mùi sau khi lọc lạnh, vận hành dưới nhiệt độ cao và chân không, để loại bỏ, ví dụ, peroxit và các hợp chất có khối lượng phân tử thấp còn lại bất kỳ mà có thể gây ra mùi hôi và các mùi khác; (9) chuyển dầu này vào thùng nạp khử mùi, khử khí, và khử mùi, ví dụ, trong máy khử mùi cột đóng gói; và (10) làm mát, ví dụ, trong lớp nitơ vào cuối chu kỳ khử mùi và bổ sung các chất chống oxy hóa thích hợp vào dầu đã được khử mùi để tạo độ ổn định oxy hóa.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol este là khoảng 0%, ít nhất khoảng 0,1%, ít nhất khoảng 0,2%, ít nhất khoảng 0,5%, ít nhất khoảng 1%, ít nhất khoảng 1,5%, ít nhất khoảng 2%, hoặc ít nhất khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol este là khoảng 0% đến khoảng 1,5%, khoảng 0% đến khoảng 2%, khoảng 0% đến khoảng 5%, khoảng 1% đến khoảng 1,5%, khoảng 0,2% đến khoảng 1,5%, khoảng 0,2% đến khoảng 2%, hoặc khoảng 0,2% đến khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol este là khoảng 5% hoặc ít hơn, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, khoảng 2% hoặc ít hơn, khoảng

1% hoặc ít hơn, khoảng 0,5% hoặc ít hơn, khoảng 0,3% hoặc ít hơn, khoảng 0,2% hoặc ít hơn, khoảng 0,5% hoặc ít hơn, khoảng 0,4% hoặc ít hơn, khoảng 0,3% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 0,2% hoặc ít hơn theo khối lượng.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triaxylglyxerol ít nhất là khoảng 35%, 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%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, hoặc ít nhất khoảng 90% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triaxylglyxerol là khoảng 35% đến khoảng 98%, khoảng 35% đến khoảng 90%, khoảng 35% đến khoảng 80%, khoảng 35% đến khoảng 70%, khoảng 35% đến khoảng 70%, khoảng 35% đến khoảng 65%, khoảng 40% đến khoảng 70%, khoảng 40% đến khoảng 65%, khoảng 40% đến khoảng 55%, khoảng 40% đến khoảng 50%, khoảng 65% đến khoảng 95%, khoảng 75% đến khoảng 95%, khoảng 75% đến khoảng 98%, khoảng 80% đến khoảng 95%, khoảng 80% đến khoảng 98%, khoảng 90% đến khoảng 96%, khoảng 90% đến khoảng 97%, khoảng 90% đến khoảng 98%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 97%, hoặc khoảng 98% khối lượng.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn diaxylglyxerol ít nhất là khoảng 10%, ít nhất khoảng 11%, ít nhất khoảng 12%, ít nhất khoảng 13%, ít nhất khoảng 14%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 16%, ít nhất khoảng 17%, ít nhất khoảng 18%, ít nhất khoảng 19%, hoặc ít nhất khoảng 20% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn diaxylglyxerol là khoảng 10% đến khoảng 45%, khoảng 10% đến khoảng 40%, khoảng 10% đến khoảng 35%, khoảng 10% đến khoảng 30%, khoảng 15% đến khoảng 40%, khoảng 15% đến khoảng 35%, hoặc khoảng 15% đến khoảng 30% khối lượng. Theo một số phương

án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn 1,2-diacylglycerol ít nhất là khoảng 0,2%, ít nhất khoảng 0,3%, ít nhất khoảng 0,4%, ít nhất khoảng 0,5%, ít nhất khoảng 1%, ít nhất khoảng 5%, ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 11%, ít nhất khoảng 12%, ít nhất khoảng 13%, ít nhất khoảng 14%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 16%, ít nhất khoảng 17%, ít nhất khoảng 18%, ít nhất khoảng 19%, hoặc ít nhất khoảng 20% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn diacylglycerol là khoảng 0,2% đến khoảng 45%, khoảng 0,2% đến khoảng 30%, khoảng 0,2% đến khoảng 20%, khoảng 0,2% đến khoảng 10%, khoảng 0,2% đến khoảng 5%, khoảng 0,2% đến khoảng 1%, khoảng 0,2% đến khoảng 0,8%, khoảng 0,4% đến khoảng 45%, khoảng 0,4% đến khoảng 30%, khoảng 0,4% đến khoảng 20%, khoảng 0,4% đến khoảng 10%, khoảng 0,4% đến khoảng 5%, khoảng 0,4% đến khoảng 1%, khoảng 0,4% đến khoảng 0,8%, khoảng 0,5% đến khoảng 1%, khoảng 0,5% đến khoảng 0,8%, khoảng 10% đến khoảng 45%, khoảng 10% đến khoảng 40%, khoảng 10% đến khoảng 35%, khoảng 10% đến khoảng 30%, khoảng 15% đến khoảng 40%, khoảng 15% đến khoảng 35%, khoảng 15% đến khoảng 30%, hoặc khoảng 15% đến khoảng 25% theo khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn 1,3-diacylglycerol ít nhất là khoảng 0,1%, ít nhất khoảng 0,2%, ít nhất khoảng 0,5%, ít nhất khoảng 1%, ít nhất khoảng 2%, ít nhất khoảng 2,5%, hoặc ít nhất khoảng 3% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol ít nhất là khoảng 0,3%, ít nhất khoảng 0,4%, ít nhất khoảng 0,5%, ít nhất khoảng 1%, ít nhất khoảng 1,5%, ít nhất khoảng 2%, hoặc ít nhất khoảng 5% khối lượng.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol là khoảng 0,3% đến khoảng 5%, khoảng 0,3% đến khoảng 2%, khoảng 0,3% đến khoảng 1,5%, khoảng 0,5% đến khoảng 1,5%, khoảng 1% đến khoảng 1,5%, khoảng 0,5% đến khoảng 2%, khoảng 0,5% đến khoảng 5%,

khoảng 1% đến khoảng 2%, hoặc khoảng 1% đến khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol là 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 khối lượng.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn phospholipit ít nhất là khoảng 2%, ít nhất khoảng 5%, hoặc ít nhất khoảng 8% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn phospholipit là khoảng 2% đến khoảng 25%, khoảng 2% đến khoảng 20%, khoảng 2% đến khoảng 15%, khoảng 2% đến khoảng 10%, khoảng 5% đến khoảng 25%, khoảng 5% đến khoảng 20%, khoảng 5% đến khoảng 20%, khoảng 5% đến khoảng 10%, hoặc khoảng 7% đến khoảng 9% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn phospholipit ít hơn khoảng 20%, ít hơn khoảng 15%, ít hơn khoảng 10%, ít hơn khoảng 9%, hoặc ít hơn khoảng 8% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này gần như không chứa phospholipit. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa chất không xà phòng hóa ít hơn khoảng 2%, ít hơn khoảng 1,5%, ít hơn khoảng 1%, hoặc ít hơn khoảng 0,5% khối lượng của dầu này. Các lớp lipit có mặt trong dầu vi sinh vật này, như phân đoạn triaxylglyxerol, có thể được tách ra bằng sắc ký nhanh và được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng (TLC), hoặc được tách ra và được phân tích bằng các phương pháp khác đã được biết trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diaxylglyxerol, và các tổ hợp của nó, chứa EPA với lượng ít nhất là khoảng 5%, ít nhất khoảng 10%, hơn 10%, ít nhất khoảng 12%, ít nhất khoảng 13%, ít nhất khoảng 14%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 16%, ít nhất khoảng 17%, ít nhất khoảng 18%,

ít nhất khoảng 19%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất là khoảng 35%, ít nhất khoảng 40%, hoặc ít nhất khoảng 45% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diaxylglyxerol, và các hỗn hợp của nó, chứa EPA với lượng khoảng 5% đến khoảng 55%, khoảng 5% đến khoảng 50%, khoảng 5% đến khoảng 45%, khoảng 5% đến khoảng 40%, khoảng 5% đến khoảng 35%, khoảng 5% đến khoảng 30%, khoảng 10% đến khoảng 55%, khoảng 10% đến khoảng 50%, khoảng 10% đến khoảng 45%, khoảng 10% đến khoảng 40%, khoảng 10% đến khoảng 35%, khoảng 10% đến khoảng 30%, ít nhất khoảng 12% đến khoảng 55%, ít nhất khoảng 12% đến khoảng 50%, ít nhất khoảng 12% đến khoảng 45%, ít nhất khoảng 12% đến khoảng 40%, ít nhất khoảng 12% đến khoảng 35%, hoặc ít nhất khoảng 12% đến khoảng 30%, khoảng 15% đến khoảng 55%, khoảng 15% đến khoảng 50%, khoảng 15% đến khoảng 45%, khoảng 15% đến khoảng 40%, khoảng 15% đến khoảng 35%, khoảng 15% đến khoảng 30%, khoảng 15% đến khoảng 25%, khoảng 15% đến khoảng 20%, khoảng 20% đến khoảng 55%, khoảng 20% đến khoảng 50%, khoảng 20% đến khoảng 45%, khoảng 20% đến khoảng 40%, hoặc khoảng 20% đến khoảng 30% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của nó, chứa DHA với lượng ít nhất là khoảng 5%, ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, hoặc ít nhất khoảng 60% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ

phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của nó, chứa DHA với lượng khoảng 5% đến khoảng 60%, khoảng 5% đến khoảng 55%, khoảng 5% đến khoảng 50%, khoảng 5% đến khoảng 40%, khoảng 10% đến khoảng 60%, khoảng 10% đến khoảng 50%, khoảng 10% đến khoảng 40%, khoảng 20% đến khoảng 60%, khoảng 25% đến khoảng 60%, khoảng 25% đến khoảng 50%, khoảng 25% đến khoảng 45%, khoảng 30% đến khoảng 50%, khoảng 35% đến khoảng 50%, hoặc khoảng 30% đến khoảng 40% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của nó, chứa DHA với lượng 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 theo khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của chúng, chứa axit béo ở dạng DHA với lượng khoảng 1% đến khoảng 10%, khoảng 1% đến khoảng 5%, khoảng 2% đến khoảng 5%, khoảng 3% đến khoảng 5%, hoặc khoảng 3% đến khoảng 10% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của chúng, gần như không chứa DHA. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn

triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của chúng, chứa ARA với lượng khoảng từ 0,1% đến khoảng 5%, khoảng 0,1% đến ít hơn khoảng 5%, khoảng 0,1% đến khoảng 4%, khoảng 0,1% đến khoảng 3%, khoảng 0,1% đến khoảng 2%, khoảng 0,2% đến khoảng 5%, khoảng 0,2% đến ít hơn khoảng 5%, khoảng 0,2% đến khoảng 4%, khoảng 0,2% đến khoảng 3%, khoảng 0,2% đến khoảng 2%, khoảng 0,3% đến khoảng 2%, khoảng 0,1% đến khoảng 0,5%, khoảng 0,2% đến khoảng 0,5%, khoảng 0,1% đến khoảng 0,4%, khoảng 0,2% đến khoảng 0,4%, khoảng 0,5% đến khoảng 2%, khoảng 1% đến khoảng 2%, khoảng 0,5% đến khoảng 1,5%, hoặc khoảng 1% đến khoảng 1,5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của chúng, chứa ARA với lượng là khoảng 5% hoặc ít hơn, ít hơn khoảng 5%, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, khoảng 2% hoặc ít hơn, 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 theo khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của chúng, gần như không chứa ARA. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các tổ hợp của nó, chứa DPA n-6 với lượng khoảng 0,4% đến khoảng 2%, khoảng

0,4% đến khoảng 3%, khoảng 0,4% đến khoảng 4%, khoảng 0,4% đến khoảng 5%, khoảng 0,4% đến ít hơn khoảng 5%, khoảng 0,5% đến khoảng 1%, khoảng 0,5% đến khoảng 2%, khoảng 0,5% đến khoảng 3%, khoảng 0,5% đến khoảng 4%, khoảng 0,5% đến khoảng 5%, khoảng 0,5% đến ít hơn khoảng 5%, khoảng 1% đến khoảng 2%, khoảng 1% đến khoảng 3%, khoảng 1% đến khoảng 4%, khoảng 1% đến khoảng 5%, hoặc khoảng 1% đến ít hơn khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của chúng, chứa DPA n-6 với lượng khoảng 5%, ít hơn khoảng 5%, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, khoảng 2% hoặc ít hơn, khoảng 1% hoặc ít hơn, khoảng 0,75% hoặc ít hơn, khoảng 0,6% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 0,5% hoặc ít hơn theo khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của chúng, gần như không chứa DPA n-6. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triaxylglyxerol, phân đoạn diaxylglyxerol, phân đoạn sterol, phân đoạn sterol este, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn phospholipit, và các hỗn hợp của chúng, chứa axit béo với lượng khoảng 5% hoặc ít hơn, ít hơn khoảng 5%, khoảng 4% hoặc ít hơn, khoảng 3% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 2% hoặc ít hơn theo khối lượng axit oleic (18:1 n-9), axit linoleic (18:2 n-6), axit linolenic (18:3 n-3), axit eicosenoic (20:1 n-9), axit erucic (22:1 n-9), axit stearidonic (18:4 n-3), hoặc hỗn hợp của chúng.

Phân tử triaxylglyxerol chứa 3 nguyên tử cacbon trung tâm ($C(sn-1)H_2R1-(sn-2)H_2R2-C(sn-3)H_2R3$), cho phép tạo các đồng phân vị trí khác nhau. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó ít nhất khoảng 2%, ít nhất khoảng 3%, ít nhất khoảng 5%, ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, hoặc ít nhất khoảng 40% triaxylglyxerol trong phân đoạn triaxylglyxerol này chứa DHA ở hai vị trí trong triaxylglyxerol (được thể DHA hai lần) được chọn từ bất kỳ hai trong số các vị trí $sn-1$, $sn-2$, và $sn-3$, dựa trên tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó khoảng 2% đến khoảng 55%, khoảng 2% đến khoảng 50%, khoảng 2% đến khoảng 45%, khoảng 2% đến khoảng 40%, khoảng 2% đến khoảng 35%, khoảng 2% đến khoảng 30%, khoảng 2% đến khoảng 25%, khoảng 5% đến khoảng 55%, khoảng 5% đến khoảng 50%, khoảng 5% đến khoảng 45%, khoảng 5% đến khoảng 40%, khoảng 5% đến khoảng 35%, khoảng 5% đến khoảng 30%, khoảng 5% đến khoảng 25%, khoảng 10% đến khoảng 55%, khoảng 10% đến khoảng 50%, khoảng 10% đến khoảng 45%, khoảng 10% đến khoảng 40%, khoảng 10% đến khoảng 35%, khoảng 10% đến khoảng 30%, khoảng 10% đến khoảng 25%, khoảng 10% đến khoảng 20%, khoảng 20% đến khoảng 40%, khoảng 20% đến khoảng 35%, hoặc khoảng 20% đến khoảng 25% các triaxylglyxerol trong phân đoạn triaxylglyxerol này chứa EPA ở hai vị trí trong triaxylglyxerol được chọn từ bất kỳ hai trong số các vị trí $sn-1$, $sn-2$, hoặc $sn-3$, dựa trên tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó ít nhất khoảng 0,5%, ít nhất khoảng 1%, ít nhất khoảng 1,5%, hoặc ít nhất khoảng 2% các triaxylglyxerol trong phân đoạn triaxylglyxerol này chứa DHA ở tất cả các vị trí $sn-1$, $sn-2$, và $sn-3$ (được

thể DHA ba lần), dựa trên tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó khoảng 0,5% đến khoảng 5%, khoảng 0,5% đến khoảng 3%, khoảng 0,5% đến khoảng 2,5%, khoảng 0,5% đến khoảng 2%, khoảng 1% đến khoảng 5%, khoảng 1% đến khoảng 3%, hoặc khoảng 1% đến khoảng 2% các triaxylglyxerol trong phân đoạn triaxylglyxerol này chứa DHA ở tất cả các vị trí *sn*-1, *sn*-2, và *sn*-3, dựa vào tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật chứa phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 45%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 55%, hoặc ít nhất khoảng 60% các triaxylglyxerol trong phân đoạn triaxylglyxerol này chứa DHA ở một vị trí trong triaxylglyxerol được chọn từ bất kỳ một trong số các vị trí *sn*-1, *sn*-2, hoặc *sn*-3, dựa vào tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triaxylglyxerol, trong đó khoảng 10% đến khoảng 80%, khoảng 10% đến khoảng 70%, khoảng 10% đến khoảng 60%, khoảng 15% đến khoảng 80%, khoảng 15% đến khoảng 75%, khoảng 15% đến khoảng 70%, khoảng 15% đến khoảng 65%, khoảng 15% đến khoảng 60%, khoảng 35% đến khoảng 80%, khoảng 35% đến khoảng 75%, khoảng 35% đến khoảng 65%, khoảng 35% đến khoảng 60%, khoảng 40% đến khoảng 80%, khoảng 40% đến khoảng 75%, khoảng 40% đến khoảng 70%, khoảng 40% đến khoảng 65%, khoảng 40% đến khoảng 60%, hoặc khoảng 40% đến khoảng 55% các triaxylglyxerol trong phân đoạn triaxylglyxerol này chứa DHA ở một vị trí trong triaxylglyxerol được chọn từ bất kỳ một trong số các vị trí *sn*-1, *sn*-2, và *sn*-3, dựa vào tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC.

Sáng chế đề cập thêm đến các phương pháp sản xuất dầu vi sinh vật. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm nuôi thraustochytrid theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy để sản xuất sinh khối và chiết dầu chứa axit béo omega-3 từ sinh khối này. Dầu này có thể được chiết từ sinh khối mới thu hoạch hoặc có thể được chiết từ sinh khối đã thu hoạch trước đó mà đã được dự trữ trong các điều kiện chống hỏng. Các phương pháp đã biết có thể được sử dụng để nuôi cấy thraustochytrid theo sáng chế, để phân lập sinh khối từ môi trường nuôi cấy này, để chiết dầu vi sinh vật từ sinh khối này, và để phân tích profin axit béo của các dầu được chiết từ sinh khối này. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,130,242.

Sáng chế đề cập thêm đến dầu vi sinh vật chứa profin axit béo theo sáng chế. Dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể là dầu bất kỳ thu được từ vi sinh vật, bao gồm, ví dụ: dầu thô chiết được từ sinh khối của vi sinh vật này mà không xử lý thêm; dầu tinh luyện thu được bằng cách xử lý dầu vi sinh vật thô mà không có bước xử lý thêm như tinh luyện, tẩy, và/hoặc khử mùi; dầu vi sinh vật đã pha loãng thu được bằng cách pha loãng dầu vi sinh vật thô hoặc đã tinh luyện; hoặc dầu đã được làm giàu mà thu được, ví dụ, bằng cách xử lý dầu vi sinh vật thô hoặc đã tinh luyện bằng các phương pháp tinh chế khác để làm tăng nồng độ của axit béo (như DHA) trong dầu này.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol este là khoảng 0%, ít nhất khoảng 0,1%, ít nhất khoảng 0,2%, ít nhất khoảng 0,5%, ít nhất khoảng 1%, ít nhất khoảng 1,5%, ít nhất khoảng 2%, hoặc ít nhất khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol este là từ khoảng 0% đến khoảng 1,5%, khoảng 0% đến khoảng 2%, khoảng 0% đến khoảng 5%, khoảng 1% đến khoảng 1,5%, khoảng 0,2% đến khoảng 1,5%, khoảng 0,2% đến khoảng 2%, hoặc khoảng 0,2% đến khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương

án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol este ít hơn khoảng 5%, ít hơn khoảng 4%, ít hơn khoảng 3%, hoặc ít hơn khoảng 2% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triglyxerit ít nhất là khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, hoặc ít nhất khoảng 90% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triglyxerit là từ khoảng 65% đến khoảng 95%, khoảng 75% đến khoảng 95%, hoặc khoảng 80% đến khoảng 95% khối lượng, hoặc khoảng 97% khối lượng, hoặc khoảng 98% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn axit béo tự do ít nhất là khoảng 0,5%, ít nhất khoảng 1%, ít nhất khoảng 1,5%, ít nhất khoảng 2%, ít nhất khoảng 2,5%, hoặc ít nhất khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn axit béo tự do là từ khoảng 0,5% đến khoảng 5%, khoảng 0,5% đến khoảng 2,5%, khoảng 0,5% đến khoảng 2%, khoảng 0,5% đến khoảng 1,5%, khoảng 0,5% đến khoảng 1%, khoảng 1% đến khoảng 2,5%, khoảng 1% đến khoảng 5%, khoảng 1,5% đến khoảng 2,5%, khoảng 2% đến khoảng 2,5%, hoặc khoảng 2% đến khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn axit béo tự do ít hơn khoảng 5%, ít hơn khoảng 4%, ít hơn khoảng 3%, ít hơn khoảng 2%, hoặc ít hơn khoảng 1% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol ít nhất là khoảng 0,5%, ít nhất khoảng 1%, ít nhất khoảng 1,5%, ít nhất khoảng 2%, hoặc ít nhất khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol là từ khoảng 0,5% đến khoảng 1,5%, khoảng 1% đến khoảng 1,5%, khoảng 0,5% đến khoảng 2%, khoảng 0,5% đến khoảng 5%, khoảng 1% đến khoảng 2%, hoặc khoảng 1% đến khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol ít hơn khoảng 5%, ít hơn khoảng 4%, ít hơn khoảng 3%, ít hơn khoảng 2%, hoặc ít hơn khoảng 1% khối lượng.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn diglyxerit ít nhất là khoảng 1,5%, ít nhất khoảng 2%, ít nhất khoảng 2,5%, ít nhất khoảng 3%, ít nhất khoảng 3,5%, hoặc ít nhất khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn diglyxerit là từ khoảng 1,5% đến khoảng 3%, khoảng 2% đến khoảng 3%, khoảng 1,5% đến khoảng 3,5%, khoảng 1,5% đến khoảng 5%, khoảng 2,5% đến khoảng 3%, khoảng 2,5% đến khoảng 3,5%, hoặc khoảng 2,5% đến khoảng 5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa chất không xà phòng hóa ít hơn khoảng 2%, ít hơn khoảng 1,5%, ít hơn khoảng 1%, hoặc ít hơn khoảng 0,5% khối lượng của dầu này. Lớp lipit có mặt trong dầu vi sinh vật này, như phân đoạn triglyxerit, có thể tách ra được bằng sắc ký nhanh và được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng (TLC), hoặc được tách và được phân tích bằng các phương pháp khác đã được biết trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, và các hỗn hợp của chúng, chứa DHA với lượng 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% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, và các hỗn hợp của chúng, chứa DHA với lượng từ khoảng 40% đến khoảng 45%, khoảng 40% đến khoảng 50%, khoảng 40% đến khoảng 60%, khoảng 50% đến khoảng 60%, khoảng 55% đến khoảng 60%, khoảng 40% đến khoảng 65%, khoảng 50% đến khoảng 65%, khoảng 55% đến khoảng 65%, khoảng 40% đến khoảng 70%, khoảng 40% đến khoảng 80%, khoảng 50% đến khoảng 80%, khoảng 55% đến

khoảng 80%, khoảng 60% đến khoảng 80%, hoặc khoảng 70% đến khoảng 80% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn sterol este chứa DHA với lượng 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 theo khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, và các hỗn hợp của chúng, chứa EPA với lượng 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 theo khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, và các hỗn hợp của chúng, chứa EPA với lượng từ khoảng 2% đến khoảng 3%, khoảng 2% đến khoảng 3,5%, khoảng 2,5% đến khoảng 3,5%, khoảng 2% đến khoảng 6%, khoảng 2,5% đến khoảng 6%, khoảng 3,0% đến khoảng 6%, khoảng 3,5% đến khoảng 6%, khoảng 5% đến khoảng 6%, hoặc khoảng 2% đến khoảng 10% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, gần như không chứa EPA. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, chứa tỉ

lệ khối lượng của DHA so với EPA ít nhất khoảng 5:1, ít nhất khoảng 7:1, ít nhất khoảng 9:1, ít nhất khoảng 10:1, ít nhất khoảng 15:1, ít nhất khoảng 20:1, ít nhất khoảng 25:1, ít nhất khoảng 30:1, hoặc ít nhất khoảng 50:1, trong đó dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó chứa EPA với lượng 10% hoặc ít hơn theo khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, chứa tỉ lệ khối lượng của DHA so với EPA ít nhất là khoảng 5:1, nhưng ít hơn khoảng 20:1. Theo một số phương án, tỉ lệ khối lượng của DHA so với EPA là từ khoảng 5:1 đến khoảng 18:1, từ khoảng 7:1 đến khoảng 16:1, hoặc từ khoảng 10:1 đến khoảng 15:1. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng chứa ARA với lượng từ khoảng 0,1% đến khoảng 0,25%, khoảng 0,2% đến khoảng 0,25%, khoảng 0,1% đến khoảng 0,5%, hoặc khoảng 0,1% đến khoảng 1,5% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, chứa ARA với lượng khoảng 1,5% hoặc ít hơn, khoảng 1% hoặc ít hơn, khoảng 0,5% hoặc ít hơn, khoảng 0,2% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 0,1% hoặc ít hơn theo khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn có cực

(bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, gần như không chứa ARA. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn diglyxerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, chứa tỉ lệ khối lượng của DHA so với ARA ít nhất là khoảng 20:1, ít nhất khoảng 30:1, ít nhất khoảng 35:1, ít nhất khoảng 40:1, ít nhất khoảng 60:1, ít nhất khoảng 80:1, ít nhất khoảng 100:1, ít nhất khoảng 150:1, ít nhất khoảng 200:1, ít nhất khoảng 250:1, hoặc ít nhất khoảng 300:1. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, chứa DPA n-6 với lượng từ khoảng 0,5% đến khoảng 1%, khoảng 0,5% đến khoảng 2%, khoảng 0,5% đến khoảng 2,5%, khoảng 0,5% đến khoảng 3%, khoảng 0,5% đến khoảng 3,5%, khoảng 0,5% đến khoảng 5%, khoảng 0,5% đến khoảng 6%, khoảng 1% đến khoảng 2%, khoảng 2% đến khoảng 3%, khoảng 2% đến khoảng 3,5%, khoảng 1% đến khoảng 2,5%, khoảng 1% đến khoảng 3%, khoảng 1% đến khoảng 3,5%, khoảng 1% đến khoảng 5%, hoặc khoảng 1% đến khoảng 6% khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglyxerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglyxerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, chứa DPA n-6 với lượng 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 theo khối lượng. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn

sterol este, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, gần như không chứa DPA n-6. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, chứa tỉ lệ khối lượng của DHA so với DPA n-6 là khoảng hơn 6:1, ít nhất khoảng 8:1, ít nhất khoảng 10:1, ít nhất khoảng 15:1, ít nhất khoảng 20:1, ít nhất khoảng 25:1, ít nhất khoảng 50:1, hoặc ít nhất khoảng 100:1. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, 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, khoảng 1% hoặc ít hơn, hoặc khoảng 0,5% hoặc ít hơn theo khối lượng mỗi axit linoleic (18:2 n-6), axit linolenic (18:3 n-3), axit eicosenoic (20:1 n-9), và axit erucic (22:1 n-9). Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó được chọn từ phân đoạn sterol este, phân đoạn triglycerit, phân đoạn axit béo tự do, phân đoạn sterol, phân đoạn diglycerit, phân đoạn có cực (bao gồm phân đoạn phospholipit), và các hỗn hợp của chúng, chứa axit heptadecanoic với lượng 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 theo khối lượng (17:0). Theo một số phương án, dầu vi sinh vật và/hoặc một hoặc nhiều phân đoạn của nó chứa khoảng 0,01% đến khoảng 5% khối lượng, khoảng 0,05% đến khoảng 3% khối lượng, hoặc khoảng 0,1% đến khoảng 1% khối lượng là axit heptadecanoic.

Phân tử triglyxerit chứa 3 nguyên tử cacbon trung tâm ($C_{sn-1}H_2R1-C_{sn-2}H_2R2-C_{sn-3}H_2R3$), cho phép tạo ra các đồng phân vị trí khác nhau. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triglyxerit, trong đó ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, hoặc ít nhất khoảng 40% các triglyxerit phân đoạn triglyxerit này chứa DHA ở hai vị trí trong triglyxerit (DHA được thể hai lần) được chọn từ bất kỳ hai trong số các vị trí $sn-1$, $sn-2$, và $sn-3$, dựa vào tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triglyxerit, trong đó từ khoảng 20% đến khoảng 40%, khoảng 20% đến khoảng 35%, khoảng 30% đến khoảng 40%, hoặc khoảng 30% đến khoảng 35% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit này chứa DHA ở hai vị trí trong triglyxerit được chọn từ bất kỳ hai trong số các vị trí $sn-1$, $sn-2$, hoặc $sn-3$, dựa vào tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triglyxerit, trong đó ít nhất khoảng 5%, ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, hoặc ít nhất khoảng 20% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit này chứa DHA ở tất cả các vị trí $sn-1$, $sn-2$, và $sn-3$ (được thể DHA ba lần), dựa vào tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triglyxerit, trong đó từ khoảng 5% đến khoảng 20%, khoảng 5% đến khoảng 15%, khoảng 10% đến khoảng 20%, hoặc khoảng 10% đến khoảng 15% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit này chứa DHA ở tất cả các vị trí $sn-1$, $sn-2$, và $sn-3$, dựa vào tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC. Ngược lại, các chủng TAG được báo cáo trong patent Mỹ số 6,582,941 không chứa DHA ở cả 3 vị trí. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triglyxerit, trong đó ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 55%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, hoặc ít nhất khoảng 75% các triglyxerit trong phân

đoạn triglyxerit này chứa DHA ở một vị trí trong triglyxerit này được chọn từ bất kỳ một trong số các vị trí *sn*-1, *sn*-2, hoặc *sn*-3, dựa vào tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC. Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này chứa phân đoạn triglyxerit, trong đó từ khoảng 50% đến khoảng 75%, khoảng 50% đến khoảng 70%, khoảng 50% đến khoảng 65%, khoảng 60% đến khoảng 75%, khoảng 60% đến khoảng 70%, hoặc khoảng 60% đến khoảng 65% các triglyxerit trong phân đoạn triglyxerit này chứa DHA ở một vị trí trong triglyxerit này được chọn từ bất kỳ một trong số các vị trí *sn*-1, *sn*-2, và *sn*-3, dựa vào tỉ lệ phần trăm diện tích tương đối của các pic trên sắc ký HPLC.

Chế phẩm

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm chứa vi sinh vật theo sáng chế, sinh khối được phân lập theo sáng chế, dầu vi sinh vật theo sáng chế, hoặc hỗn hợp của chúng.

Vi sinh vật, sinh khối, hoặc dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể được biến đổi hoặc xử lý hóa học hoặc vật lý thêm dựa vào các yêu cầu của chế phẩm này bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết.

Tế bào vi sinh vật hoặc sinh khối có thể được làm khô trước khi sử dụng trong chế phẩm này bằng các phương pháp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, làm đông khô, làm khô bằng không khí, phun sấy, hầm sấy, sấy chân không (làm đông khô), và quy trình tương tự. Ngoài ra, sinh khối đã thu hoạch và rửa có thể được sử dụng trực tiếp trong chế phẩm này mà không cần sấy khô. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,130,242 và 6,812,009, mỗi tài liệu này được nộp kèm theo đây.

Dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu để sản xuất một cách hiệu quả hơn sản phẩm được làm giàu axit béo như EPA. Ví dụ, dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể được đưa vào các kỹ thuật tinh chế khác nhau đã được biết trong lĩnh vực này, như chưng cất

hoặc khử ure, để sản xuất ra sản phẩm có hiệu lực lớn hơn có các nồng độ EPA hoặc axit béo khác lớn hơn. Dầu vi sinh vật theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong các phản ứng hóa học để tạo ra các hợp chất thu được từ các axit béo trong dầu này, như este và muối của EPA hoặc axit béo khác.

Chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều tá dược. Như được sử dụng ở đây, "tá dược" chỉ thành phần, hoặc hỗn hợp của các thành phần, mà được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế để tạo ra các đặc điểm mong muốn cho chế phẩm này, bao gồm thực phẩm cũng như dược phẩm, mỹ phẩm và sản phẩm công nghiệp. Tá dược theo sáng chế có thể được mô tả là tá dược "dược dụng" khi được bổ sung vào dược phẩm, nghĩa là tá dược này là hợp chất, nguyên liệu, chế phẩm, muối, và/hoặc dạng liều mà, trong phạm vi đánh giá y học, là thích hợp để tiếp xúc với các mô của người hoặc động vật không phải người mà không gây độc quá mức, kích ứng, phản ứng dị ứng, hoặc các biến chứng khó giải quyết trong khoảng thời gian tiếp xúc mong muốn với tỉ lệ lợi ích/nguy cơ thích hợp. Theo một số phương án, thuật ngữ "dược dụng" nghĩa là được phê chuẩn bởi tổ chức điều hành của bang hoặc chính phủ hoặc được liệt kê trong dược điển Mỹ hoặc dược điển quốc tế được công nhận chung khác để sử dụng ở động vật, và cụ thể hơn là ở người. Nhiều tá dược khác nhau có thể được sử dụng. Theo một số phương án, tá dược này có thể là, nhưng không giới hạn ở, chất kiềm, chất ổn định, chất chống oxy hóa, chất kết dính, chất tách, chất bao, thành phần pha ngoài, thành phần giải phóng kiểm soát, dung môi, chất hoạt động bề mặt, chất làm ẩm, chất đệm, chất độn, chất làm mềm, hoặc hỗn hợp của chúng. Các tá dược ngoài các tá dược đã được thảo luận ở đây có thể bao gồm các tá dược được liệt kê trong, nhưng không giới hạn ở, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st ed. (2005). Việc bao gồm tá dược trong phân loại cụ thể ở đây (ví dụ,

“dung môi”) được dự định để minh họa hơn là làm giới hạn vai trò của tá dược. Tá dược cụ thể có thể nằm trong nhiều nhóm phân loại.

Chế phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm, và sản phẩm công nghiệp.

Theo một số phương án, chế phẩm này là thực phẩm. Thực phẩm là thực phẩm bất kỳ để dùng cho động vật không phải người hoặc người, và bao gồm cả chế phẩm lỏng và rắn. Thực phẩm có thể là chất phụ gia cho thực phẩm của người hoặc động vật. Thực phẩm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thực phẩm thông thường; sản phẩm lỏng, bao gồm sữa, đồ uống, đồ uống chữa bệnh, và đồ uống dinh dưỡng; thực phẩm chức năng; thực phẩm bổ sung; thuốc-thực phẩm; sữa công thức cho trẻ sơ sinh, bao gồm trẻ sinh non, thực phẩm cho bà bầu hoặc phụ nữ cần chăm sóc; thực phẩm cho người trưởng thành; thực phẩm cho người già; và thực phẩm cho động vật.

Theo một số phương án, vi sinh vật, sinh khối, hoặc dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể được sử dụng trực tiếp hoặc được bao gồm như chất phụ gia trong một hoặc nhiều: dầu, thành phần shhoactening, spread, và thành phần chất béo khác, đồ uống, nước xốt, thực phẩm dựa trên bơ sữa hoặc đậu tương (như sữa, sữa chua, pho mat, và kem), đồ ăn nướng lò, sản phẩm dinh dưỡng, ví dụ, như sản phẩm dinh dưỡng bổ sung (ở dạng viên nang hoặc viên nén), sản phẩm bổ sung vitamin, sản phẩm bổ sung khẩu phần ăn, đồ uống dạng bột, và thực phẩm dạng bột thành phẩm hoặc bán thành phẩm. Theo một số phương án, sản phẩm dinh dưỡng bổ sung là ở dạng viên nang chay mà không được bào chế từ và không chứa các thành phần bất kỳ có nguồn gốc từ động vật.

Một phần danh mục thực phẩm mà có thể chứa dầu vi sinh vật theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sản phẩm dựa trên đậu tương (sữa, kem, sữa chua, đồ uống, kem, thành phần phết lên bánh, chất làm

trắng); xúp và hỗn hợp xúp; bột nhào, bột nhão, thực phẩm nướng bao gồm, ví dụ, bánh mì nguyên chất, ngũ cốc ăn sáng, bánh, bánh pho mat, bánh nướng, cupcake, bánh quy, thanh, bánh mì, ổ bánh mì, bánh quy, bánh xốp nướng, bánh bao, bánh mì vòng, bánh mì nướng dùng với súp, bánh quy giòn, đồ ngọt, bánh ăn nhanh, bánh nướng, thanh granola/snack, và bánh mì nướng; kẹo; bánh kẹo cứng; socola và các loại bánh kẹo khác; kẹo cao su; thực phẩm lỏng, ví dụ, sữa, đồ uống tăng lực, sữa công thức, đồ uống được cacbonat hóa, trà, thức ăn lỏng, nước hoa quả, đồ uống dựa trên trái cây, đồ uống dựa trên rau; siro đa vitamin, sản phẩm thay thế thức ăn, thực phẩm thuốc, và xiro; hỗn hợp đồ uống dạng bột; mì ống; sản phẩm cá đã xử lý; sản phẩm thịt đã được xử lý; sản phẩm gia cầm đã được xử lý; nước xốt và xốt; đồ gia vị (xốt cà chua, mayonnaise, v.v...); thành phần phết lên bánh dựa trên rau; sản phẩm bơ sữa; sữa chua; bơ, sản phẩm bơ sữa đông lạnh; kem lạnh; đồ tráng miệng lạnh; sữa chua đông lạnh; thực phẩm bán rắn như thức ăn cho em bé; bánh pudding và đồ tráng miệng gelatin; phomat đã xử lý và chưa xử lý; hỗn hợp bánh kẹp; thanh thực phẩm bao gồm thanh tăng lực; hỗn hợp bánh quế; đồ gia vị salat; hỗn hợp trứng thay thế; lạc và thành phần phết lên bánh dựa trên lạc; đồ ăn nhanh có muối như khoai tây chiên và các loại lát mỏng được chiên khác, ngô chiên, thoactilla chiên, đồ ăn nhanh dạng được ép đùn, bỏng ngô, bánh quy xoắn, khoai tây chiên, và lạc; và các đồ ăn nhanh đặc biệt khác như snack nhúng, snack hoa quả khô, snack thịt, bì lợn, thanh thực phẩm có lợi cho sức khỏe và bánh gạo/ngô.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật theo sáng chế có thể được sử dụng để bổ sung vào sữa công thức cho trẻ sơ sinh. Sữa công thức cho trẻ sơ sinh có thể được bổ sung bằng một mình dầu vi sinh vật theo sáng chế hoặc kết hợp với dầu đã tinh luyện bằng phương pháp vật lý thu được từ vi sinh vật sản xuất axit arachidonic (ARA). Vi sinh vật sản xuất ARA, ví dụ,

là *Mortierella alpina* hoặc *Mortierella* sect. *schmuckeri*. Ngoài ra, sữa công thức cho trẻ sơ sinh có thể được bổ sung bằng dầu vi sinh vật theo sáng chế kết hợp với dầu giàu ARA, bao gồm ARASCO® (Martek Biosciences, Columbia, MD).

Theo một số phương án, chế phẩm này là thức ăn cho động vật. "Động vật" bao gồm vi sinh vật không phải người thuộc giới động vật, và bao gồm, không giới hạn ở, động vật dưới nước và động vật trên mặt đất. Thuật ngữ "thức ăn cho động vật" dùng để chỉ thức ăn bất kỳ được dự định dùng cho động vật không phải là người, cho dù là cá; cá để bán; cá cảnh; ấu trùng cá; động vật hai mảnh vỏ; động vật thân mềm; giáp xác; cá có vỏ; tôm; tôm ấu trùng; artemia; rotifer; tôm biển; cá kiếm ăn bằng cách lọc nước; động vật lưỡng cư; bò sát; động vật có vú; động vật nuôi; động vật trang trại; động vật trong vườn thú; động vật cho thể thao; gia súc để làm giống; động vật chạy đua; động vật biểu diễn; heirloom animals; động vật hiếm hoặc có nguy cơ tuyệt chủng; thú nuôi trong nhà; thú nuôi như chó, mèo, lợn guinea, thỏ, chuột cống, chuột nhắt, hoặc ngựa; linh trưởng như khỉ (ví dụ, cebus, rhesus, African green, patas, cynomolgus, và cercopithecus), khỉ không đuôi, đười ươi, khỉ đầu chó, vượn, và tinh tinh; động vật thuộc họ chó như chó và chó sói; động vật thuộc họ mèo như mèo, sư tử, và hổ; động vật họ ngựa như ngựa, lừa, và ngựa vằn; động vật làm thức ăn như bò, gia súc, lợn và cừu; động vật có móng guốc như hươu và hươu cao cổ; hoặc động vật gặm nhấm như chuột nhắt, chuột cống, hamsters và lợn guinea; và v.v.... Thức ăn cho động vật, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thức ăn trong nuôi trồng thủy sản, thức ăn cho động vật nuôi bao gồm thức ăn cho thú nuôi, thức ăn cho động vật trong vườn thú, thức ăn cho động vật làm việc, thức ăn cho thú nuôi, và các hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, chế phẩm này là thức ăn hoặc thực phẩm bổ sung cho động vật bất kỳ mà có thịt hoặc sản phẩm được tiêu thụ bởi

người, như động vật bất kỳ mà thịt, trứng hoặc sữa của nó được thu gom để tiêu thụ cho người. Khi dùng để nuôi các động vật này, các chất dinh dưỡng như LC-PUFA có thể được kết hợp vào thịt, sữa, trứng hoặc các sản phẩm khác của các động vật này để làm tăng hàm lượng các chất dinh dưỡng này của chúng.

Theo một số phương án, chế phẩm này là nguyên liệu được phun sấy mà có thể được bóp vụn để tạo ra các hạt có kích thước thích hợp để dùng cho sinh vật phù du, artemia, rotifers, và cá kiếm ăn bằng cách làm sạch nước. Theo một số phương án, động vật phù du, artemia, hoặc rotifers được cho ăn bằng chế phẩm này lại được dùng làm thức ăn cho ấu trùng cá, cá, cá có vỏ, động vật có hai vỏ, hoặc động giáp xác.

Theo một số phương án, chế phẩm này là dược phẩm. Dược phẩm thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuốc chống viêm, thuốc điều trị bệnh tim mạch vành, thuốc điều trị chứng xơ cứng động mạch, chất hóa trị liệu, tá dược hoạt động, thuốc điều trị chứng loãng xương, thuốc chống trầm cảm, thuốc kháng *Helicobacter pylori*, thuốc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, thuốc điều trị bệnh thoái hóa gan, kháng sinh, thuốc hạ cholesterol, và thuốc làm hạ triaxylglyxerol. Theo một số phương án, chế phẩm này là thực phẩm y tế. Thực phẩm y tế bao gồm thực phẩm ở dạng chế phẩm để sử dụng hoặc tiêu thụ bên ngoài dưới sự theo dõi của bác sĩ và được dự định để quản lý bệnh bằng chế độ ăn mà bệnh này đòi hỏi chế độ dinh dưỡng đặc biệt, dựa trên các nguyên tắc khoa học đã được công nhận, được thiết lập bằng đánh giá y tế.

Theo một số phương án, dầu vi sinh vật này có thể được tạo ra ở dạng liều. Các dạng liều có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, viên nén, viên nang, viên nhộng, pelet, viên tròn, bột và hạt, và dạng liều dùng ngoài đường tiêu hóa, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch, huyền phù, nhũ tương, và bột khô chứa lượng hữu hiệu dầu vi sinh vật này. Còn được

biết trong lĩnh vực này là các chế phẩm này cũng có thể chứa các chất pha loãng được dụng, chất độn, chất gây rã, chất kết dính, chất làm trơn, chất hoạt động bề mặt, tá dược lỏng kỵ nước, tá dược lỏng tan trong nước, chất nhũ hóa, chất đệm, chất làm ẩm, chất làm ướt, chất hòa tan, chất bảo quản và các chất tương tự. Các dạng sử dụng có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, viên nén, viên có nhân, viên nang, viên nén bao film, và viên tròn, chứa dầu vi sinh vật và một hoặc nhiều chất mang được dụng thích hợp.

Để sử dụng bằng đường miệng, dầu vi sinh vật này có thể được kết hợp với các chất mang được dụng đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các chất mang này cho phép dầu vi sinh vật theo sáng chế được bào chế thành viên nén, viên tròn, viên có nhân, viên nang, chất lỏng, gel, xyro, bột nhão, huyền phù, và các dạng tương tự, để sử dụng bằng đường miệng bởi ngwofi đang được điều trị. Theo một số phương án, dạng liều này là viên nén, viên tròn hoặc viên nén bao film. Dược phẩm để sử dụng bằng đường miệng có thể thu được bằng cách bổ sung tá dược rắn, tùy ý nghiền hỗn hợp tạo thành, và xử lý hỗn hợp hạt này, sau khi bổ sung các tá dược thích hợp, nếu muốn, để thu được viên nén hoặc lõi viên có nhân. Các tá dược thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất độn như đường, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chế phẩm lactoza, sucroza, manitol, và sorbitol; xenluloza như, nhưng không giới hạn ở, tinh bột ngô, tinh bột lúa mỳ, tinh bột gạo, tinh bột khoai tây, gelatin, gôm tragacanth, metyl xenluloza, hydroxypropylmetyl xenluloza, natri carboxymetyl xenluloza, và polyvinylpyrrolidon (PVP). Nếu muốn, chất làm rã có thể được bổ sung vào, như, nhưng không giới hạn ở, polyvinylpyrrolidon liên kết chéo, thạch, hoặc axit alginic hoặc muối của nó, như natri alginat. Các dược phẩm có thể được sử dụng bằng đường miệng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, viên nang đẩy khí được sản xuất từ gelatin, cũng như viên nang mềm kín được tạo ra từ gelatin và chất dẻo hóa, như glyxerol hoặc sorbitol.

Theo một số phương án, dạng liều này là dạng liều chay, trong đó dạng liều này không được tạo ra từ và không chứa các thành phần bất kỳ có nguồn gốc động vật. Theo một số phương án, dạng liều chay này là viên nang chay.

Theo một số phương án, chế phẩm này là mỹ phẩm. Mỹ phẩm này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhũ tương, kem, lotion, mặt nạ, xà phòng, dầu gội đầu, sữa rửa mặt, kem bôi mặt, dầu xả, đồ trang điểm, sữa tắm, và các chất lỏng phân tán. Các chất mỹ phẩm có thể là thuốc hoặc không phải thuốc.

Theo một số phương án, chế phẩm này là chế phẩm công nghiệp. Theo một số phương án, chế phẩm này là nguyên liệu khởi đầu cho một hoặc nhiều quy trình sản xuất. Nguyên liệu sản xuất bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyme; nguyên liệu chụp ảnh cảm quang; chất tẩy; và dầu công nghiệp; hoặc chất tẩy công nghiệp. Ví dụ, patent Mỹ số 7,259,006 mô tả việc sử dụng chất béo chứa DHA và dầu để sản xuất axit behenic và sản xuất nguyên liệu chụp ảnh cảm quang sử dụng axit behenic.

Phương pháp sử dụng chế phẩm

Theo một số phương án, các chế phẩm này có thể được sử dụng để điều trị bệnh ở người hoặc động vật không phải là người. Theo một số phương án, các chế phẩm này có thể được sử dụng để nuôi người hoặc động vật không phải là người.

Thuật ngữ “điều trị” và “việc điều trị” dùng để chỉ cả việc điều trị chữa bệnh và phòng ngừa hoặc phòng chống, trong đó mục đích là để phòng ngừa hoặc làm chậm (làm giảm) bệnh lý không mong muốn, bệnh hoặc rối loạn, hoặc để thu được các kết quả có lợi hoặc các kết quả lâm sàng mong muốn. Với các mục đích của sáng chế, các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, làm giảm hoặc cải thiện các triệu chứng hoặc dấu hiệu đi kèm theo tình trạng, bệnh hoặc rối

loạn này; làm giảm mức độ của tình trạng, bệnh hoặc rối loạn; làm ổn định tình trạng, bệnh hoặc rối loạn, (nghĩa là tình trạng, bệnh hoặc rối loạn này không xấu đi); trì hoãn sự tấn công hoặc phát triển của tình trạng, bệnh hoặc rối loạn; cải thiện tình trạng, bệnh hoặc rối loạn; làm dịu (dù là một phần hoặc hoàn toàn và dù là có thể phát hiện ra hoặc không thể phát hiện ra) tình trạng, bệnh hoặc rối loạn; hoặc làm tăng cường hoặc cải thiện tình trạng, bệnh hoặc rối loạn. Việc điều trị bao gồm gây ra đáp ứng có ý nghĩa lâm sàng mà không có các tác dụng phụ quá mức. Việc điều trị cũng bao gồm kéo dài sự sống so với thời gian sống được kỳ vọng nếu không nhận được điều trị.

Theo một số phương án, chế phẩm này được sử dụng để điều trị tình trạng, bệnh hoặc rối loạn như mụn trứng cá, viêm cấp tính, bệnh lý hoàng điểm do tuổi, bệnh dị ứng, bệnh Alzheimer, bệnh viêm khớp, bệnh hen, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh tự miễn, rối loạn mỡ máu, u nang vú, hội chứng suy giảm cả thể chất và tinh thần, bệnh ung thư, bệnh tái hẹp van tim, bệnh tim mạch, bệnh viêm mãn tính, bệnh tim mạch vành, bệnh xơ hóa nang, rối loạn thoái hóa gan, bệnh tiểu đường, bệnh eczema, rối loạn đường tiêu hóa, bệnh tim, bệnh triaxylglyxerol cao, bệnh tăng huyết áp, bệnh bệnh tăng động, bệnh miễn dịch, ức chế sinh trưởng u, các bệnh viêm, các rối loạn đường ruột, rối loạn chức năng thận, bệnh bạch cầu, bệnh trầm cảm trầm trọng, bệnh đa xơ cứng, rối loạn thoái hóa thần kinh, bệnh viêm xương khớp, bệnh loãng xương, rối loạn peroxisom, tiền sản giật, đẻ non, bệnh vảy nến, rối loạn phổi, bệnh viêm khớp dạng thấp, nguy cơ bị bệnh tim, hoặc chứng huyết khối.

Theo một số phương án, chế phẩm này được sử dụng để làm tăng độ dài của thai kỳ của bào thai ở kỳ ba tháng thứ ba.

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

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

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

Chế phẩm hoặc dạng liều này có thể được sử dụng trong cơ thể của đối tượng bằng đường bất kỳ thích hợp với chế phẩm hoặc dạng liều này. Hợp chất được xem là "được sử dụng" nếu hợp chất này được đưa vào cơ thể của đối tượng bởi đối tượng này hoặc nếu người khác, máy, hoặc thiết bị đưa hợp chất này vào cơ thể của đối tượng. Do đó, "việc sử dụng" bao gồm, ví dụ tự sử dụng, sử dụng bởi người khác, và sử dụng gián tiếp. Thuật ngữ "liên tục" hoặc "liên tiếp", như được sử dụng ở đây khi đề cập đến "sử dụng" có nghĩa là tần số sử dụng ít nhất là một lần một ngày. Tuy nhiên, chú ý là tần số sử dụng có thể nhiều hơn một lần mỗi ngày và vẫn là "liên tục" hoặc "liên tiếp", ví dụ, hai hoặc thậm chí là 3 lần mỗi ngày, miễn là mức liều như được xác định ở đây không bị vượt quá. Phương tiện và phương pháp sử dụng này đã được biết trong lĩnh vực này và chuyên gia có thể đề cập đến nhiều tài liệu tham khảo được lý về hướng dẫn. Ví dụ, "Modern Pharmaceutics," Banker & Rhodes, Infh hoặc ma Healthcare, USA, 4th ed. (2002); and "Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics," McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 10th ed. (2001) có thể được tham khảo.

Thuật ngữ "đối tượng", "cá nhân" hoặc "bệnh nhân" có nghĩa là đối tượng bất kỳ, dù là người hoặc động vật không phải là người, mà đối với đối tượng này việc chẩn đoán, tiên lượng bệnh, điều trị, hoặc sử dụng chế phẩm hoặc dạng liều này được mong muốn. Đối tượng là động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, người; động vật nuôi; động vật trang trại; động vật trong vườn thú; động vật trong thể thao; thú nuôi như chó, mèo, lợn guinea, thỏ, chuột cống, chuột nhắt, hoặc ngựa; linh trưởng như

khỉ (ví dụ, cebus, rhesus, African green, patas, cynomolgus, và cercopithecus), khỉ, đười ươi, khỉ đầu chó, vượn, và tinh tinh; động vật họ chó như chó và chó sói; động vật họ mèo như mèo, sư tử và hổ; động vật họ ngựa như ngựa, lừa và ngựa vằn; động vật lấy thịt như bò, gia súc, lợn, và cừu; động vật có móng guốc như hươu và hươu cao cổ; động vật gặm nhấm như chuột nhắt, chuột cống, hamster và lợn guinea; và v.v... Thuật ngữ đối tượng này cũng bao gồm động vật mô hình, ví dụ, động vật mô hình bệnh. Theo một số phương án, thuật ngữ đối tượng bao gồm các động vật có giá trị, về kinh tế hoặc nếu không là gia súc làm giống quan trọng về kinh tế, động vật đua, động vật biểu diễn, động vật heirloom, động vật hiếm hoặc bị nguy hiểm, hoặc động vật nuôi. Theo một số phương án, đối tượng này là người. Theo một số phương án, đối tượng này không phải là người.

Chế phẩm này có thể được sử dụng với “lượng dinh dưỡng”, “lượng có tác dụng điều trị”, “lượng có tác dụng phòng bệnh”, “liều chữa bệnh” hoặc “liều phòng bệnh”. “Lượng dinh dưỡng” dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở liều và trong khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả dinh dưỡng mong muốn. Kết quả dinh dưỡng có thể là, ví dụ, mức nồng độ của thành phần axit béo mong muốn tăng ở đối tượng. “Lượng có tác dụng điều trị” hoặc “liều điều trị” dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở liều và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Kết quả điều trị có thể là, ví dụ, làm giảm triệu chứng, kéo dài sự sống, cải thiện tính dễ biến đổi, và tương tự. Kết quả điều trị không cần phải là “chữa khỏi”. “Lượng có tác dụng phòng ngừa” hoặc “liều phòng ngừa” dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở liều và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả phòng ngừa mong muốn. Cụ thể là, vì liều phòng ngừa được sử dụng ở đối tượng trước hoặc ở giai đoạn sớm hơn của bệnh, lượng hữu hiệu để phòng ngừa

sẽ là ít hơn lượng hữu hiệu để chữa bệnh để điều trị giai đoạn tiến triển của bệnh.

Nhiều lượng liều khác nhau của chế phẩm này, dạng liều hoặc được phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng, dựa vào lượng EPA hoặc thành phần axit béo khác của vi sinh vật này, sinh khối, hoặc dầu vi sinh vật để sử dụng cho đối tượng này. Thuật ngữ “liều hàng ngày”, “mức liều hàng ngày” và “lượng liều hàng ngày” ở đây dùng để chỉ tổng lượng EPA hoặc thành phần axit béo khác được sử dụng mỗi ngày (mỗi khoảng thời gian 24 giờ). Vì vậy, ví dụ, việc sử dụng EPA cho đối tượng với liều hàng ngày 2mg nghĩa là đối tượng này nhận được tổng lượng 2mg EPA mỗi ngày, dù EPA được sử dụng ở dạng liều đơn chứa 2mg EPA, hoặc 4 dạng liều chứa 0,5mg EPA mỗi liều (để đạt được tổng lượng là 2mg EPA). Theo một số phương án, lượng EPA hàng ngày được sử dụng ở dạng liều đơn, hoặc ở hai dạng liều. Các dạng liều theo sáng chế có thể được sử dụng trong một lần hoặc nhiều lần. Ví dụ, nếu 4 viên nén được sử dụng hàng ngày, mỗi viên nén chứa 0,5 mg EPA, thì cả 4 viên nén có thể được sử dụng một lần mỗi ngày, hoặc 2 viên nén có thể được sử dụng 2 lần mỗi ngày, hoặc 1 viên nén có thể được sử dụng mỗi 6 giờ. Theo một số phương án, liều hàng ngày là khoảng 100mg đến khoảng 15g EPA. Theo một số phương án, liều hàng ngày là khoảng 0,5mg đến khoảng 250mg, khoảng 100mg đến khoảng 250mg, khoảng 100mg đến khoảng 500mg, khoảng 100mg đến khoảng 1g, khoảng 1g đến khoảng 2,5g, khoảng 1g đến khoảng 5g, khoảng 1g đến khoảng 10g, khoảng 1g đến khoảng 15g, khoảng 5g đến khoảng 10g, khoảng 5g đến khoảng 15g, khoảng 10g đến khoảng 15g, khoảng 100mg đến khoảng 10g, khoảng 100mg đến khoảng 5g, hoặc khoảng 100mg đến khoảng 2,5g EPA, DHA, hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, chế phẩm này là dạng liều chứa khoảng 0,5mg đến khoảng 250mg, 100mg đến khoảng 250mg, khoảng 0,5mg đến khoảng 500mg, khoảng 100mg đến

khoảng 500mg, khoảng 0,5mg đến khoảng 1g, hoặc khoảng 100mg đến khoảng 1g EPA, DHA, hoặc hỗn hợp của chúng trong mỗi dạng liều.

Việc sử dụng các chế phẩm hoặc dạng liều theo sáng chế có thể đạt được bằng cách sử dụng nhiều chế độ liều khác nhau. Ví dụ, Theo một số phương án, việc sử dụng được thực hiện hàng ngày vào các ngày liên tiếp, hoặc thực hiện hai ngày một lần. Việc sử dụng có thể được thực hiện vào một hoặc nhiều ngày.

Việc sử dụng chế phẩm và dạng liều này có thể được kết hợp với các chế độ khác được sử dụng để điều trị bệnh này. Ví dụ, phương pháp theo sáng chế có thể được kết hợp với chế độ ăn (ví dụ, thực đơn ít hydrat cacbon, thực đơn nhiều protein, thực đơn nhiều chất xơ, v.v...), chế độ tập thể dục, chế độ giảm cân, chế độ cai thuốc lá, hoặc kết hợp các chế độ này. Phương pháp theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với các dược phẩm khác trong quá trình điều trị bệnh này. Các chế phẩm hoặc dạng liều theo sáng chế có thể được sử dụng trước hoặc sau các chế độ hoặc dược phẩm khác.

Kit chứa các chế phẩm này

Sáng chế đề cập đến các kit hoặc gói chứa một hoặc nhiều đơn vị của chế phẩm theo sáng chế. Kit hoặc gói có thể bao gồm các đơn vị thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm hoặc chế phẩm công nghiệp chứa vi sinh vật, sinh khối, hoặc dầu vi sinh vật theo sáng chế, hoặc hỗn hợp của chúng. Kit hoặc gói cũng có thể bao gồm chất phụ gia chứa vi sinh vật, sinh khối hoặc dầu vi sinh vật theo sáng chế, hoặc hỗn hợp của chúng để sản xuất thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm, hoặc chế phẩm công nghiệp.

Theo một số phương án, kit hoặc gói này chứa một hoặc nhiều đơn vị dược phẩm để sử dụng theo các phương pháp theo sáng chế. Kit hoặc gói này có thể chứa một đơn vị liều hoặc nhiều hơn một đơn vị liều (nghĩa là,

nhiều đơn vị liều). Nếu nhiều đơn vị liều có trong kit hoặc gói này, nhiều đơn vị liều này có thể tùy ý được sắp xếp để sử dụng lần lượt.

Kit theo sáng chế có thể tùy ý chứa hướng dẫn sử dụng kèm theo các đơn vị hoặc dạng liều của kit này. Các hướng dẫn này có thể là ở dạng được quy định bởi tổ chức chính phủ điều hành việc sản xuất, sử dụng hoặc buôn bán dược phẩm, thông báo này thể hiện sự chấp thuận bởi cơ quan này về việc sản xuất, sử dụng, hoặc buôn bán để sử dụng cho người để điều trị bệnh hoặc rối loạn này. Các hướng dẫn này có thể là ở dạng bất kỳ mang thông tin về việc sử dụng các đơn vị hoặc dạng liều trong kit theo các phương pháp của sáng chế. Ví dụ, các hướng dẫn này có thể là ở dạng vật phẩm được in, hoặc ở dạng thiết bị truyền thông đã được ghi âm trước.

Trong quá trình kiểm tra bệnh nhân, nhân viên y tế có thể quyết định là việc sử dụng một trong số các phương pháp theo sáng chế là thích hợp cho bệnh nhân này, hoặc nhân viên này có thể xác định là tình trạng của bệnh nhân có thể được cải thiện nhờ việc sử dụng một trong số các phương pháp theo sáng chế. Trước khi kê đơn liệu trình bất kỳ, nhân viên y tế có thể hỏi ý kiến bệnh nhân, ví dụ, về nhiều nguy cơ và lợi ích khác nhau liên quan đến liệu trình này. Bệnh nhân này có thể được cung cấp mô tả đầy đủ về tất cả các nguy cơ đã biết và nghi ngờ liên qua đến liệu trình này. Việc hỏi ý kiến này có thể được thực hiện bằng miệng, cũng như dưới dạng văn bản. Theo một số phương án, nhân viên y tế có thể cung cấp cho bệnh nhân các tài liệu về liệu trình, như thông tin sản phẩm, tài liệu giáo dục, và tương tự.

Sáng chế đề cập đến các phương pháp giáo dục người sử dụng về phương pháp điều trị, phương pháp này bao gồm phân phối các dạng liều này cùng với thông tin sử dụng vào thời gian bán hàng. Theo một số phương án, việc phân phối sẽ xảy ra vào thời gian có dược sỹ hoặc nhân viên y tế.

Thuật ngữ “thông tin sử dụng” có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, văn bản bằng tiếng Anh, văn bản không bằng tiếng Anh, hình ảnh khả kiến, ghi âm điện thoại, website, và tiếp cận với nhân viên chăm sóc khách hàng. Theo một số phương án, thông tin sử dụng sẽ cung cấp các hướng dẫn về việc sử dụng các dạng liệu theo các phương pháp của sáng chế, tuổi sử dụng thích hợp, chỉ định, chống chỉ định, liều thích hợp, cảnh báo, số điện thoại và địa chỉ website. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm thêm cung cấp thông tin chuyên ngành cho người đảm nhận vai trò trả lời các câu hỏi của người sử dụng về việc sử dụng các liệu trình được mô tả theo các phương pháp của sáng chế. Thuật ngữ “thông tin chuyên ngành” bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thông tin liên quan đến liệu trình khi được sử dụng theo các phương pháp của sáng chế mà đã được thiết kế để cho phép nhân viên y tế trả lời các câu hỏi của khách hàng. “Nhân viên y tế”, bao gồm ví dụ, bác sỹ, trợ lý của bác sỹ, y tá, điều dưỡng, dược sỹ và nhân viên chăm sóc khách hàng.

Đã được mô tả trong sáng chế, có thể thu được các hiệu biết khác bằng cách tham khảo các ví dụ được cung cấp ở đây. Các ví dụ này chỉ là với mục đích tham khảo và không được dự định làm giới hạn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Trong ví dụ này, *Schizochytrium* sp. Được nuôi cấy trong bình thót cổ lắc Erlenmeyer 250ml chứa 50ml môi trường nuôi cấy. Chất chủng được điều chế trong cùng môi trường chứa 0,625g NaCl, 1,0g KCl, 5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,29g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0g mononatri glutamat monohydrat, 1,0g dịch chiết men bia, và 23,8g dung dịch đệm HEPES được hòa tan trong xấp xỉ 900ml nước cất. Môi trường này được tạo pH=7 bằng cách sử dụng NaOH. Thể tích cuối cùng của môi trường này

đạt 896ml, và môi trường này được tiệt trùng bằng nồi hấp. Sau khi hấp, các thành phần sau đây được bổ sung vô trùng vào môi trường này: 0,89ml KH_2PO_4 56,5g/l, 100ml glucoza 500g/l, 2ml dung dịch gốc kim loại vết, và 1ml dung dịch gốc vitamin. Dung dịch gốc kim loại vết này chứa các thành phần sau đây: 90g axit xitric, 5,15g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,55g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,965g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,02g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,035g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,035g $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ được hòa tan trong một lit nước cất và độ pH được điều chỉnh đến 2,5 bằng HCl. Dung dịch gốc vitamin chứa các thành phần sau đây: 0,16g vitamin B12, 9,75g thiamin, và 3,33g canxi pantothenat được hòa tan trong 1 lit nước cất. Bình thốt cổ lắc được chủng bằng 1ml chất chủng. Ba bình thốt cổ giống nhau được đặt vào máy ủ CO_2 được thiết lập để duy trì khí quyển 5, 10 hoặc 15% CO_2 trong không khí. Bộ 3 bình thốt cổ khác được đặt vào máy ủ ở mức nồng độ CO_2 môi trường xung quanh. Tất cả các bộ bình nón được lắc ở tốc độ 200 vòng/phút và tất cả các máy ủ được đặt ở 22,5°C. Sau 7 ngày phát triển, sinh khối được thu hoạch từ các bình thốt cổ lắc bằng cách ly tâm, sinh khối này được làm đông khô và profin axit béo của sinh khối được xác định bằng cách sử dụng các quy trình methyl este hóa chuẩn. Các mức nồng độ CO_2 tăng dần tạo ra các thay đổi đáng kể về sinh khối, % chất béo và profin axit béo. Đáng chú ý là thay đổi được tạo ra ở trị số % EPA và % DHA giữa các điều kiện CO_2 và các điều kiện môi trường xung quanh. Ngoài ra, các thay đổi về các axit béo này trở nên rõ ràng hơn khi mức nồng độ CO_2 tăng dần. Các kết quả này được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Mẫu	Sinh khối (g/l)	% 16:0	% EPA	% DHA	%chất béo
Môi trường xung quanh (1)	3,43	33,55	4,24	54,15	54,55
Môi trường	3,35	33,29	4,30	54,42	52,67

xung quanh (2)					
Môi trường xung quanh (3)	3,27	33,29	4,29	54,38	50,62
15%CO ₂ (1)	2,96	28,41	26,12	29,52	53,31
15%CO ₂ (2)	2,94	28,13	26,20	29,98	55,46
15%CO ₂ (3)	2,80	28,12	26,61	29,46	53,20
Môi trường xung quanh (1)	3,89	35,34	3,95	52,31	60,21
Môi trường xung quanh (2)	3,85	34,74	4,00	53,03	58,33
Môi trường xung quanh (3)	3,91	34,76	4,04	52,95	58,18
10%CO ₂ (1)	4,91	33,35	12,94	41,13	69,98
10%CO ₂ (2)	5,03	33,28	12,99	41,15	69,58
10%CO ₂ (3)	4,95	33,46	12,84	41,02	69,08
Môi trường xung quanh (1)	3,51	29,95	3,00	45,06	58,48
Môi trường xung quanh (2)	3,69	30,57	2,97	44,92	54,87
Môi trường xung quanh (3)	3,43	29,98	3,13	45,20	53,29
5%CO ₂ (1)	4,18	32,03	5,59	40,55	42,89
5%CO ₂ (2)	4,16	31,87	5,85	40,36	43,47
5%CO ₂ (3)	4,14	31,58	6,13	40,43	44,13

Ví dụ 2

Trong ví dụ này, *Schizochytrium* sp. được nuôi cấy trong các bình thốt cổ lắc Erlenmeyer 250ml chứa 50ml môi trường nuôi cấy. Chất chủng được tạo ra trong cùng một môi trường chứa 0,625g NaCl, 1,0g KCl, 5g MgSO₄.7H₂O, 0,1g (NH₄)₂SO₄, 0,29g CaCl₂.2H₂O, 1,0g mononatri glutamat monohydrat, 1,0g dịch chiết men bia, và 23,8g dung dịch đệm HEPES được hòa tan trong xấp xỉ 900ml nước cất. Môi trường này được điều chỉnh đến độ pH=7 bằng cách sử dụng NaOH. Thể tích cuối cùng của

môi trường này được điều chỉnh đến 896ml, và môi trường này được tiệt trùng bằng cách hấp. Sau khi hấp, các thành phần sau đây được bổ sung vô trùng vào môi trường này: 0,89ml KH_2PO_4 56,5g/l, 100ml glucoza 500g/l, 2ml dung dịch gốc vết kim loại, và 1ml dung dịch gốc vitamin. Dung dịch gốc vết kim loại chứa các thành phần sau: 90g axit xitric, 5,15g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,55g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,965g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,02g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,035g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,035g $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ được hòa tan trong 1l nước cất và độ pH được điều chỉnh đến 2,5 bằng HCl. Dung dịch gốc vitamin chứa các thành phần sau: 0,16g vitamin B12, 9,75g thiamin, và 3,33g canxi pantothenat được hòa tan trong 1l nước cất. Các bình thót cổ lắc được chủng bằng 1ml chất chủng. Bộ hai bình thót cổ được đặt vào máy ủ CO_2 set để duy trì khí quyển là 5, 10 hoặc 15% CO_2 trong không khí. Bộ hai bình thót cổ khác được đặt vào máy ủ ở mức CO_2 xung quanh. Tất cả các bộ bình thót cổ được lắc ở tốc độ 200 vòng/phút và tất cả các máy ủ được đặt ở 22,5°C. Sau 7 ngày phát triển, sinh khối được thu hoạch từ các bình thót cổ lắc bằng cách ly tâm, sinh khối này được làm đông khô và profin axit béo của sinh khối được xác định bằng cách sử dụng các quy trình metyl este hóa chuẩn. Các mức nồng độ CO_2 tăng dần tạo ra các thay đổi đáng kể về sinh khối, %chất béo và các profin axit béo. Đáng chú ý là thay đổi được tạo ra ở các trị số % EPA và % DHA giữa các điều kiện CO_2 và các điều kiện xung quanh. Ngoài ra, các thay đổi về các axit béo này trở nên rõ ràng hơn khi mức CO_2 tăng dần. Các kết quả này được cung cấp trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Mẫu	Sinh khối (g/l)	%16:0	% EPA	% DHA	% chất béo
Môi trường xung quanh (1)	5,81	28,22	3,88	58,69	60,86
Môi trường xung quanh (2)	6,03	26,54	3,89	60,87	66,74
15% CO ₂ (1)	4,38	14,67	36,12	35,84	62,44
15% CO ₂ (2)	4,44	14,31	36,09	36,59	63,00
10%CO ₂ (1)	5,36	21,44	19,88	46,40	64,94
10% CO ₂ (2)	5,63	21,39	19,88	46,74	65,82
5% CO ₂ (1)	6,40	24,71	11,56	54,04	77,16
5% CO ₂ (2)	6,33	24,62	11,74	54,36	67,94

Ví dụ 3

Trong ví dụ này, *Thrasutochytrium* sp. được nuôi cấy trong các bình thốt cổ lắc Erlenmeyer 250ml chứa 50ml môi trường nuôi cấy. Chất chủng được điều chế trong cùng một môi trường chứa 42g Na₂SO₄, 0,625g NaCl, 1,0g KCl, 5g MgSO₄·7H₂O, 0,1g (NH₄)₂SO₄, 0,29g CaCl₂·2H₂O, 1,0g mononatri glutamat monohydrat, 1,0g dịch chiết men bia, và 23,8g dung dịch đệm HEPES được hòa tan trong xấp xỉ 900ml nước cất. Môi trường này được điều chỉnh đến độ pH=7 bằng cách sử dụng NaOH. Thể tích cuối cùng của môi trường này được điều chỉnh đến 961ml, và môi trường này được tiệt trùng bằng nồi hấp. Sau khi hấp, các thành phần sau đây được bổ sung vô trùng vào môi trường này: 0,89ml KH₂PO₄ 56,5g/l, 35ml glyxerol 500g/l, 2ml dung dịch gốc vết kim loại, và 1ml dung dịch gốc vitamin. Dung dịch gốc vết kim loại chứa các thành phần sau: 9g axit xitric, 5,15g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,55g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,965g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,02g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,035g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,035g $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ được hòa tan trong 1l nước cất và độ pH được điều chỉnh đến 2,5 bằng HCl. Dung dịch gốc vitamin chứa các thành phần sau: 0,16g vitamin B12, 9,75g thiamin, và 3,33g canxi pantothenat được hòa tan trong 1l nước cất. Các bình thót cổ lắc được chủng bằng 1ml chất chủng. Bộ ba bình thót cổ được đặt vào máy ủ CO_2 để duy trì khí quyển 15% CO_2 trong không khí. Bộ ba bình thót cổ khác được đặt vào trong máy ủ ở mức nồng độ CO_2 môi trường xung quanh. Cả hai bộ bình thót cổ được lắc ở tốc độ 200 vòng/phút và cả hai máy ủ đều được đặt ở $22,^\circ\text{C}$. Sau 7 ngày phát triển, sinh khối được thu hoạch từ các bình thót cổ lắc bằng cách ly tâm, sinh khối này được làm đông khô, và profin axit béo của sinh khối được xác định bằng cách sử dụng các quy trình methyl este hóa chuẩn. Khí quyển 15% CO_2 trong không khí gây ra các thay đổi đáng kể trong môi trường nuôi cấy *Thraustochytrium*. Ở nồng độ CO_2 cao, sinh khối này và %chất béo là thấp hơn so với trong các điều kiện xung quanh. %16:0 và % DHA là thấp hơn và % EPA là lớn hơn đáng kể so với trong các điều kiện xung quanh. Các kết quả này được thể hiện trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Khí quyển		Sinh khối (g/l)	% 16:0	% EPA	% DHA	% Fat
Môi trường xung quanh (1)		3,39	31,74	11,61	44,65	53,32
Môi trường xung quanh (2)		3,42	30,88	11,95	44,99	53,30
Môi trường xung quanh (3)		3,39	32,13	11,46	44,19	53,93
15% CO_2 (1)		2,23	22,12	36,94	19,04	38,73
15% CO_2 (2)		2,05	21,40	37,14	18,57	39,34

15% CO ₂ (3)		2,11	21,68	36,83	18,52	40,86
-------------------------	--	------	-------	-------	-------	-------

Ví dụ 4

Trong ví dụ này [NBx0614et10], các chủng *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208) được nuôi cấy trong 4 thiết bị lên men New Brunswick Scientific BioFlo 6000 dung tích 100l ở thể tích đích cuối cùng (công thức) là 80l với quy trình lên men bổ sung cơ chất cacbon (glucoza) và nito (amoni hydroxit) ở nhiều điều kiện quá áp khác nhau để đánh giá độ nhạy cảm của môi trường nuôi cấy với cacbon dioxit hòa tan tăng dần. Mỗi mẻ lên men được chủng 8l môi trường nuôi cấy. Để truyền chất chủng, thiết bị lên men 80l New Brunswick Scientific BioFlo 5000 được sử dụng. Môi trường chủng chứa 65l môi trường đã được điều chế thành 6 nhóm riêng biệt. Nhóm 1 chứa 585g MSG*1H₂O, , 65g KCl, 325g MgSO₄*7H₂O, 24,05g (NH₄)₂SO₄, 40,625g NaCl, 390g T154 (dịch chiết men bia), và 13ml Dow 1520US (chống tạo bọt). Nhóm 1 được tiệt trùng theo mẻ ở 121 độ trong thiết bị lên men chất chủng ở thể tích xấp xỉ 60 lit. Nhóm 2 chứa 18,85g CaCl₂*2H₂O. Nhóm 3 chứa 33,8g KH₂PO₄. Mỗi nhóm 2 và 3 được hấp trong nồi trong các dung dịch riêng biệt trong xấp xỉ 45-60 phút và được bổ sung vào nhóm 1 sau khi tiệt trùng vô khuẩn. Nhóm 4 chứa 201,5 mg MnCl₂*4H₂O, 201,5mg ZnSO₄*7H₂O, 2,6mg CoCl₂*6H₂O, 2,6mg Na₂MoO₄*2H₂O, 134,6mg CuSO₄*5H₂O, 134,6mg NiSO₄*6H₂O, 669,4mg FeSO₄*7H₂O và 1,522g axit xitric. Nhóm 4 được hấp trong nồi theo cùng một cách như nhóm 2 và 3. Nhóm 5 chứa 633,75mg Thiamin-HCl, 10,4mg vitamin B12, và 216,5mg muối hemi-canxi của axit pantothenic. Nhóm 5 được hòa tan trong nước RO và sau đó được lọc tiệt trùng. Nhóm 6 chứa 3250g glucoza được hòa tan trong thể tích 3000ml nước RO. Sau khi thiết bị lên men chất chủng được làm mát đến 22,5 độ C, nhóm 2, 3, 4, 5, và 6 được bổ sung vào thiết bị lên men.

Bằng cách sử dụng natri hydroxit và axit sulfuric, thiết bị lên men này được điều chỉnh độ pH đến 7 và nồng độ oxy hòa tan được mở rộng đến 100% trước khi chủng. Thiết bị lên men chất chủng được chủng bằng 1300ml môi trường nuôi cấy lên men nhỏ hơn (môi trường nuôi cấy lên men nhỏ hơn được điều chế và nuôi cấy theo cách giống như môi trường nuôi cấy chất chủng 65l) và được nuôi cấy ở 22,5 độ C, độ pH=7, tốc độ khuấy 180 vòng/phút, và 32,5lpm không khí trong thời gian 37 giờ, trong thời gian này, 8 lit canh thang chất chủng được chuyển vào mỗi thiết bị lên men 100l. Mỗi thiết bị lên men 100l chứa 80l môi trường lên men. Môi trường lên men được điều chế theo cách giống như với thiết bị lên men chất chủng. Với mỗi thiết bị lên men 100l, môi trường lên men chứa 6 nhóm môi trường theo mẻ. Với các bình NB5, NB6, và NB7, nhóm 1 chứa 704g Na_2SO_4 , 50g NaCl , 80g KCl , 400g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 33,6g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 80g T154 dịch chiết men bia, và 8ml chất chống tạo bọt Dow 1520-US. Nhóm 1 được tiệt trùng bằng hơi nước ở 122 độ C trong 60 phút trong thiết bị lên men 100l ở thể tích xấp xỉ 35 lit. Nhóm 2 chứa 23,2g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ trong thể tích xấp xỉ 300ml. Nhóm 3 chứa 141,2g KH_2PO_4 được hòa tan trong nước RO. Nhóm 4 chứa 248mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 744mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,2mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 165,6mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, và 165,6mg $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 824mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 80g axit xitric, tất cả được hòa tan trong nước RO. Nhóm 5 chứa 780mg Thiamin-HCl, 266,4mg muối hemi-canxi của axit pantothenic, và 286,4ug biotin, tất cả được hòa tan và được lọc tiệt trùng trong nước RO. Nhóm 6 chứa 2400g glucoza trong xấp xỉ 3l nước RO. Các nhóm 2, 3, 4, 5, và 6 được kết hợp và được bổ sung vào thiết bị lên men sau khi thiết bị lên men này đạt tới nhiệt độ vận hành là 22,5 độ C. Với bình NB8, tất cả các nhóm đều giống như 3 điều kiện còn lại ngoại trừ axit xitric. Trong NB8, nhóm 4 chỉ chứa ~3,75g axit xitric. Mỗi thể tích thiết bị lên men trước khi chủng xấp xỉ là 52-53 lit.

Mỗi thiết bị lên men được chủng 8l canh thang từ thiết bị lên men chất chủng đã mô tả trên đây. Việc lên men được kiểm soát độ pH bằng cách sử dụng 7,3l dung dịch amoni hydroxit 4N ở độ pH=7 đến khi cạn kiệt nitơ, trong thời gian đó natri hydroxit 4N và axit sulfuric 4N được sử dụng để kiểm soát độ pH. Oxy hòa tan được kiểm soát để duy trì nồng độ đích là 20% trong toàn bộ quá trình lên men bằng cách khuấy với tốc độ từ 180 đến 480 vòng/phút và dòng khí từ 40LPM đến 80LPM. Mỗi bình này được kiểm soát ở áp suất cột nước khác nhau (NB5=2, NB6=15, và NB7=20 PSI) để đánh giá độ nhạy cảm của vi sinh vật với nồng độ cacbon dioxit tăng dần. Trong toàn bộ quá trình lên men, dung dịch 850g/l chứa 95% dextroza (riro ngô) được nạp và để duy trì nồng độ glucoza thấp hơn 50g/l. Sau 8 ngày, khối lượng tế bào khô và hiệu giá omega-3 của mỗi thiết bị lên men 80-lit là giống như NB5 ở 110,1g/l DCW và 44,37g/l omega-3; NB6 ở 117,7g/l DCW và 45,78g/l omega-3; NB7 ở 114,1g/l DCW và 48,43g/l omega-3; NB8 ở 119,5g/L DCW và 43,55g/l omega-3. Khi áp suất này được gia tăng, % DHA/FAME giảm, % EPA/FAME giảm, và tỉ lệ của DHA so với EPA giảm. Khi so sánh hàm lượng axit béo cuối cùng của 2 PSI so với 20 PSI, % DHA/FAME giảm từ 50,48% xuống 41,26% và % EPA/FAME tăng từ 18,95% đến 23,28%. Các kết quả được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7

% EPA/FAME				
Giờ	NB5 (2 PSI)	NB6 (15 PSI)	NB7 (20 PSI)	NB8 (20 PSI)
17,5	12,63	13,43	13,15	14,32
41,5	12,05	12,01	11,54	16,37
65,5	14,03	16,54	15,34	20,37
89,5	18,67	20,04	20,86	23,08
116,5	21,99	21,40	24,55	24,52

139,0	21,24	21,57	25,85	25,25
161,5	19,95	20,42	24,78	24,96
185,5	18,95	18,89	23,28	23,90

% DHA/FAME				
Giờ	NB5 (2 PSI)	NB6 (15 PSI)	NB7 (20 PSI)	NB8 (20 PSI)
17,5	48,66	52,94	52,56	49,15
41,5	52,62	52,38	52,98	43,43
65,5	45,69	41,45	44,05	35,17
89,5	40,35	39,22	34,81	31,87
116,5	42,26	39,77	34,14	32,42
139,0	45,70	41,83	34,92	33,31
161,5	48,55	44,96	38,09	35,65
185,5	50,48	47,52	41,26	38,38

Tỉ lệ DHA:EPA				
Giờ	NB5 (2 PSI)	NB6 (15 PSI)	NB7 (20 PSI)	NB8 (20 PSI)
17,5	3,85	3,94	4,00	3,43
41,5	4,37	4,36	4,59	2,65
65,5	3,26	2,51	2,87	1,73
89,5	2,16	1,96	1,67	1,38
116,5	1,92	1,86	1,39	1,32
139,0	2,15	1,94	1,35	1,32
161,5	2,43	2,20	1,54	1,43
185,5	2,66	2,52	1,77	1,61

Ví dụ 5

Trong ví dụ này [Nx0719et10], các chủng *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208) được nuôi cấy trong 4 thiết bị lên men 14l New Brunswick Scientific BioFlo 310 ở thể tích đích cuối cùng (công thức) là 10l với quy

trình lên men bổ sung cơ chất cacbon (glucoza) và nitơ (amoni hydroxit). Ba trong bốn thiết bị lên men được bổ sung cacbon dioxit ở các thời điểm khác nhau trong quá trình lên men để đánh giá độ nhạy cảm của môi trường nuôi cấy với nồng độ cacbon dioxit hòa tan tăng dần. NBS1, NBS2, và NBS3 được bổ sung cacbon dioxit bắt đầu ở giờ log lần lượt là 12, 24, và 48. Mỗi mẻ lên men được chủng bằng 1l mỗi môi trường nuôi cấy. Để truyền chất chủng, thiết bị lên men Virtis 14l được sử dụng. Môi trường chất chủng chứa 10l môi trường được điều chế thành 4 nhóm riêng biệt. Nhóm 1 chứa 90g $\text{MSG} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10g KCl, 50g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,3g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6,25g NaCl, 60g T154 (dịch chiết men bia), 4,97g KH_2PO_4 , 2,9g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, và 2ml Dow 1520US (chất chống tạo bọt). Nhóm 1 được hấp ở 121 độ trong 120 phút ở thể tích xấp xỉ 9,8l. Nhóm 2 chứa 500g glucoza được hòa tan trong thể tích 800ml nước RO. Nhóm 3 chứa 31mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 31mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20,7mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20,7mg $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 103mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 234,1mg axit xitric. Mỗi nhóm 2 và 3 được hấp trong 60 phút. Nhóm 4 chứa 97,5mg Thiamin-HCl, 1,6mg vitamin B12, và 33,3mg muối hemi-canxi của axit pantothenic. Nhóm 4 được hòa tan trong nước RO và sau đó được lọc tiệt trùng. Sau khi thiết bị lên men được làm mát đến 22,5 độ C, các nhóm 2, 3, 4, và 5 được bổ sung vào thiết bị lên men. Bằng cách sử dụng natri hydroxit và axit sulfuric, thiết bị lên men được điều chỉnh độ pH đến 7 và oxy hòa tan được mở rộng đến 100% trước khi chủng. Thiết bị lên men chất chủng được chủng bằng 150ml môi trường nuôi cấy nhỏ hơn (môi trường nuôi cấy nhỏ hơn được điều chế và được nuôi cấy theo cách giống như môi trường nuôi cấy chất chủng 10l) và được nuôi cấy ở 22,5 độ C, độ pH=7, tốc độ khuấy 433 vòng/phút, và 5lpm không khí trong khoảng thời gian 44,5 giờ, trong thời gian này 1 lit canh thang chất chủng được chuyển vào mỗi thiết bị lên men 14l. Mỗi thiết bị

lên men 14l chứa 10l môi trường lên men. Môi trường lên men này được điều chế theo cách giống như thiết bị lên men chất chủng. Đối với mỗi thiết bị lên men 14l, môi trường lên men chứa 6 nhóm môi trường theo mẻ. Với tất cả các bình, nhóm 1 chứa 60g Na_2SO_4 , 6,25g NaCl , 10g KCl , 50g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,43g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10g T154 dịch chiết men bia, và 1ml chất tạo bọt Dow 1520-US. Nhóm 1 được hấp trong nồi ở 121 độ C trong 120 phút trong các thiết bị lên men 14l ở thể tích xấp xỉ 6,5 lit. Nhóm 2 chứa 2,9g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ở thể tích xấp xỉ là 20ml nước RO. Nhóm 3 chứa 17,1g KH_2PO_4 được hòa tan trong 100ml nước RO. Nhóm 4 chứa 31mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 93mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20,7mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20,7mg $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 103mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 10g axit xitric, tất cả được hòa tan trong 50ml nước RO. Nhóm 5 chứa 97,5mg Thiamin-HCl, 33,3mg muối hemi-canxi của axit pantothenic, và 36,3ug biotin, tất cả được hòa tan và lọc tiệt trùng trong 10ml nước RO. Nhóm 6 chứa 300g glucoza trong xấp xỉ 0,5l nước RO. Các nhóm 2, 3, 4, 5, và 6 được kết hợp và được bổ sung vào thiết bị lên men sau khi thiết bị lên men này đạt đến nhiệt độ vận hành là 22,5 độ C. Mỗi thể tích thiết bị lên men trước khi chủng xấp xỉ là 6,5 lit. Mỗi thiết bị lên men được chủng bằng 1l canh thang từ mẻ nuôi cấy chất chủng đã mô tả trên đây. Việc lên men được kiểm soát độ pH bằng cách sử dụng 0,85 l dung dịch amoni hydroxit 4N ở độ pH=7 đến khi cạn nitơ, trong thời gian đó natri hydroxit 4N và axit sulfuric 3N được sử dụng để kiểm soát độ pH ở điểm thiết lập là 7,5. Oxy hòa tan được kiểm soát để duy trì nồng độ đích là 20% trong toàn bộ quá trình lên men bằng cách sử dụng máy khuấy với tốc độ từ 357 đến 833 vòng/phút và dòng khí từ 7LPM đến 7LPM. Mỗi bình NBS1, NBS2, NBS3 được bổ sung cacbon dioxid trong các khoảng thời gian khác nhau để đánh giá độ nhạy cảm của vi sinh vật với nồng độ cacbon dioxid hòa tan tăng dần. Trong toàn bộ quá trình lên men, dung dịch 850g/l chứa 95% dextroza

(siro ngô) được nạp vào để duy trì nồng độ glucoza thấp hơn 50g/l. Sau 8 ngày, khối lượng tế bào khô và hiệu giá omega-3 của mỗi thiết bị lên men 10l thay đổi phụ thuộc vào các điều kiện bổ sung cacbon dioxit. Ở thời điểm 183 giờ, NBS1 là ở nồng độ 109,1g/l DCW và 45,87g/l omega-3; NBS1 là ở 108,9g/l DCW và 45,41g/l omega-3; NBS3 là ở 116,4g/l DCW và 50,6g/l omega-3; NBS4 là ở 95,7g/l DCW và 40,36g/l omega-3. Ngay sau khi việc bổ sung cacbon dioxit bắt đầu, % DHA/FAME giảm, % EPA/FAME tăng, và tỉ lệ DHA so với EPA giảm. Khi so sánh hàm lượng % EPA/FAME tối đa của các điều kiện được bổ sung cacbon dioxit với điều kiện xung quanh, có sự gia tăng 65% về hàm lượng EPA tối đa trong các điều kiện bổ sung CO₂. Các kết quả được trình bày trong bảng 8.

Bảng 8

% EPA/FAME				
Giờ	NBS1 (+CO ₂ @12 giờ)	NBS2 (+CO ₂ @24 giờ)	NBS3 (+CO ₂ @48 giờ)	NBS4 (không bổ sung CO ₂)
15	12,29	10,67	10,22	10,14
39	22,82	19,32	10,37	9,85
63	23,79	24,58	19,77	15,09
87	23,69	23,71	23,83	14,09
114	27,85	27,55	26,91	16,98
137	29,47	27,94	26,76	17,81
159	29,13	27,20	26,52	17,81
183	27,62	25,50	25,62	17,09

% DHA/FAME				
Giờ	NBS1 (+CO ₂ @12 giờ)	NBS2 (+CO ₂ @24 giờ)	NBS3 (+CO ₂ @48 giờ)	NBS4 (không bổ sung CO ₂)
15	43,27	44,69	46,34	45,91

39	33,34	43,14	39,54	38,81
63	32,18	33,65	36,22	47,31
87	26,33	26,65	27,82	45,79
114	23,99	24,36	28,09	44,13
137	25,43	27,47	31,11	46,47
159	28,54	30,59	33,70	48,59
183	31,83	33,70	35,98	50,98

Tỉ lệ DHA:EPA				
Giờ	NBS1	NBS2	NBS3	NBS4
15	3,52	4,19	4,53	4,53
39	1,46	2,23	3,81	3,94
63	1,35	1,37	1,83	3,14
87	1,11	1,12	1,17	3,25
114	0,86	0,88	1,04	2,60
137	0,86	0,98	1,16	2,61
159	0,98	1,12	1,27	2,73
183	1,15	1,32	1,40	2,98

Cacbon dioxit được bổ sung vào trong các khung được đánh dấu

Ví dụ 6

Trong ví dụ này [Nx0106et10], chủng *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208) được nuôi cấy trong bốn thiết bị lên men New Brunswick Scientific BioFlo 310 14l ở thể tích đích cuối cùng (công thức) là 10l với quy trình lên men có bổ sung cơ chất cacbon (glucoza) và nitơ (amoni hydroxit). Nhiệt độ được kiểm soát trong suốt quá trình lên men để duy trì đích là 21,0°C, 22,5°C, 24,0°C, và 25,5°C lần lượt đối với NBS1, NBS2, NBS3, và NBS4. Mỗi mẻ lên men được chủng bằng 1l môi trường nuôi cấy. Để truyền chất chủng, thiết bị lên men Virtis 14l được sử dụng. Môi trường chất chủng chứa 10l môi trường được điều chế thành 4 nhóm riêng biệt.

Nhóm 1 chứa 90g $\text{MSG} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10g KCl , 50g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,7g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6,25g NaCl , 60g T154 (dịch chiết men bia), 5,2g KH_2PO_4 , 2,9g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, và 2ml Dow 1520US (chống tạo bọt). Nhóm 1 được hấp ở 121 độ trong 120 phút ở thể tích xấp xỉ 9,8 lit. Nhóm 2 chứa 500g glucoza được hòa tan trong thể tích 800ml nước RO. Nhóm 3 chứa 31mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 31mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20,7mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20,7mg $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 103mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 234,1mg axit xitric. Mỗi nhóm 2 và 3 được hấp trong 60 phút. Nhóm 4 chứa 97,5mg Thiamin-HCl, 1,6mg vitamin B12, và 33,3mg muối hemi-canxi của axit pantothenic. Nhóm 4 được hòa tan trong nước RO và sau đó được lọc tiệt trùng. Sau khi thiết bị lên men được làm mát đến 22,5 độ C, các nhóm 2, 3, 4, và 5 được bổ sung vào thiết bị lên men. Bằng cách sử dụng natri hydroxit và axit sulfuric, thiết bị lên men này được điều chỉnh độ pH đến 7 và oxy hòa tan được mở rộng đến 100% trước khi chủng. Thiết bị lên men chất chủng được chủng bằng 200ml môi trường lên men nhỏ hơn (môi trường lên men nhỏ hơn được điều chế và được nuôi cấy theo cách giống như môi trường chất chủng 10l) và được nuôi cấy ở 22,5 độ C, độ pH=7, tốc độ khuấy 433 vòng/phút, và 5lpm không khí trong khoảng thời gian 42 giờ, trong thời gian này 1 lit canh thang chất chủng được chuyển vào mỗi thiết bị lên men 14l. Mỗi thiết bị lên men 14l chứa 10l môi trường lên men. Môi trường lên men được điều chế theo cách giống như thiết bị lên men chất chủng. Đối với mỗi thiết bị lên men 14l, môi trường lên men này bao gồm 4 nhóm môi trường theo mẻ. Đối với tất cả các bình, nhóm 1 chứa 88g Na_2SO_4 , 6,25g NaCl , 10g KCl , 50g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,2g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,9g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 17,65g KH_2PO_4 , 10g dịch chiết men bia T154, và 1ml chất chống tạo bọt Dow 1520-US. Nhóm 1 được hấp ở 121 độ C trong 120 phút trong thiết bị lên men 14l ở thể tích xấp xỉ 7,0 lit. Nhóm 2 chứa 31mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 93mg

ZnSO₄*7H₂O, 0,4mg Na₂MoO₄*2H₂O, 20,7mg CuSO₄*5H₂O, 20,7mg NiSO₄*6H₂O, 103mg FeSO₄*7H₂O và 468mg axit xitric được hòa tan trong 50ml nước RO. Nhóm 2 được hấp trong 60 phút. Nhóm 3 chứa 97,5mg Thiamin-HCl, 33,3mg muối hemi-canxi của axit pantothenic, và 35,8ug biotin, tất cả được hòa tan và được lọc tiệt trùng trong 10ml nước RO. Nhóm 4 chứa 300g glucoza trong xấp xỉ 0,5 lit nước RO và được hấp trong 60 phút. Các nhóm 2, 3, và 4 được kết hợp và được bổ sung vào thiết bị lên men sau khi thiết bị lên men này đạt tới nhiệt độ vận hành là 22,5 độ C. Mỗi thể tích thiết bị lên men trước khi chủng xấp xỉ là 6,5l. Mỗi thiết bị lên men được chủng bằng 1l canh thang từ quá trình lên men chất chủng đã mô tả trên đây. Quá trình lên men được kiểm soát độ pH ở 7,0 trong toàn bộ quá trình bằng cách sử dụng 0,85 lit dung dịch amoni hydroxit 4N đến khi kiệt nitơ, trong khoảng thời gian đó natri hydroxit 4N và axit sulfuric 3N được sử dụng để kiểm soát độ pH ở điểm đặt. Oxy hòa tan được kiểm soát để duy trì nồng độ đích là 20% đến khi kiệt nitơ. Sau khi kiệt nitơ, oxy hòa tan được kiểm soát để duy trì nồng độ đích là 10% đến khi kết thúc quá trình lên men bằng cách sử dụng tốc độ khuấy từ 357 đến 714 vòng/phút và 8LPM dòng khí. Trong toàn bộ quá trình lên men, dung dịch 850g/l chứa 95% dextroza (siro ngô) được nạp vào để duy trì nồng độ glucoza thấp hơn 50g/l. Sau 8 ngày, khối lượng tế bào khô hoặc hiệu giá omega-3 thay đổi nhẹ đối với các nhiệt độ khác nhau được đánh giá; tuy nhiên, các nhiệt độ lên men thấp hơn tạo ra % EPA/FAME lớn hơn. Ở 184 giờ, NBS1 là ở 85,2g/l DCW và 29,9g/l omega-3; NBS2 là ở 92,0g/l DCW và 35,0g/l omega-3; NBS3 là ở 86,8g/l DCW và 31,7g/l omega-3; NBS4 là ở 84,2g/l DCW và 29,4g/l omega-3.

Đối với NBS1, % EPA/FAME nằm trong khoảng từ 12,36% đến 19,02% từ lúc bắt đầu đến khi kết thúc quá trình lên men với trị số tối đa là 21,57%. Đối với NBS2, % EPA/FAME nằm trong khoảng từ 11,72% đến

18,11% từ lúc bắt đầu đến khi kết thúc quá trình lên men với trị số tối đa là 20,21%. Đối với NBS3, % EPA/FAME nằm trong khoảng từ 11,49% đến 15,43% từ lúc bắt đầu đến khi kết thúc quá trình lên men với trị số tối đa là 18,09%. Đối với NBS4, % EPA/FAME nằm trong khoảng từ 11,65% đến 13,65% từ lúc bắt đầu đến khi kết thúc quá trình lên men với trị số tối đa là 15,70%. Khi so sánh % EPA/FAME tối đa, nhiệt độ lên men thấp nhất gây ra sự tăng 37% về hàm lượng EPA tối đa so với nhiệt độ lên men cao nhất đo được. Các kết quả được cung cấp trong bảng 9 dưới đây.

Bảng 9

% EPA / FAME				
Giờ	NBS1 (21°C)	NBS2 (22,5°C)	NBS3 (24°C)	NBS4 (25,5°C)
24	12,36	11,72	11,49	11,65
40	14,17	13,61	12,21	13,04
64	14,48	14,94	14,23	13,62
89	19,52	18,45	17,42	15,70
112	21,57	20,21	18,09	15,69
136	21,05	20,11	17,15	14,82
160	19,90	18,88	16,15	13,98
184	19,02	18,11	15,43	13,65

% DHA / FAME				
Giờ	NBS1 (21°C)	NBS2 (22,5°C)	NBS3 (24°C)	NBS4 (25,5°C)
24	56,58	55,61	54,62	53,56
40	52,80	51,58	52,17	49,77
64	47,46	45,36	46,41	44,57
89	38,89	39,69	39,46	39,54
112	40,08	40,89	41,72	42,20
136	43,22	43,87	45,23	45,56
160	45,92	46,98	47,80	48,07
184	48,04	48,99	49,38	49,39

Tỉ lệ DHA:EPA				
Giờ	NBS1 (21°C)	NBS2 (22,5°C)	NBS3 (24°C)	NBS4 (25,5°C)
24	4,58	4,75	4,75	4,60
40	3,73	3,79	4,27	3,82
64	3,28	3,04	3,26	3,27
89	1,99	2,15	2,27	2,52
112	1,86	2,02	2,31	2,69
136	2,05	2,18	2,64	3,07
160	2,31	2,49	2,96	3,44
184	2,53	2,71	3,20	3,62

Ví dụ 7

Trong ví dụ này [Nx0614et10], các chủng *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208) được nuôi cấy trong hai thiết bị lên men 14-lit New Brunswick Scientific BioFlo 310 ở thể tích đích cuối cùng (công thức) là 10l với quy trình lên men bổ sung cơ chất cacbon (glucoza) và nitơ (amoni hydroxit). Một thiết bị lên men (NBS15) được vảy nước kèm theo bổ sung không khí với 15% cacbon dioxit từ khi khởi đầu đến khi kết thúc quá trình lên men và thiết bị lên men còn lại (NBS17) được vảy nước chỉ kèm theo không khí để đánh giá độ nhạy cảm của môi trường nuôi cấy với nồng độ cacbon dioxit hòa tan tăng dần. Mỗi mẻ lên men được chủng bằng 1l môi trường nuôi cấy. Để truyền chất chủng, thiết bị lên men 14 lit Virtis được sử dụng. Môi trường chất chủng chứa 10l môi trường được điều chế thành 4 nhóm riêng biệt. Nhóm 1 chứa 90g MSG*1H₂O, 10g KCl, 50g MgSO₄*7H₂O, 3,3g (NH₄)₂SO₄, 6,25g NaCl, 60g T154 (dịch chiết men bia), 4,97g KH₂PO₄, 2,9g CaCl₂*2H₂O, và 2ml Dow 1520US (chống tạo bọt). Nhóm 1 được hấp ở 121 độ trong 120 phút ở thể tích xấp xỉ 9,8 lit. Nhóm 2 chứa 500g glucoza được hòa tan trong thể tích 800ml nước RO. Nhóm 3 chứa 31mg MnCl₂*4H₂O, 31mg ZnSO₄*7H₂O, 0,4mg

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20,7mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20,7mg $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 103mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 234,1mg axit xitric. Mỗi nhóm 2 và 3 được hấp trong 60 phút. Nhóm 4 chứa 97,5mg Thiamin-HCl, 1,6mg vitamin B12, và 33,3mg muối hemi-canxi của axit pantothenic. Nhóm 4 được hòa tan trong nước RO và sau đó được lọc tiệt trùng. Sau khi thiết bị lên men được làm mát đến 22,5 độ C, các nhóm 2, 3, 4, và 5 được bổ sung vào thiết bị lên men. Bằng cách sử dụng natri hydroxit và axit sulfuric, thiết bị lên men này được điều chỉnh độ pH đến 7 và oxy hòa tan được mở rộng đến 100% trước khi chủng. Thiết bị lên men chất chủng được chủng bằng 200ml môi trường lên men nhỏ hơn (môi trường lên men nhỏ hơn được điều chế và nuôi cấy theo cách giống như môi trường chất chủng 10l) và được nuôi cấy ở 22,5 độ C, độ pH=7, tốc độ khuấy 433 vòng/phút, và 5lpm không khí trong khoảng thời gian 40 giờ, trong thời gian này 1 lit canh thang chất chủng được chuyển vào mỗi thiết bị lên men 14l. Mỗi thiết bị lên men 14l chứa 10 môi trường lên men. Môi trường lên men này được điều chế theo cách giống như thiết bị lên men chất chủng. Đối với mỗi thiết bị lên men 14l, môi trường lên men này chứa 6 nhóm môi trường theo mẻ. Đối với tất cả các bình, nhóm 1 chứa 88g Na_2SO_4 , 6,25g NaCl, 10g KCl, 50g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,2g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10g dịch chiết men bia T154, và 1ml chất chống tạo bọt Dow 1520-US. Nhóm 1 được hấp ở 121 độ C trong 120 phút trong các thiết bị lên men 14l ở thể tích xấp xỉ 6,5lit. Nhóm 2 chứa 2,9g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ở thể tích xấp xỉ 20ml nước RO. Nhóm 3 chứa 17,65g KH_2PO_4 hòa tan trong 100ml nước RO. Nhóm 4 chứa 31mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 93mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20,7mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20,7mg $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 103mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 468mg axit xitric hòa tan trong 50ml nước RO. Mỗi nhóm 2, 3, và 4 được hấp trong 60 phút. Nhóm 5 chứa 97,5mg Thiamin-HCl, 33,3mg muối hemi-canxi của axit pantothenic, và 36,3ug biotin, tất cả được hòa tan và được

lọc tiệt trùng trong 10ml nước RO. Nhóm 6 chứa 300g glucoza trong xấp xỉ 0,5 lit nước RO và được hấp trong 60 phút. Các nhóm 2, 3, 4, 5, và 6 được kết hợp và được bổ sung vào thiết bị lên men sau khi thiết bị lên men này đạt tới nhiệt độ vận hành là 22,5 độ C. Mỗi thể tích thiết bị lên men trước khi chủng xấp xỉ là 6,5l. Mỗi thiết bị lên men được chủng bằng 11 canh thang từ mẻ lên men chất chủng đã mô tả trên đây. Việc lên men được kiểm soát độ pH ở 7,0 trong toàn bộ quá trình lên men bằng cách sử dụng 0,85l dung dịch chứa amoni hydroxit 4N đến khi kiệt nitơ, trong thời gian đó natri hydroxit 4N và axit sulfuric 3N được sử dụng để kiểm soát độ pH ở điểm đặt. Oxy hòa tan được kiểm soát để duy trì nồng độ đích là 20% đến khi kiệt nitơ. Sau khi kiệt nitơ, oxy hòa tan được kiểm soát để duy trì nồng độ đích là 10% đến khi kết thúc quá trình lên men bằng cách khuấy với tốc độ từ 357 đến 833 vòng/phút và 8LPM dòng khí. Trong quá trình lên men, dung dịch 850g/l chứa 95% dextroza (siro ngô) được nạp vào để duy trì nồng độ glucoza thấp hơn 50g/l. Sau 8 ngày, khối lượng tế bào khô và hiệu giá omega-3 của mỗi thiết bị lên men 10l thay đổi phụ thuộc vào các điều kiện bổ sung cacbon dioxit. Ở 188 giờ, NBS15 là ở 54,5g/l DCW và 13,7g/l omega-3; NBS17 là ở 96,1g/l DCW và 37,5g/l omega-3. % EPA/FAME là lớn hơn trong NBS15 (điều kiện được bổ sung CO₂ trong quá trình vận hành) so với NBS17 (không bổ sung CO₂). Đối với NBS15, % EPA/FAME nằm trong khoảng từ 25,50% đến 35,48% từ khi bắt đầu đến khi kết thúc quá trình lên men với trị số tối đa là 38,34%. Đối với NBS17, % EPA/FAME nằm trong khoảng từ 12,31% đến 19,80% từ khi bắt đầu đến khi kết thúc quá trình lên men với trị số tối đa là 22,29%. Khi so sánh hàm lượng % EPA/FAME tối đa của các điều kiện được bổ sung cacbon dioxit với điều kiện xung quanh, có sự gia tăng 73% về hàm lượng EPA tối đa trong các điều kiện được bổ sung CO₂.

% DHA/FAME đối với các điều kiện được bổ sung CO₂ là thấp hơn so với điều kiện xung quanh trong quá trình lên men. Các kết quả này được cung cấp trong bảng 10 dưới đây.

Bảng 10

% EPA / FAME				
Giờ	NBS1 (21°C)	NBS2 (22,5°C)	NBS3 (24°C)	NBS4 (25,5°C)
24	12,36	11,72	11,49	11,65
40	14,17	13,61	12,21	13,04
64	14,48	14,94	14,23	13,62
89	19,52	18,45	17,42	15,70
112	21,57	20,21	18,09	15,69
136	21,05	20,11	17,15	14,82
160	19,90	18,88	16,15	13,98
184	19,02	18,11	15,43	13,65

% DHA / FAME				
Giờ	NBS1 (21°C)	NBS2 (22,5°C)	NBS3 (24°C)	NBS4 (25,5°C)
24	56,58	55,61	54,62	53,56
40	52,80	51,58	52,17	49,77
64	47,46	45,36	46,41	44,57
89	38,89	39,69	39,46	39,54
112	40,08	40,89	41,72	42,20
136	43,22	43,87	45,23	45,56
160	45,92	46,98	47,80	48,07
184	48,04	48,99	49,38	49,39

Tỉ lệ DHA:EPA				
Giờ	NBS1 (21°C)	NBS2 (22,5°C)	NBS3 (24°C)	NBS4 (25,5°C)
24	4,58	4,75	4,75	4,60
40	3,73	3,79	4,27	3,82
64	3,28	3,04	3,26	3,27
89	1,99	2,15	2,27	2,52
112	1,86	2,02	2,31	2,69
136	2,05	2,18	2,64	3,07
160	2,31	2,49	2,96	3,44
184	2,53	2,71	3,20	3,62

Ví dụ 8

Trong ví dụ này [K019], các chủng *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208) được nuôi cấy trong thiết bị lên men 157,000l được khuấy ở khối lượng đích cuối cùng (công thức) là 100.000kg với quy trình lên men có bổ sung cơ chất cacbon (glucoza) và nitơ (khí amoni khan). Mẻ lên men được chủng bằng 4500kg môi trường nuôi cấy. Để truyền chất chủng, thiết bị lên men giống 7500l được khuấy được sử dụng. Môi trường chất chủng chứa 4500kg môi trường được điều chế thành 4 nhóm riêng biệt. Nhóm 1 chứa 40,5kg MSG*1H₂O, 4,5kg KCl, 22,5kg MgSO₄*7H₂O, 1,7kg (NH₄)₂SO₄, 2,81kg NaCl, 27kg T154 (dịch chiết men bia), 2kg KH₂PO₄, 985g CaCl₂, và 0,9kg Dow 1520US (chống tạo bọt) được hòa tan trong nước xử lý với tổng khối lượng là 2300kg. Nhóm 2 chứa 247,5kg glucoza.1H₂O được hòa tan trong nước xử lý với tổng khối lượng là 1500kg. Nhóm 1 được tiệt trùng trong thiết bị lên men giống, và nhóm 2 được tiệt trùng trong bình riêng biệt, với with steam-in-place ở 122-123 độ C trong 30 phút. Nhóm 3 chứa 14g MnCl₂*4H₂O, 14g ZnSO₄*7H₂O, 180mg CoCl₂*6H₂O, 180mg Na₂MoO₄*2H₂O, 9,3g CuSO₄*5H₂O, 9,3g NiSO₄*6H₂O, 46,4g FeSO₄*7H₂O và 105,3g axit xitric hòa tan trong 5l

nước cất. Nhóm 3 được hấp ở 121 độ C trong 60 phút. Nhóm 4 chứa 43,9g Thiamin-HCl, 720mg vitamin B12, và 15g muối hemi-canxi của axit pantothenic được hòa tan trong 5l nước cất và sau đó được lọc tiệt trùng. Sau khi thiết bị lên men giống này được làm mát đến 22,5 độ C, nhóm 2, 3, 4 được bổ sung vào thiết bị lên men. Bằng cách sử dụng natri hydroxit và axit sulfuric, thiết bị lên men này được điều chỉnh độ pH đến 7 và oxy hòa tan được mở rộng đến 100% trước khi chủng. Thiết bị lên men làm giống này được chủng bằng 12l môi trường lên men nhỏ hơn (môi trường lên men nhỏ hơn được điều chế và nuôi cấy theo cách giống như môi trường làm giống) và được nuôi cấy ở 22,5 độ C, độ pH=7, tốc độ khuấy 90 vòng/phút, và 130-170Nm³/giờ của không khí trong thời gian 4-5 ngày để đạt được khối lượng tế bào khô khoảng 15g/l. Môi trường lên men này được điều chế theo cách tương tự như thiết bị lên men chất chủng. Môi trường lên men này bao gồm 5 nhóm. Nhóm 1 chứa 177kg KH₂PO₄, 880kg Na₂SO₄, 500kg MgSO₄*7H₂O, 42kg (NH₄)₂SO₄, 100kg dịch chiết men bia T154, và 10kg chất chống tạo bọt Dow 1520-US trong 9.000kg dung dịch. Nhóm 2 chứa 21,9kg CaCl₂, 62,5kg NaCl, 100kg KCl, trong 9.000kg dung dịch. Nhóm 1 và 2 được bơm qua máy trao đổi nhiệt vào thiết bị lên men, sau đó là nước để đạt khối lượng 67.000kg trong thiết bị lên men. Nhóm 3 chứa 310g MnCl₂*4H₂O, 930g ZnSO₄*7H₂O, 4g Na₂MoO₄*2H₂O, 207g CuSO₄*5H₂O, 207g NiSO₄*6H₂O, 1,03kg FeSO₄*7H₂O và 4,68kg axit xitric được hòa tan trong 1500kg nước xử lý. Nhóm 4 chứa 4300kg siro ngô (DE-95, 70,5%). Nhóm 3 và nhóm 4 được tiệt trùng trong các bình khác nhau, với steam-in-place ở 122-123 độ C trong 30 phút. Nhóm 5 chứa 975g Thiamin-HCl, 333g muối hemi-canxi của axit pantothenic, và 358mg biotin, được hòa tan và lọc tiệt trùng trong 5l nước cất. Các nhóm 3, 4 và 5 được bổ sung vào thiết bị lên men sau khi thiết bị lên men này được làm mát xuống 22,5 độ C. Khối lượng trong thể

tích thiết bị lên men này trước khi chủng xấp xỉ là 73.500kg. Sau khi bắt đầu, điều kiện lên men được đặt (nhiệt độ: 22,5°C, áp suất: 0,34 bar, lưu lượng khí: 3000Nm³/giờ, khuấy, 40 vòng/phút), độ pH lên men được điều chỉnh đến 7 và oxy hòa tan được mở rộng đến 100%. Khối lượng sau khi chủng là khoảng 78.000kg. Khi bắt đầu, độ pH được kiểm soát ở 7 bằng cách sử dụng amoni khan đến khi 550kg amoni được bổ sung vào, và sau đó dung dịch natri hydroxit 30% được sử dụng để kiểm soát độ pH ở điểm đặt là 7,5. Oxy hòa tan được kiểm soát để duy trì nồng độ đích là 20% trong quá trình nạp amoni và là 10% sau đó bằng cách khuấy từ 40 đến 100 vòng/phút và lưu lượng khí từ 2000 đến 8000Nm³/giờ. Trong quá trình lên men, dung dịch siro ngô DE-95 65% được nạp vào để duy trì nồng độ glucoza khoảng 35g/l. Trong một ví dụ khác [K020], ba thay đổi được tạo ra so với ví dụ K019: 1) áp suất giảm xuống 0,15 bar, 2) khối lượng sau khi chủng được giảm xuống 68.000kg, 3) lưu lượng khí được gia tăng đến hơn 5000Nm³/giờ ở 60 giờ sau khi chủng và được duy trì cao trong quá trình vận hành bất kể ở nồng độ oxy hòa tan nào. Ba thay đổi trên đây làm giảm nồng độ cacbon dioxid hòa tan trong canh thang. Các kết quả này chỉ ra rằng với nồng độ CO₂ giảm, % DHA/FAME được gia tăng từ 38,38% đến 43,8%, và % EPA/FAME bị giảm từ 24,42% đến 20,68%. Tỷ lệ DHA:EPA được gia tăng từ 1,57 đến 2,12. Các kết quả này được thể hiện trong bảng 11 dưới đây.

Bảng 11

K019			
Tuổi Giờ	DHA/FAME %	EPA/FAME %	Tỉ lệ DHA:EPA
38	56,32	11,47	4,91
50	51,03	13,2	3,87
62	43,99	16,97	2,59

74	34,65	19,94	1,74
86	32,14	22,56	1,42
98	30,05	25,2	1,19
134	31,45	28,36	1,11
146	33,54	27,43	1,22
158	35,48	26,29	1,35
170	37,16	25,47	1,46
182	38,38	24,42	1,57

Bảng 12

K020 (CO ₂ hòa tan giảm)			
Tuổi Giờ	DHA/FAME %	EPA/FAME %	Tỉ lệ DHA:EPA
12	56,3	13,03	4,32
28	58,12	12	4,84
40	55,55	12,13	4,58
52	52,13	14,03	3,72
64	45,14	16,94	2,66
76	37,54	18,57	2,02
84	35,06	18,72	1,87
96	35,24	20,05	1,76
132	39,42	22,29	1,77
156	42,05	21,54	1,95
180	43,8	20,68	2,12

Ví dụ 9

Trong bảng dưới đây, trị số CO₂ hòa tan tối đa được tính toán cho vài ví dụ trong số các ví dụ sử dụng hằng số Henry. Điều kiện thứ nhất, “10l (NBS4 0719et10) ở đối áp 0 PSI và 45,5mmol/l/giờ CER” là trị số CO₂ hòa

tan được tính toán cho NBS4 trong bảng 8 ở tốc độ tiến hóa cacbon dioxit là 45,5mmol/l/giờ, thể tích lên men là 10-lit, tốc độ nạp khí cacbonic là 0,8vvm, và đối áp 0 PSI. Điều kiện thứ hai, “10l (NBS2 0719et10) ở đối áp 0 PSI với 6% CO₂ trong khí đi vào và 50mmol/l/giờ CER” là trị số CO₂ hòa tan được tính toán cho NBS2 trong bảng 8 ở tốc độ tiến hóa cacbon dioxit là 50mmol/l/giờ, thể tích lên men là 10-lit, tốc độ nạp khí cacbonic là 0,8 vvm, ở đối áp 0 PSI, và với CO₂ được bổ sung trong dòng đi vào là 6% khí toàn phần như đo được bằng cách đo phổ khối lượng sử dụng phổ kế khối lượng Thermo Prima dB. Điều kiện thứ ba, “80 lit (NB5 0614et10) ở đối áp 2 PSI và 55mmol/l/giờ CER” là trị số CO₂ hòa tan được tính toán cho NB5 trong bảng 7 ở tốc độ tiến hóa cacbon dioxit là 55mmol/l/giờ, thể tích lên men là 80l, tốc độ nạp khí cacbonic là 1,0 vvm, và đối áp 2 PSI. Điều kiện thứ tư, “80-lit (NB6 0614et10) ở đối áp 15 PSI và 50mmol/l/giờ CER” là trị số CO₂ hòa tan tính được cho NB6 trong bảng 7 ở tốc độ tiến hóa cacbon dioxit là 50mmol/l/giờ, thể tích lên men là 80-lit, tốc độ nạp khí cacbonic là 1,0 vvm, và đối áp 15PSI. Điều kiện thứ năm, “80-lit (NB7 & NB8 0614et10) ở đối áp 20PSI và 50mmol/l/giờ CER” là trị số CO₂ hòa tan tính được cho NB7 và NB8 trong bảng 7 ở tốc độ tiến hóa cacbon dioxit là 50mmol/l/giờ, thể tích lên men là 80l, tốc độ nạp khí cacbonic là 1,0 vvm, và đối áp 20PSI. Tất cả các trị số CER được tính toán bằng cách sử dụng số liệu khí thải CO₂ thu được với phổ kế khối lượng Thermo Prima dB. Các kết quả của các phép tính này được cung cấp trong bảng 13 và 14 dưới đây.

Bảng 13

10l (NBS4 0719et10) ở đối áp 0 PSI và 45,5mmol/l/giờ CER	RV	10	1
---	----	----	---

Áp suất tuyệt đối	Đầu vào	1,01	bbar
Lưu lượng khí	Đầu vào	8	LPM
V _{vm}		0,8	
CO ₂ cần thiết trong khí đầu vào	Đầu ra	0,14	%
Delta CO ₂ trong khí thải		2,309125	%
CO ₂ trong khí thải		2,446301	%
Áp suất riêng phần CO ₂		0,004738	bar
	CO ₂ hòa tan	0,000785	mol/L
	CO ₂ hòa tan	34,53	ppm
10l (NBS2 0719et10) ở đối áp 0 PSI với 6%CO ₂ trong khí đầu vào và 50mmol/l/giờ			
CER	RV	10	L
Áp suất tuyệt đối	Đầu vào	1,01	bar
Lưu lượng khí	Đầu vào	8	LPM
V _{vm}		0,8	
CO ₂ cần thiết trong khí đi vào	Đầu ra	7,00	%
Delta CO ₂ trong khí thải		2,5375	%
CO ₂ trong khí thải		9,534653	%
Áp suất riêng phần CO ₂		0,009653	bar
	CO ₂ hòa tan	0,003059	mol/l
	CO ₂ hòa tan	134,58	Ppm
80 lit (NB5 0614et10) ở đối áp 2 PSI và 55mmol/l/giờ CER			
	RV	80	L
Đối áp	Đầu vào	0,138	bar
Áp suất toàn phần		1,21	bar
Lưu lượng khí	Đầu vào	80	LPM
V _{vm}		1	
Delta CO ₂	Từ CPR	2,233	%
CO ₂ ở cửa ra		2,233	%
Áp suất riêng phần CO ₂		0,007697	bar
	CO ₂ hòa tan	0,000857	mol/L
	CO ₂ hòa tan	37,70	ppm

80-lit (NB6 0614et10) ở đối áp 15PSI và 50mmol/l/giờ CER			
	RV	80	L
Đối áp	Đầu vào	1,0345	bar
Áp suất toàn phần		2,10	bar
Lưu lượng khí	Đầu vào	80	LPM
V _{vm}		1	
Delta CO ₂	Từ CPR	2,03	%
CO ₂ ở cửa ra		2,03	%
Áp suất riêng phần CO ₂			bar
	CO2 hòa tan	0,001357	mol/L
	CO2 hòa tan	59,71	ppm
80-lit (NB7 & NB8 0614et10) ở đối áp 20PSI và 50 mmol/l/giờ CER			
	RV	80	L
Đối áp	Đầu vào	1,38	bar
Áp suất toàn phần		2,45	bar
Lưu lượng khí	Đầu vào	80	LPM
V _{vm}		1	
Delta CO ₂	Từ CPR	2,03	%
CO ₂ ở cửa ra		2,03	%
Áp suất CO ₂ riêng phần			bar
	CO2 hòa tan	0,00158	mol/L
	CO2 hòa tan	69,51	ppm

Bảng 14

	NB5 (2 PSI)	NB6(15 PSI)	NB7(20 PSI)	NB8(20 PSI)	NBS2(+CO ₂ @24 giờ)	NBS4 (không bổ sung CO ₂)
% EPA/FAME	21,99	21,57	25,85	25,25	27,94	17,81
% DHA/FAME	40,35	39,22	34,14	32,42	24,36	38,81
Trị số CO ₂ tối đa	37,70	59,71	69,51	69,51	134,58	34,53

Ví dụ 10

Các thử nghiệm được thực hiện để xác định tác dụng của các thành phần vitamin trên hiệu suất (khối lượng tế bào khô của sinh khối (DW), % DHA, % chất béo, và % EPA) sử dụng ATCC Accession No. PTA-9695 trong môi trường bình thót cổ lắc *Thraustochytrium* (TSFM) ở mức nồng độ CO₂ môi trường xung quanh.

Nguyên liệu và phương pháp: 4 vitamin (Thiamin.HCl, B12, Biotin, và Ca-pantothenat) được sử dụng trong môi trường TSFM với 0,25g/l taston và 0,625g/l NaCl (xem bảng 16). MSG và KH₂PO₄ bổ sung được thêm vào môi trường này để duy trì hàm lượng nitơ và phospho toàn phần của chúng. Các nồng độ vitamin toàn phần trong môi trường này là, 0, 0,5x, 1x, 5x, 10x, 20x, hoặc 30x lượng chuẩn, phụ thuộc vào các vitamin được nghiên cứu (xem bảng 17). Nghiên cứu gradien được thực hiện trên mỗi vitamin riêng biệt. Tuy nhiên, trong trường hợp của biotin và Ca-pantothenat, các lượng chuẩn của Thiamin.HCl và B12 cũng được kết hợp vào môi trường này, vì các nồng độ của hai vitamin sau là rất thấp trong TSFM thông thường. Ba đối chứng TSFM cũng được bao gồm trong thử nghiệm này để so sánh. Các đối chứng này là TSFM chuẩn với 2g/l taston (xem bảng 15) và 1x Thiamin.HCl và 1x B12 (C1); TSFM không có taston không có bất kỳ vitamin nào (A); và TSFM không chứa taston với 1x Thiamin.HCl và 1x B12 (B). Tất cả các đối chứng chứa 0,625g/l NaCl. Môi trường 3 ngày tuổi của PTA-9695 được sử dụng để chủng bộ hai bình thót cổ lắc 250ml ở 0,1g DW/L. Tất cả các bình thót cổ (đáy bằng, với tổng lượng 50ml môi trường) được ủ ưa khí ở 22,5±1°C trên máy lắc quay tròn (200 vòng/phút). Tất cả các môi trường nuôi cấy được thu hoạch sau 7 ngày, và phân tích FAME được thực hiện trên các mẫu sinh khối đông khô cuối cùng.

Bảng 15

Môi trường bình thót cổ lắc *Thraustochytrium* (TSFM) với 2g/l taston

Thành phần	Lượng trong mỗi lit (g)	[Gốc] (g/l)	ml dung dịch gốc để sử dụng trong mỗi l	
NaCl	0,625	Khô		
KCl	1	50	20 ml	
MgSO ₄ .7H ₂ O	5	227	22 ml	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2	190	1,05 ml	
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,29	Khô		
MSG monohydrat	2	Khô		
Taston 154	2	Khô		
HEPES (100mM)				
pH 7	23,8	Khô		
KH ₂ PO ₄	0,1	56,5	1,77 ml	Bổ sung sau khi hấp
Glucosa	50	500	100 ml	Bổ sung sau khi hấp
Kim loại vết		Xem dưới đây	1 ml	Bổ sung sau khi hấp
Vitamin		Xem dưới đây	1 ml	Bổ sung sau khi hấp
Dung dịch vết kim loại				
FeCl ₃ .6H ₂ O	2,9mg	2,9		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02mg	0,02		
MnCl ₂ .4H ₂ O	8,6mg	8,6		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,26mg	0,26		
ZnCl ₂	0,6mg	0,6		

Axit xitric	12mg	12g (khô)
-------------	------	-----------

Dung dịch vitamin

Thiamin	10ug	10mg/l
---------	------	--------

Vitamin B12	1ug	1mg/l
-------------	-----	-------

Bảng 16

Môi trường bình thốt cổ lắc *Thraustochytrium* (TSFM) với 0,25g/l Taston

Thành phần	Lượng trong mỗi l (g)	[Gốc] (g/l)	ml gốc để sử dụng trong mỗi l	
NaCl	0,625	Khô		
KCl	1	50	20ml	
MgSO ₄ .7H ₂ O	5	227	22ml	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2	190	1,05ml	
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,29	Khô		
MSG monohydrat	4,554	Khô		
Taston GC				
7189-1	0,25	Khô		
HEPES				
(100mM) pH 7	23,8	Khô		
KH ₂ PO ₄	0,1	56,5	4,28 ml	Bổ sung sau khi hấp
Glucosa	50	500	100 ml	Bổ sung sau khi hấp
Kim loại vết		Xem dưới đây	1 ml	Bổ sung sau khi hấp
Vitamin		Xem dưới đây	1 ml	Bổ sung sau khi hấp
TSFM vết kim loại				
FeCl ₃ .6H ₂ O	2,9mg	2,9		

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02mg	0,02
MnCl ₂ .4H ₂ O	8,6mg	8,6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,26mg	0,26
ZnCl ₂	0,6mg	0,6
Axit xitric	12mg	12g (khô)

Dung dịch

vitamin

Thiamin	10ug	10mg/l
Vitamin B12	1ug	1mg/l

Bảng 17

Các nồng độ vitamin được sử dụng trong thử nghiệm này (mg/l):

Nồng độ

vitamin [X]	Thiamin.HCl	B12	Biotin	Ca-Pantothenat
0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	0,005		0,00234	
1	0,010	0,001	0,00468	3,33
5	0,050	0,005		16,65
10	0,100	0,010	0,0468	33,30
20	0,200	0,020	0,0936	66,60
30			0,1404	

Kết quả: DW cao nhất và % chất béo (lần lượt là 6,7g/l và 38,5%) đối với gradien thiamin đạt được khi lượng bổ sung của vitamin này vào môi trường là gấp 5 lần mức độ chuẩn (Fig. 1). % DHA ở mức nồng độ này của thiamin là 44,1%. Dưới và trên 5x thiamin, cả DW và % chất béo bắt đầu giảm. % DHA cũng giảm trong môi trường có ít hơn 5x thiamin, và nó dao động nhẹ ở nồng độ trên 5x thiamin kèm theo không có sự cải thiện đáng kể. % EPA trong môi trường nuôi cấy

gradien thiamin nằm trong khoảng từ 8,6 đến 11,5. Khi không có taston hoặc vitamin được bổ sung vào môi trường này (Fig. 5, môi trường A), mọi trị số ngoại trừ % DHA đều đi xuống đáng kể. Tuy nhiên, sự gia tăng %, rõ ràng là giả vì cả DW và % chất béo đều cực kỳ đối với điều kiện này. Nồng độ 1x của B12 cs về là tối ưu đối với DW, % DHA, % chất béo, và % EPA (Fig. 2). Ở mức nồng độ này của B12, các trị số sau đây đạt được: 7,1g/l DW, 50,6% DHA, 42,7% chất béo, và 2,1% EPA. % EPA cao nhất (11,5) thu được khi B12 không được bổ sung vào môi trường này. Môi trường không chứa taston và không được bổ sung vitamin không cải thiện thêm hiệu suất của vi sinh vật này, và % DHA lớn hơn dường như là giả, vì nó đã được mô tả trước đây (Fig. 5, môi trường A).

Tương tự, nồng độ 1x của biotin là tối ưu đối với DW, % DHA, và % chất béo (Fig. 3). Các trị số tương ứng đối với các tham số này lần lượt là: 6,8g/l, 47,7%, và 37,9%. Tỷ lệ phần trăm EPA ở điểm này là 1,9. Môi trường không chứa taston với 1x thiamin và 1x B12 (Fig. 5, môi trường B) gây tổn hại đáng kể đến hiệu suất chung của PTA-9695.

Ca-pantothenat tạo ra DW, % DHA, và % chất béo cao nhất khi vitamin này được bổ sung vào môi trường này với lượng 10x lượng chuẩn (Fig. 4). Do đó các nồng độ tối ưu của các tham số này là 7,0g/l, 47,3%, và 39,1%. Hàm lượng EPA trong toàn bộ thử nghiệm gradien Ca-pantothenat là ít hơn 2%. Sự giảm đáng kể về hiệu suất chung của PTA-9695 là đáng chú ý khi vi sinh vật này được nuôi trong môi trường không chứa taston với chỉ 1x thiamin và 1x B12 (Fig. 5, môi trường B).

Các kết quả cũng được thể hiện trong các bảng số liệu dưới đây.

Trt ID-→	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b
Thiamin.HCl [x]	0	0	0,5	0,5	1	1	5	5	10	10	20	20
██████████	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Biotin[x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
██████████	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DHA	39,31	38,49	40,43	44,27	45,32	43,95	41,49	46,61	42,87	48,90	44,14	42,29
% DHA trung bình		38,90		42,35		44,63		44,05		45,89		43,21
%chất béo	32,31	31,47	32,40	37,62	37,25	32,74	34,92	42,03	36,85	39,11	36,63	36,27
%chất béo trung bình		31,89		35,01		35,00		38,48		37,98		36,45
% EPA	11,48	11,61	10,38	9,11	8,94	8,28	10,28	8,06	10,45	6,86	8,73	10,03
% EPA trung bình		11,54		9,74		8,61		9,17		8,57		9,38
%16:0	29,58	29,48	31,34	31,19	30,38	31,87	30,15	31,04	30,20	30,97	31,59	30,00
%16:0 trung bình		29,53		31,26		31,13		30,59		30,58		30,80
%ARA	1,33	1,38	1,25	1,12	1,03	0,96	1,29	1,05	1,34	0,86	1,05	1,24
%ARA trung bình		1,36		1,18		1,00		1,17		1,10		1,15

Nồng độ vitamin chuẩn	(g/l)
Thiamin .HCl [1x]	1,00E-05
B12 [1x]	1,00E-06
Biotin [1x]	4,68E-06
Ca-Pantothenat [1x]	3,33E-03

Gradien vitamin [x]-→	0	0,5	1	5	10	20	30
Thiamin.HCl (g/l)	0	5,00E-06	1,00E-05	5,00E-05	1,00E-04	2,00E-04	3,00E-04
B12 (g/l)	0	5,00E-07	1,00E-06	5,00E-06	1,00E-05	2,00E-05	3,00E-05
Biotin (g/l)	0	2,34E-06	4,68E-06	2,34E-05	4,68E-05	9,36E-05	1,40E-04
Ca-Pantothenat (g/l)	0	1,67E-03	3,33E-03	1,67E-02	3,33E-02	6,66E-02	9,99E-02

Các nồng độ vitamin toàn phần bao gồm cả chất cuốn theo chất chùng

Thiamin.HCl (g/l)	2,38E-05	2,88E-05	3,38E-05	7,38E-05	1,24E-04	2,24E-04	3,24E-04
B12 (g/l)	1,37E-08	5,14E-07	1,01E-06	5,01E-06	1,00E-05	2,00E-05	3,00E-05
Biotin (g/l)	2,49E-04	2,51E-04	2,53E-04	2,72E-04	2,96E-04	3,42E-04	3,89E-04
Ca-Pantothenat (g/l)	3,10E-05	1,70E-03	3,36E-03	1,67E-02	3,33E-02	6,66E-02	9,99E-02

Nồng độ vitamin toàn phần (mg/l) bao gồm cả chất cuốn theo chất chùng:

Thiamin.HCl	2,38E-02	2,88E-02	3,38E-02	7,38E-02	1,24E-01	2,24E-01	3,24E-01
B12	1,37E-05	5,14E-04	1,01E-03	5,01E-03	1,00E-02	2,00E-02	3,00E-02
Biotin	2,49E-01	2,51E-01	2,53E-01	2,72E-01	2,96E-01	3,42E-01	3,89E-01
Ca-Pantothenat	3,10E-02	1,70E+00	3,36E+00	1,67E+01	3,33E+01	6,66E+01	9,99E+01

Trt ID-→	7a	7b	8a	8b	9a	9b	10a	10b	11a	11b	12a	12b
Thiamin.HCl [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
██████████	0	0	1	1	5	5	10	10	20	20	1	1
Biotin[x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
██████████	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DHA	39,31	38,49	50,45	50,75	50,83	50,05	45,99	46,44	46,90	44,48	43,07	42,74
% DHA trung bình		38,90		50,60		50,44		46,21		45,89		42,41
%chất béo	32,31	31,47	42,06	43,40	44,43	38,30	36,47	34,72	34,99	33,14	32,04	28,89
%chất béo trung bình		31,89		42,73		41,36		35,59		34,08		30,46
%EPA	11,48	11,61	2,08	2,05	2,01	2,01	2,11	2,22	2,03	2,16	1,76	2,14
%EPA trung bình		11,54		2,06		2,01		2,17		2,10		1,95
%16:0	29,58	29,48	38,79	36,69	36,75	37,41	41,05	40,83	40,33	42,66	44,55	43,42
%16:0 trung bình		29,53		36,74		37,08		40,94		41,50		43,99
%ARA	1,33	1,38	0,16	0,15	0,17	0,14	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
%ARA trung bình		1,36		0,15		0,15		0,07		0,00		0,00

Trt ID-→	13a	13b	14a	14b	15a	15b	16a	16b	17a	17b	18a	18b
Thiamin.HCl [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
██████████	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Biotin[x]	0,5	0,5	1	1	10	10	20	20	30	30	0	0
██████████	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DHA	48,32	46,94	46,13	49,18	45,43	43,63	44,37	41,79	44,36	42,19	42,07	42,74

%DHA trung bình	47,63	34,34	47,65	44,53	43,08	43,28	42,41
%chất béo	26,16	35,67	41,39	32,04	31,41	31,11	28,89
%chất béo trung bình	31,92	37,87		33,85	32,63	33,31	30,48
%EPA	2,38	1,83	1,91	1,77	1,84	1,88	2,14
%EPA trung bình	2,09		1,92	1,79	1,83	1,91	1,95
%16:0	38,18	40,33	38,13	43,28	44,57	44,16	43,42
%16:0 trung bình	39,26	40,70	39,42	42,46	43,46	43,28	43,99
%ARA	0,21	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
%ARA trung bình	0,11	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00

Trt ID-→	19a	19b	20a	20b	21a	21b	22a	22b	C1a(0,625g/l NaCl)	C1b(0,625g/l NaCl)
Thiamin.HCl [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Biotin[x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	5	5	10	10	20	20	0	0
%DHA	45,05	41,28	44,94	46,70	50,66	43,87	44,23	38,53	56,95	56,92
%DHA trung bình	43,16			45,82		47,27		41,38		56,93
%chất béo	32,05	31,10	32,32	36,07	45,61	32,51	25,50	27,42	50,11	53,39
%chất béo trung bình	31,57			34,20		39,06		26,46		51,75
%EPA	1,94	1,73	1,86	1,83	1,87	1,82	2,21	1,73	2,50	2,45
%EPA trung bình	1,83			1,84		1,85		1,97		2,47
%16:0	41,55	45,27	41,79	40,38	37,09	42,91	42,30	47,56	31,04	31,06
%16:0 trung bình	43,41			41,09		40,00		44,93		31,05
%ARA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,20	0,21

%ARA trung bình	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,20
-----------------	------	------	------	------	------	------

Trt ID -->	Axit amin	Ab	Ba	Bb
Thiamin.HCl [x]	0	0	0	0
B12 [x]	0	0	0	0
Biotin [x]	0	0	0	0
Ca-pantothenat [x]	0	0	0	0
% DHA	51,82	56,09	50,74	54,23
% DHA trung bình		53,96		52,48
% chất béo	9,02	7,13	20,86	26,54
% chất béo trung bình		8,07		23,70
% EPA	5,91	6,63	3,71	3,38
% EPA trung bình		6,27		3,54
% 16:0	25,07	20,69	34,01	31,44
% 16:0 trung bình		22,88		32,72
% ARA	0,00	0,00	0,00	0,23
% ARA trung bình		0,00		0,11

Trt ID->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----

Thiamin.HCl [x]	0	0,5	1	5	10	20	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	1	5	10	20	0
Biotin[x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%DHA trung bình	38,90	42,35	44,63	44,05	45,89	43,21	38,90	50,60	50,44	46,21	45,69	
%chất béo trung bình	31,89	35,01	35,00	38,48	37,98	36,45	31,89	42,73	41,36	35,59	34,06	
%EPA trung bình	11,54	9,74	8,61	9,17	8,57	9,38	11,54	2,06	2,01	2,17	2,10	
%16:0 trung bình	29,53	31,26	31,13	30,59	30,58	30,80	29,53	36,74	37,08	40,94	41,50	
%ARA trung bình	1,36	1,18	1,00	1,17	1,10	1,15	1,36	0,15	0,15	0,07	0,00	

Tr ID→	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Thiamin/B12/Bio/Ca-Panth.[x]	0/0/0/0	0,5/0/0/0	1/0/0/0	5/0/0/0	10/0/0/0	20/0/0/0	0/0/0/0	0/1/0/0	0/5/0/0	0/10/0/0	0/20/0/0
Nồng độ vitamin (g/l)	0/0/0/0	0,000005/ 0/0/0	0,00001/0/ 0/0	0,00005/0/ 0/0	0,0001/0/0 /0	0,0002/0/0 /0	0/0/0/0	0/0,00000 1/0/0	0/0,00000 5/0/0	0/0,00001/ 0/0	0/0,00002/ 0/0
%DHA trung bình	38,90	42,35	44,63	44,05	45,89	43,21	38,90	50,60	50,44	46,21	45,69
%chất béo trung bình	31,89	35,01	35,00	38,48	37,98	36,45	31,89	42,73	41,36	35,59	34,06
%EPA trung bình	11,54	9,74	8,61	9,17	8,57	9,38	11,54	2,06	2,01	2,17	2,10
%16:0 trung bình	29,53	31,26	31,13	30,59	30,58	30,50	29,53	36,74	37,08	40,94	41,50
%ARA trung bình	1,36	1,18	1,00	1,17	1,10	1,15	1,36	0,15	0,15	0,07	0,00
Nồng độ vitamin toàn phần (mg/l)	2,38E-02	2,88E-02	3,38E-02	7,38E-02	1,24E-01	2,24E-01	1,37E-05	1,01E-03	5,01E-03	1,00E-02	2,00E-02
DW trung bình (g/l)	5,863	6,214	6,112	6,658	6,355	6,277	5,863	7,079	7,001	6,505	6,442

Trt ID→	12	13	14	15	16
Thiamin.HCl [x]	1	1	1	1	1
██████████	1	1	1	1	1
Biotin[x]	0	0,5	1	10	20
Ca-Panthenol [x]	0	0	0	0	0
% DHA trung bình	42,41	47,63	47,65	44,53	43,08
%chất béo trung bình	30,46	31,92	37,87	33,85	32,63
% EPA trung bình	1,95	2,09	1,92	1,79	1,83
%16:0 trung bình	43,99	39,26	39,42	42,46	43,46
%ARA trung bình	0,00	0,11	0,08	0,00	0,00

Trt ID→	12	13	14	15	16
Thiamin/B12/Bio/Ca-Panth [x]	1/1/0/0	1/1/0,5/0	1/1/1/0	1/1/10/0	1/1/20/0
Nồng độ vitamin (g/l)	0,00001/0,000001/0/0	0,00001/0,000001/0,00000234/0	0,00001/0,000001/0,00000468/0	0,00001/0,000001/0,0000468/0	0,00001/0,000001/0,0000936/0
% DHA trung bình	42,41	47,63	47,65	44,53	43,08
%chất béo trung bình	30,46	31,92	37,87	33,85	32,63
% EPA trung bình	1,95	2,09	1,92	1,79	1,83
%16:0 trung bình	43,99	39,26	39,42	42,46	43,46
%ARA trung bình	0,00	0,11	0,08	0,00	0,00
Nồng độ vitamin toàn phần (mg/l)	2,49E-01	2,51E-01	2,53E-01	2,96E-01	3,42E-01
DW trung bình (g/l)	6,029	5,706	6,813	6,458	6,286

Trt ID-→	17	18	19	20	21
Thiamin.HCl [x]	1	1	1	1	1
■	1	1	1	1	1
Biotin[x]	30	0	0	0	0
Ca-Panthothenat [x]	0	0	1	5	10
% DHA trung bình	43,28	42,41	43,16	45,82	47,27
%chất béo trung bình	33,31	30,46	41,57	34,20	39,06
% EPA trung bình	1,91	1,95	1,83	1,84	1,85
%16:0 trung bình	43,28	43,99	43,41	41,09	40,00
%ARA trung bình	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08

Trt ID-→	17	18	19	20	21
Thiamin/B12/Bio/Ca-Panth [x]	1/1/30/0	1/1/0/0	1/1/0/1	1/1/0/5	1/1/0/10
Nồng độ vitamin (g/l)	0,00001/0,00001/0,0001404/0	0,00001/0,00001/0/0	0,00001/0,000001/0/0	0,00001/0,000001/0/0,01665	0,00001/0,000001/0/0,0333
% DHA trung bình	43,28	42,41	43,16	45,82	47,27
%chất béo trung bình	33,31	30,46	31,57	34,20	39,06
% EPA trung bình	1,91	1,95	1,83	1,84	1,85
%16:0 trung bình	43,28	43,99	43,41	41,09	40,00
%ARA trung bình	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nồng độ vitamin toàn phần (mg/l)	3,89E-01	3,10E-02	3,36E+00	1,67E+01	3,33E+01
DW trung bình (g/l)	6,358	6,029	6,058	6,349	6,961

Trt ID→	22	C1 (0,625g/l NaCl)	A	B
Thiamin.HCl [x]	1	1	0	1
■	1	1	0	1
Biotin[x]	0	0	0	0
Ca-Panthothenat [x]	20	0	0	0
% DHA trung bình	41,38	56,93	53,96	52,48
%chất béo trung bình	26,46	51,75	8,07	23,70
% EPA trung bình	1,97	2,47	6,27	3,54
%16:0 trung bình	44,93	31,05	22,88	32,72
%ARA trung bình	0,00	0,20	0,00	0,11

Trt ID→	22	C1	A	B
Thiamin/B12/Bio/Ca-Panth [x]	1/1/0/20	1/1/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0
Nồng độ vitamin (g/l)	0,00001/0,000001/0/0,0666	0,00001/0,000001/0/0	0/0/0/0	0,00001/0,000001/0/0
% DHA trung bình	41,38	56,93	53,96	52,48
%chất béo trung bình	26,46	51,75	8,07	23,70
% EPA trung bình	1,97	2,47	6,27	3,54
%16:0 trung bình	44,93	31,05	22,88	32,72
%ARA trung bình	0,00	0,20	0,00	0,11
Nồng độ vitamin toàn phần (mg/l)	6,66E+01			
DW trung bình (g/l)	5,492	7,651	0,428	4,809

Ví dụ 11

Các thử nghiệm được thực hiện để xác định nhu cầu tối thiểu của số truy cập ATCC PTA-9695 đối với vitamin B12 để đạt được hiệu suất tối đa ở 10% CO₂, bao gồm lượng tối thiểu vitamin B12 mà cần thiết cho môi trường nuôi cấy PTA-9695 để tạo ra khối lượng khô và lượng DHA tối đa trong các điều kiện 10% CO₂.

Nhiệt độ: 22,5 +/- 1C (@ 10% CO₂)

Tốc độ máy khuấy: 200 vòng/phút

Môi trường cơ bản: môi trường thiết bị lên men Scaled-Down xác định (DSDFM-B) (bảng 20).

Chất chủng: môi trường nuôi cấy 3 ngày tuổi chứa PTA-9695 được nuôi trong DSDFM-B với các nồng độ vitamin B12 khác nhau.

Ống giữ mẫu mới chứa PTA-9695 được làm tan ban đầu trong SDFM-B (bảng 19), và được nuôi tiếp và được chuyển vài lần trong SDFM-B xác định dưới 10% CO₂. Môi trường nuôi cấy 3 ngày tuổi chứa PTA-9695 trong DSDFM-B được sử dụng (ở 4%) để tạo ra các bình thót cổ chủng ban đầu chứa DSDFM-B với nhiều nồng độ vitamin B12 khác nhau (nghĩa là, theo đó, từ 7,68mg/l đến 0mg/l B12 cho các điều trị A đến I; xem bảng 18). Các bình thót cổ chủng cho mỗi nồng độ vitamin B12 được duy trì dưới 10% CO₂ và bằng cách chuyển môi trường nuôi cấy vào môi trường tương ứng của chúng mỗi 7 ngày. Việc chuyển các môi trường nuôi cấy hàng tuần là cần thiết để rửa sạch lượng dư vitamin B12 bất kỳ mà có thể bị tích lũy bên trong tế bào, nhờ đó nhu cầu tối thiểu đối với vitamin này có thể được xác định chính xác hơn. Bộ hai bình thót cổ lắc được chủng bằng chất chủng 3 ngày tuổi tương ứng của chúng ở DW lý thuyết là 0,1g/l, bằng cách sử dụng mật độ quang là 600nm. Các môi trường nuôi cấy được nuôi dưới 10% CO₂ trong 9 ngày, trước khi được thu hoạch và được phân tích thêm bằng thử nghiệm FAME.

Kết quả :

Chú ý: Các điểm dữ liệu cho tuần 3 không được xem xét trong thử nghiệm này, vì việc cung cấp CO₂ cho máy ủ bị gián đoạn, và các bình thốt cô phải được lấy ra khỏi máy ủ trong vòng 6 giờ trong quá trình cải tiến phòng thí nghiệm.

Việc tiếp xúc kéo dài (đến 4 tuần) của PTA-9695 với các nồng độ cao của vitamin B12 (lớn hơn 3,84mg/l) có thể gây ảnh hưởng bất lợi đến khối lượng khô, % chất béo, và lượng DHA, trong khi nồng độ nằm trong khoảng từ 1,5 đến 768ug/L vitamin B12 không có tác dụng đáng kể nào trên DW, % chất béo, % EPA và lượng DHA của PTA-9695.

Sự gia tăng về số lượng các tế bào đơn (đến 15, đối lập với 3-4) được chú ý trong các môi trường nuôi cấy mà đã được nuôi với sự có mặt của 7 68mg/l vitamin B12 (điều trị A).

Việc loại bỏ vitamin B12 khỏi công thức môi trường, làm tăng đáng kể % EPA khoảng 10%, trong khi đó làm giảm nhẹ cả % DHA và %16:0, các Fig. 6-19 và bảng 21 dưới đây chỉ ra các kết quả của thử nghiệm này.

Kết luận:

Tối thiểu khoảng 1,5ug/l vitamin B12 (1/500 nồng độ chuẩn trong SDFM-B) là cần thiết để thu được DW, % DHA, % chất béo và lượng DHA tối đa. Trong khi các nồng độ vitamin B12 rất cao (lớn hơn 3,84mg/l) có thể làm giảm đáng kể DW, % chất béo, và lượng DHA, sự mất hoàn toàn vitamin này của PTA-9695 có thể làm tăng đáng kể (xấp xỉ 10%) % EPA của nó. Các mức nồng độ rất cao của vitamin B12 cũng có thể đóng vai trò trong việc thúc đẩy sự chuyển dạng môi trường nuôi cấy “cụm” thành “tế bào đơn”.

Bảng 18. Các xử lý vitamin B12

Xử lý	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Vit. B12 (ug/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0

Bảng 19. Môi trường thiết bị lên men Scaled-Down cho PTA-9695 (SDFM-B), độ pH=7

Thành phần	MW	[gốc] (g/l)	ml dung dịch gốc đưa vào bình thót cổ lắc 1l	Gam thành phần khô trong bình thót cổ lắc 1l	Nồng độ cuối cùng (g/l)
NaCl	58,44			0,625	0,625
KCl	74,56	56	17,9		1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,5	227	22		5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	190	0,525		0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	147	60	4,833		0,290
MSG (w/ 1mol H ₂ O)	187,1			1,0	1,0
Na ₂ SO ₄	142,04			6,0	6,0
K ₂ SO ₄	174,27			1,0959	1.0959
Taston (GC9156-1)				1,0	1,0
HEPES (100mM) độ pH=7,0	195,2			23,8	23,8
KH ₂ PO ₄	136,07	56,5	0,885		0,05
Glucosa	180	500	100		50
Hỗn hợp vết kim loại					
FeSO ₄ .7H ₂ O	278,02	1,03	10		0,0103
MnCl ₂ .4H ₂ O	198	3,1	1		0,0031
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,4	9,3	1		0,0093
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241,95	0,04	1		0,00004
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,5	2,07	1		0,00207

NiSO ₄ .6H ₂ O	262,84	2,07	1		0,00207
Axit xitric (trong FeSO ₄ .7H ₂ O)		117,5			1,175
Dung dịch Vitamin					
Vitamin B12	1355,4	0,768	1		0,000768
Thiamin.HCl	337,3	11,7	1		0,0117
Ca-Pantothenat	476,54	3,996	1		0,003996
Biotin	244,3	0,002	2,17		0,00000434

Bảng 20, SDFM-B (DSDFM-B) xác định, độ
pH=7

Thành phần	MW	[Gốc] (g/L)	Số ml chất gốc trong bình thốt cổ lắc 1l	Số gam thành phần khô trong bình thốt cổ lắc 1l	Nồng độ cuối cùng (g/l)
NaCl	58,44			0,625	0,625
KCl	74,56	56	17,9		1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,5	227	22		5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	190	1,1483		0,218
CaCl ₂ .2H ₂ O	147	60	4,833		0,290
MSG (w/1 mol H ₂ O)	187,1			2,188	2,188
Na ₂ SO ₄	142,04			6,0	6,0
K ₂ SO ₄	174,27			1,1240	1,1240
Taston (GC9156-1)				0,0	0,0

HEPES (100mM) độ pH=7,0	195,2			23,8	23,8
KH ₂ PO ₄	136,07	56,5	2,475		0,140
Glucosa	180	500	100		50
Hỗn hợp vết kim loại					
FeSO ₄ .7H ₂ O	278,02	1,03	10		0,0103
MnCl ₂ .4H ₂ O	198	3,1	1		0,0031
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,4	9,3	1		0,0093
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241,95	0,04	1		0,00004
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,5	2,07	1		0,00207
NiSO ₄ .6H ₂ O	262,84	2,07	1		0,00207
Axit xitric (trong FeSO ₄ .7H ₂ O)		117,5			1,175
Dung dịch vitamin					
Vitamin B12	1355,4	0,768	1		0,000768
Thiamin.HCl	337,3	11,7	1		0,0117
Ca-Pantothenat	476,54	3,996	1		0,003996
Biotin	244,3	0,002	2,65		0,0000053

Bảng 21. Số liệu từ các thử nghiệm

Dãy bình lắc (SF)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ID xử lý	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nồng độ Vit. B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	
Nồng độ vit. B12 (Log 10 -	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001

mg/l)										
DW (g/l)										
Bình 1	2,832	3,48	3,64	4,186	3,728	3,952	3,71	3,96	4,5	3,868
Bình 2	3,03	3,324	3,88	3,412	3,626	3,746	4,024	3,682	4,17	4,094
Trung bình	2,931	3,402	3,76	3,799	3,677	3,849	3,867	3,821	4,335	3,981
% chất béo (theo % diện tích)										
Bình 1	56,9	55,5	58,9	63,9	61,6	60,5	60,4	64,7	66,6	60,4
Bình 2	52,4	56,7	61,6	59,8	58,7	60,7	64,1	57,9	66,3	62,9
Trung bình	54,6	56,1	60,3	61,9	60,1	60,6	62,2	61,3	66,5	61,7
% DHA										
Bình 1	45,4	45,8	46,6	48,2	45,3	46,4	47,9	47,4	48,9	46,4
Bình 2	45,7	44,0	47,1	46,4	46,3	46,0	48,8	46,6	48,0	46,5
Trung bình	45,5	44,9	46,9	47,3	45,8	46,2	48,4	47,0	48,4	46,5
DHA (mg/g)										
Bình 1	260,1	256,6	277,2	310,6	281,1	283,0	291,7	309,4	328,2	283,0
Bình 2	241,4	251,1	292,7	279,8	274,2	281,7	315,4	271,9	320,9	294,9
Trung bình	250,8	253,9	285,0	295,2	277,7	282,3	303,5	290,6	324,6	289,0
% chất béo (theo mg/g)										
Bình 1	57,3	56,0	59,4	64,4	62,1	61,0	60,9	65,2	67,1	60,9
Bình 2	52,8	57,1	62,1	60,3	59,2	61,2	64,6	58,4	66,9	63,4
Trung bình	55,1	56,5	60,8	62,4	60,6	61,1	62,7	61,8	67,0	62,2
Chất béo (g/l)										
Bình 1	1,6	1,9	2,2	2,7	2,3	2,4	2,3	2,6	3,0	2,4
Bình 2	1,6	1,9	2,4	2,1	2,1	2,3	2,6	2,1	2,8	2,6
Trung	1,6	1,9	2,3	2,4	2,2	2,4	2,4	2,4	2,9	2,5

bình										
Hiệu suất DHA (g/l)										
Bình 1	0,7	0,9	1,0	1,3	1,0	1,1	1,1	1,2	1,5	1,1
Bình 2	0,7	0,8	1,1	1,0	1,0	1,1	1,3	1,0	1,3	1,2
Trung bình	0,7	0,9	1,1	1,1	1,0	1,1	1,2	1,1	1,4	1,2
% EPA										
Bình 1	19,2	20,1	18,7	16,7	20,4	19,0	16,1	17,5	15,5	19,3
Bình 2	18,6	21,6	18,2	18,3	19,0	19,5	15,2	18,9	16,7	19,2
Trung bình	18,9	20,8	18,5	17,5	19,7	19,2	15,6	18,2	16,1	19,3
EPA (mg/g)										
Bình 1	108,2	110,3	109,2	105,8	124,7	113,6	96,1	112,2	102,5	115,5
Bình 2	96,3	121,4	111,1	108,4	110,6	117,3	96,3	108,1	110,0	120,0
Trung bình	102,3	115,8	110,2	107,1	117,7	115,5	96,2	110,1	106,3	117,7
Hiệu suất EPA (g/L)										
Bình 1	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5
Bình 2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
Trung bình	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5
L-F DW (g/L)										
Bình 1	1,2	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5
Bình 2	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5
Trung bình	1,3	1,5	1,5	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5
% 16:0										
Bình 1	24,0	22,8	23,1	23,6	22,6	23,0	24,4	23,4	23,9	22,5
Bình 2	24,2	22,7	23,1	23,8	23,1	22,8	24,5	23,0	23,6	22,5
Trung bình	24,1	22,7	23,1	23,7	22,9	22,9	24,4	23,2	23,7	22,5

% DPA n-3										
Bình 1	1,1	1,0	1,2	1,0	1,2	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1
Bình 2	1,1	1,1	1,1	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1
Trung bình	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1
% DPA n-6										
Bình 1	2,1	2,1	2,3	2,5	2,1	2,2	2,4	2,4	2,6	2,2
Bình 2	2,2	2,0	2,3	2,2	2,2	2,2	2,5	2,2	2,5	2,2
Trung bình	2,1	2,0	2,3	2,3	2,2	2,2	2,5	2,3	2,5	2,2
% omega-3 toàn phần										
Bình 1	65,7	66,9	66,5	66,0	66,9	66,5	65,1	66,0	65,4	66,9
Bình 2	65,4	66,7	66,5	65,9	66,5	66,7	65,1	66,5	65,8	66,9
Trung bình	65,6	66,8	66,5	65,9	66,7	66,6	65,1	66,3	65,6	66,9
Độ pH										
Bình 1	6,81	6,83	6,84	6,83	6,82	6,82	6,83	6,83	6,82	6,81
Bình 2	6,81	6,83	6,81	6,82	6,83	6,82	6,82	6,82	6,82	6,81
Trung bình	6,81	6,83	6,83	6,83	6,83	6,82	6,83	6,83	6,82	6,81

Bảng 21 tiếp

Dãy bình lắc (SF)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ID xử lý	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nồng độ vit. B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Nồng độ vit. B12 (Log 10 - mg/l)	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001

DW (g/L)										
Bình 1	2,01	4,17	4,176	3,764	4,276	4,218	3,916	4,44	4,59	3,676
Bình 2	2,574	3,354	4,106	3,824	3,922	4,21	4,046	4,352	4,518	3,174
Trung bình	2,292	3,762	4,141	3,794	4,099	4,214	3,981	4,396	4,554	3,425
% chất béo (theo % diện tích)										
	28,8	62,2	64,4	60,5	65,3	58,8	58,2	66,4	63,0	61,4
Bình 1	39,2	55,6	65,0	55,9	62,6	62,2	65,4	62,0	66,3	53,0
Bình 2	34,0	58,9	64,7	58,2	63,9	60,5	61,8	64,2	64,7	57,2
Trung bình										
% DHA	38,9	46,4	47,5	46,1	48,0	45,7	43,2	47,7	47,9	38,5
Bình 1	40,9	41,3	46,9	43,6	46,3	47,1	45,2	47,6	47,5	35,3
Bình 2	39,9	43,9	47,2	44,9	47,1	46,4	44,2	47,6	47,7	36,9
Trung bình										
DHA (mg/g)	109,7	283,1	300,1	273,9	307,2	263,4	246,7	310,6	296,0	232,1
Bình 1	157,3	225,4	299,0	239,5	284,4	287,8	290,3	289,4	309,4	183,6
Bình 2	133,5	254,3	299,6	256,7	295,8	275,6	268,5	300,0	302,7	207,8
Trung bình	28,8	62,2	64,4	60,5	65,3	58,8	58,2	66,4	63,0	61,4
% chất béo (theo mg/g)										
Bình 1	28,2	61,0	63,1	59,4	64,0	57,7	57,1	65,1	61,9	60,2
Bình 2	38,5	54,5	63,7	54,9	61,4	61,1	64,2	60,8	65,1	52,0
Trung bình	33,3	57,8	63,4	57,2	62,7	59,4	60,6	63,0	63,5	56,1
Chất béo (g/l)										
Bình 1	0,6	2,5	2,6	2,2	2,7	2,4	2,2	2,9	2,8	2,2
Bình 2	1,0	1,8	2,6	2,1	2,4	2,6	2,6	2,6	2,9	1,7
Trung	0,8	2,2	2,6	2,2	2,6	2,5	2,4	2,8	2,9	1,9

bình										
Hiệu suất DHA (g/l)										
Bình 1	0,2	1,2	1,3	1,0	1,3	1,1	1,0	1,4	1,4	0,9
Bình 2	0,4	0,8	1,2	0,9	1,1	1,2	1,2	1,3	1,4	0,6
Trung bình	0,3	1,0	1,2	1,0	1,2	1,2	1,1	1,3	1,4	0,7
% EPA										
Bình 1	22,9	19,0	18,8	17,4	17,1	18,8	21,6	18,0	16,4	28,3
Bình 2	20,8	24,5	18,8	19,6	18,8	17,0	20,0	16,1	16,8	31,4
Trung bình	21,8	21,8	18,8	18,5	17,9	17,9	20,8	17,0	16,6	29,8
EPA (mg/g)										
Bình 1	63,9	114,9	117,4	102,4	108,3	107,6	122,1	115,8	100,5	168,9
Bình 2	79,1	132,4	118,6	106,6	114,4	102,8	127,0	96,9	108,3	161,6
Trung bình	71,5	123,6	118,0	104,5	111,4	105,2	124,5	106,4	104,4	165,2
Hiệu suất EPA (g/l)										
Bình 1	0,1	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
Bình 2	0,2	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5
Trung bình	0,2	0,5	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6
L-F DW (g/l)										
Bình 1	1,4	1,6	1,5	1,5	1,5	1,8	1,7	1,5	1,8	1,5
Bình 2	1,6	1,5	1,5	1,7	1,5	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5
Trung bình	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,7	1,6	1,6	1,7	1,5
% 16:0										
Bình 1	26,0	22,5	21,7	24,3	22,5	23,1	23,0	22,0	23,2	20,2
Bình 2	25,9	22,1	21,9	24,2	22,6	23,3	22,5	23,5	23,1	19,9
Trung bình	26,0	22,3	21,8	24,3	22,5	23,2	22,7	22,8	23,2	20,0

% DPA n-3										
Bình 1	1,5	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,4
Bình 2	1,2	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9	1,4
Trung bình	1,4	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,4
% DPA n-6										
Bình 1	1,3	2,3	2,3	2,3	2,5	2,3	1,9	2,4	2,6	1,3
Bình 2	1,7	1,6	2,3	2,1	2,3	2,5	2,1	2,6	2,5	1,1
Trung bình	1,5	1,9	2,3	2,2	2,4	2,4	2,0	2,5	2,6	1,2
% omega-3 toàn phần										
Bình 1	63,2	66,4	67,4	64,5	66,1	65,5	65,8	66,6	65,2	68,2
Bình 2	62,9	66,9	66,7	64,2	66,1	65,1	66,1	64,6	65,2	68,1
Trung bình	63,1	66,7	67,0	64,4	66,1	65,3	66,0	65,6	65,2	68,1
Độ pH										
Bình 1	6,70	6,69	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71
Bình 2	6,67	6,71	6,72	6,71	6,72	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71
Trung bình	6,69	6,70	6,72	6,71	6,72	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71

Bảng 21 tiếp

Dãy bình lắc (SF)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ID xử lý	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nồng độ vit. B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Nồng độ vit. B12 (Log 10 -	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001

mg/l)										
DW (g/L)										
Bình 1	2,786	2,92	4,108	3,258	3,524	4,258	3,974	3,794	3,74	3,902
Bình 2	2,868	3,106	2,87	3,376	3,234	4,39	4,834	3,374	4,434	3,82
Trung bình	2,827	3,013	3,489	3,317	3,379	4,324	4,404	3,584	4,087	3,861
% Chất béo (theo % diện tích)										
Bình 1	42,6	41,0	54,5	46,5	50,7	59,8	57,0	51,0	55,9	62,3
Bình 2	44,0	43,1	48,4	49,8	49,3	56,8	62,2	52,3	56,4	56,5
Trung bình	43,3	42,0	51,4	48,1	50,0	58,3	59,6	51,7	56,2	59,4
% DHA										
Bình 1	42,0	39,8	43,0	43,1	43,1	44,8	45,4	44,0	43,4	45,4
Bình 2	41,9	39,9	40,5	42,8	42,5	44,2	46,3	43,8	37,7	38,3
Trung bình	41,9	39,9	41,8	42,9	42,8	44,5	45,9	43,9	40,6	41,9
DHA (mg/g)										
Bình 1	177,2	161,7	232,4	198,4	216,2	265,6	256,5	222,5	240,8	280,2
Bình 2	182,6	170,3	194,2	210,9	207,6	248,8	285,6	227,2	211,0	214,4
Trung bình	179,9	166,0	213,3	204,6	211,9	257,2	271,1	224,8	225,9	247,3
% chất béo (theo mg/g)										
Bình 1	42,2	40,6	54,0	46,1	50,2	59,2	56,4	50,5	55,4	61,7
Bình 2	43,6	42,7	47,9	49,3	48,9	56,3	61,7	51,9	55,9	56,0
Trung bình	42,9	41,7	51,0	47,7	49,5	57,8	59,1	51,2	55,7	58,8
Chất béo (g/l)										
Bình 1	1,2	1,2	2,2	1,5	1,8	2,5	2,2	1,9	2,1	2,4
Bình 2	1,2	1,3	1,4	1,7	1,6	2,5	3,0	1,7	2,5	2,1

Trung bình	1,2	1,3	1,8	1,6	1,7	2,5	2,6	1,8	2,3	2,3
Hiệu suất DHA (g/l)										
Bình 1	0,5	0,5	1,0	0,6	0,8	1,1	1,0	0,8	0,9	1,1
Bình 2	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	1,1	1,4	0,8	0,9	0,8
Trung bình	0,5	0,5	0,8	0,7	0,7	1,1	1,2	0,8	0,9	1,0
% EPA										
Bình 1	22,4	24,7	23,9	22,0	23,5	22,1	20,9	22,3	23,8	21,3
Bình 2	23,0	24,9	25,7	22,8	24,4	23,0	20,1	22,6	31,3	30,9
Trung bình	22,7	24,8	24,8	22,4	24,0	22,6	20,5	22,4	27,5	26,1
EPA (mg/g)										
Bình 1	93,6	99,2	127,3	100,4	116,5	129,6	116,7	111,3	130,2	129,9
Bình 2	98,9	105,2	121,5	111,2	118,0	128,1	122,6	115,5	173,1	170,7
Trung bình	96,2	102,2	124,4	105,8	117,2	128,8	119,7	113,4	151,6	150,3
Hiệu suất EPA (g/l)										
Bình 1	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5
Bình 2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,4	0,8	0,7
Trung bình	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,6	0,6
L-F DW (g/l)										
Bình 1	1,6	1,7	1,9	1,8	1,8	1,7	1,7	1,9	1,7	1,5
Bình 2	1,6	1,8	1,5	1,7	1,7	1,9	1,9	1,6	2,0	1,7
Trung bình	1,6	1,8	1,7	1,7	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8	1,6
% 16:0										
Bình 1	24,0	23,8	21,4	23,1	21,7	21,3	21,9	22,0	21,0	21,6
Bình 2	23,5	23,5	21,7	22,8	21,4	21,0	21,5	22,0	18,2	18,0
Trung	23,7	23,6	21,5	23,0	21,6	21,1	21,7	22,0	19,6	19,8

bình										
%DPA n-3										
Bình 1	1,2	1,2	1,0	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,0	0,9
Bình 2	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,3	1,4
Trung bình	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,2	1,1
% DPA n-6										
Bình 1	1,7	1,4	1,8	1,8	1,8	2,0	2,1	1,9	1,8	2,1
Bình 2	1,7	1,5	1,5	1,8	1,7	2,0	2,3	1,9	1,2	1,3
Trung bình	1,7	1,5	1,7	1,8	1,8	2,0	2,2	1,9	1,5	1,7
% omega-3 toàn phần										
Bình 1	65,6	65,8	67,9	66,3	67,7	67,9	67,4	67,4	68,2	67,6
Bình 2	66,0	66,0	67,3	66,8	68,1	68,3	67,4	67,5	70,4	70,5
Trung bình	65,8	65,9	67,6	66,6	67,9	68,1	67,4	67,5	69,3	69,1
Độ pH										
Bình 1	6,85	6,89	6,89	6,88	6,88	6,88	6,87	6,88	6,88	6,87
Bình 2	6,86	6,89	6,89	6,88	6,88	6,89	6,86	6,87	6,88	6,86
Trung bình	6,86	6,89	6,89	6,88	6,88	6,89	6,87	6,88	6,88	6,87

Bảng 21 tiếp

Dãy bình lắc (SF)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
ID xử lý	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nồng độ vit. B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0

Nồng độ vit. B12 (Log 10 - mg/l)	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001
DW (g/l)										
Bình 1	2,538	2,512	4,242	4,528	2,498	3,796	3,79	3,87	3,676	3,972
Bình 2	2,646	3,162	2,86	4,368	2,744	3,774	3,81	4,002	4,202	4,35
Trung bình	2,592	2,837	3,551	4,448	2,621	3,785	3,8	3,936	3,939	4,161
% chất béo (theo % diện tích)										
Bình 1	42,5	41,9	57,5	66,7	43,6	58,1	58,2	60,0	57,1	59,2
Bình 2	44,6	32,9	45,4	63,0	43,9	57,3	57,7	59,9	60,4	62,0
Trung bình	43,5	37,4	51,5	64,9	43,8	57,7	57,9	59,9	58,8	60,6
% DHA										
Bình 1	41,1	38,0	47,6	47,1	36,6	45,1	46,0	44,6	43,8	38,0
Bình 2	40,2	40,8	40,0	46,7	39,0	45,5	45,1	45,9	46,7	40,2
Trung bình	40,7	39,4	43,8	46,9	37,8	45,3	45,5	45,2	45,2	39,1
DHA (mg/g)										
Bình 1	172,7	157,5	270,6	311,0	157,7	259,4	264,6	264,2	247,3	222,3
Bình 2	177,2	132,8	179,6	290,9	169,2	257,3	257,1	271,7	278,5	246,0
Trung bình	175,0	145,2	225,1	300,9	163,5	258,4	260,9	267,9	262,9	234,2
% chất béo (theo mg/g)										
Bình 1	42,0	41,4	56,9	66,0	43,1	57,5	57,5	59,3	56,5	58,5
Bình 2	44,1	32,5	44,9	62,3	43,4	56,6	57,0	59,2	59,7	61,3
Trung bình	43,0	37,0	50,9	64,1	43,2	57,0	57,3	59,3	58,1	59,9
Chất béo										

(g/l)										
Bình 1	1,1	1,0	2,4	3,0	1,1	2,2	2,2	2,3	2,1	2,3
Bình 2	1,2	1,0	1,3	2,7	1,2	2,1	2,2	2,4	2,5	2,7
Trung bình	1,1	1,0	1,8	2,9	1,1	2,2	2,2	2,3	2,3	2,5
Hiệu suất DHA (g/l)										
Bình 1	0,4	0,4	1,1	1,4	0,4	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9
Bình 2	0,5	0,4	0,5	1,3	0,5	1,0	1,0	1,1	1,2	1,1
Trung bình	0,5	0,4	0,8	1,3	0,4	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
% EPA										
Bình 1	22,8	27,1	17,8	16,7	29,2	21,6	20,0	21,9	22,2	31,3
Bình 2	24,5	24,4	26,7	19,5	26,3	21,0	20,9	20,5	19,2	28,5
Trung bình	23,6	25,7	22,3	18,1	27,7	21,3	20,4	21,2	20,7	29,9
EPA (mg/g)										
Bình 1	94,9	111,3	100,5	109,1	124,9	123,0	114,1	128,8	124,1	181,9
Bình 2	106,9	78,5	118,8	120,4	113,0	118,1	117,9	120,4	113,7	173,2
Trung bình	100,9	94,9	109,7	114,7	119,0	120,5	116,0	124,6	118,9	177,6
Hiệu suất EPA (g/l)										
Bình 1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,7
Bình 2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,8
Trung bình	0,3	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,7
L-F DW (g/l)										
Bình 1	1,5	1,5	1,8	1,5	1,4	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Bình 2	1,5	2,1	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7
Trung bình	1,5	1,8	1,7	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7
% 16:0										

Bình 1	24,1	23,1	22,7	24,5	22,4	21,6	22,3	21,7	22,3	17,8
Bình 2	23,6	23,1	21,6	22,0	22,9	21,8	22,5	21,9	22,2	18,4
Trung bình	23,9	23,1	22,1	23,3	22,7	21,7	22,4	21,8	22,2	18,1
% DPA n-3										
Bình 1	1,5	1,4	1,2	1,2	1,5	1,1	1,2	1,1	1,1	1,4
Bình 2	1,5	1,3	1,5	1,1	1,4	1,1	1,1	1,1	1,2	1,3
Trung bình	1,5	1,4	1,4	1,2	1,5	1,1	1,2	1,1	1,1	1,3
% DPA n-6										
Bình 1	1,6	1,2	2,4	2,3	1,1	2,1	2,2	2,0	1,9	1,2
Bình 2	1,5	1,6	1,4	2,2	1,3	2,1	2,1	2,2	2,2	1,4
Trung bình	1,5	1,4	1,9	2,3	1,2	2,1	2,1	2,1	2,1	1,3
% omega-3 toàn phần										
Bình 1	65,4	66,6	66,6	65,0	67,3	67,8	67,2	67,6	67,0	70,7
Bình 2	66,2	66,5	68,2	67,3	66,8	67,6	67,0	67,5	67,1	70,0
Trung bình	65,8	66,5	67,4	66,2	67,0	67,7	67,1	67,5	67,0	70,3
Độ pH										
Bình 1	6,83	6,84	6,82	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,86	6,85
Bình 2	6,82	6,84	6,81	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,84	6,85
Trung bình	6,83	6,84	6,82	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,85	6,85

Ví dụ 12

Số truy cập ATCC PTA-10208 các gradien vitamin B12 ở điều kiện 10% CO2

Các thử nghiệm được thực hiện để xác định nồng độ của vitamin B12 mà tạo ra sự sinh trưởng PTA-10208 và năng suất EPA tối ưu.

Nhiệt độ: 23°C

Tốc độ lắc: 200 vòng/phút

Môi trường cơ bản: SDFM-O xác định (DSDFM-O)

Chất chủng: làm tan lọ chứa PTA-10208 trong SDFM-O ở điều kiện xung quanh. Chuyển 2ml môi trường nuôi cấy vào 48ml DSDFM-O ở 10% CO₂. Chuyển môi trường nuôi cấy vào DSDFM-O mới (10% CO₂) (xem bảng 22). Chuyển môi trường nuôi cấy vào DSDFM-O mới (10% CO₂). Sử dụng môi trường nuôi cấy để chủng trong thử nghiệm gradien vitamin B12 tuần #1 (2ml/bình) (10% CO₂).

Thiết lập thử nghiệm:

Tất cả các môi trường nuôi cấy được nuôi trong 50ml bình lắc và bộ hai bình thốt cổ này được nuôi trong mỗi điều kiện. PTA-10208 được chủng vào các gradien vitamin B12 9 ngày trong DSDFM-O (không có taston) mỗi 7 ngày. Chất chủng cho mỗi nồng độ vitamin B12 được duy trì trong toàn bộ thời gian thử nghiệm. Bằng cách tiếp tục chuyển PTA-10208 ở các nồng độ vitamin B12 giảm, lượng dư vitamin B12 được rửa sạch hiệu quả khỏi tế bào. Chất chủng cho mỗi nồng độ vitamin B12 được chuyển mỗi 7 ngày. Chất chủng 4 ngày tuổi được sử dụng để bắt đầu mỗi gradien vitamin B12 9 ngày. Mỗi gradien 9 ngày được gắn nhãn liên tiếp là bộ thử nghiệm A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, và K dưới đây trong bảng 23. Trước mỗi lần chủng gradien, mật độ quang được đo cho mỗi nồng độ vitamin B12 để chuyển một cách thích hợp cùng một lượng tế bào. Sau 9 ngày phát triển, tất cả các môi trường nuôi cấy được thu hoạch để đo độ pH, khối lượng khô, và profin axit béo. Thử nghiệm này được kết thúc khi khối lượng khô ở mỗi nồng độ vitamin B12 được phát hiện ra là đã ổn định trong ít nhất là 2 gradien 9 ngày liên tiếp.

Bảng 22. Môi trường của thiết bị lên men với tỉ lệ thu nhỏ cho Orca (DSDFM-O)

Thành phần	Lượng trong mỗi lit (g)	[góc] (g/l)	ml chất gốc để sử dụng trong mỗi lit		g/l		Mg	Ca	Cl	mg/l	Cu	Mn	Co	Zn
NaCl	0,625	Khô							0,38					
Na2SO4	7,52	Khô												
K2SO4	0,1	50	2ml			0,04								
KCl	1	50	20ml			0,52			0,48					
MgSO4.7H2O	5	227	22ml				0,47							
(NH4)2SO4	0,217	190	1,14 ml											
CaCl2.2H2O	0,29	Khô						0,08	0,14					
MSG monohydrat	2,16	Khô												
HEPES (100mM) độ pH=7	23,8	Khô												
KH2PO4	0,136	56,5	2,4	Bổ sung vào sau khi hấp		0,04								
Glucosa	50	500	100ml	Bổ sung vào sau khi hấp										
Dung dịch xitrat-Fe		xem dưới đây	10ml	bổ sung vào sau khi hấp										
Vết kim loại		xem dưới đây	1ml	bổ sung vào sau khi hấp										
Vitamin		xem dưới đây	1ml	bổ sung vào sau khi hấp										
Dung dịch xitrat-Fe														

Bảng 23

[] Vitamin B12	mg/l Vitamin B12
5x	3,84
1x	0,77
1/2x	0,38
1/5x	0,15
1/10x	0,077
1/20x	0,038
1/50x	0,015
1/100x	0,0077
1/500x	0,0015
0x	0

7 Gradien vitamin B12 liên tiếp từ 5x đến 1/500x được thực hiện. Khi kết thúc thử nghiệm cuối cùng, một thử nghiệm mới được bắt đầu, so sánh sự sinh trưởng PTA-10208 và sản xuất EPA ở 1/500x (0,0015mg/l) và 0x (0mg/l Vitamin B12). 4 thử nghiệm vitamin B12 liên tục 1/500x đến 0x được thực hiện.

Kết quả:

(Đối với 5x --> 1/500x Vitamin B12): Đối với 7 thử nghiệm 9 ngày liên tục, khối lượng khô PAT-10208, % EPA, % DHA, % chất béo, và hiệu suất EPA không thay đổi ở nồng độ vitamin B12 nằm trong khoảng từ 5x (3,84mg/l) đến 1/500x (0,0015mg/l).

(Đối với 1/500x và 0x Vitamin B12): Các kết quả trong toàn bộ 4 thử nghiệm 9 ngày liên tục chỉ ra rằng PTA-10208 được nuôi trong DSDFM-O chứa 0mg/l Vitamin B12 có % EPA lớn hơn nhiều so với khi được nuôi với chỉ 1/500x (0,0015mg/l) Vitamin B12. Trong khi đó % EPA tăng từ khoảng 18% với 1/500x (0,0015mg/l) Vitamin B12 đến khoảng 27% không có bất kỳ lượng Vitamin B12

nào, % DHA giảm từ khoảng 45% với 1/500x (0,0015mg/l) Vitamin B12 đến khoảng 36% không có Vitamin B12. Khối lượng khô PTA-10208 và % chất béo tăng nhẹ khi Vitamin B12 được loại bỏ hoàn toàn khỏi DSDFM-O. Kết quả của sự tăng % EPA và sự tăng nhẹ khối lượng khô và % chất béo là hiệu suất EPA PTA-10208 EPA tăng khoảng 60% khi Vitamin B12 được loại bỏ khỏi DSDFM-O.

Các kết quả được chỉ ra trong các Fig. 20 – 49 và trong bảng dưới đây.

Thử nghiệm		600nm						g/L
Bộ	Mẫu	Inoc. O.D.	mg/l Vit B12	Độ pH	Tare (g)	Out wt (g)	Khối lượng pelet khô (g)	Sinh khối
A	5x (1)		3,84	6,80	10,4757	10,723	0,2473	4,95
	5x (2)		3,84	6,80	10,4534	10,689	0,2356	4,71
	1x (1)		0,77	6,80	10,5142	10,7449	0,2307	4,61
	1x (2)		0,77	6,81	10,431	10,6512	0,2202	4,40
	1/2x (1)		0,38	6,82	10,5684	10,7882	0,2198	4,40
	1/2x (2)		0,38	6,82	10,6373	10,8691	0,2318	4,64
	1/5x (1)		0,15	6,81	10,5044	10,7348	0,2304	4,61
	1/5x (2)		0,15	6,82	10,5219	10,747	0,2251	4,50
	1/10x (1)		0,077	6,83	10,5221	10,7481	0,226	4,52
	1/10x (2)		0,077	6,83	10,4705	10,6979	0,2274	4,55
	1/20x (1)		0,038	6,83	10,4743	10,6988	0,2245	4,49
	1/20x (2)		0,038	6,83	10,7322	10,9646	0,2324	4,65
	1/50x (1)		0,015	6,84	10,4777	10,6945	0,2168	4,34
	1/50x (2)		0,015	6,85	10,4766	10,7018	0,2252	4,50
	1/100x (1)		0,0077	6,84	10,4543	10,6863	0,232	4,64
	1/100x (2)		0,0077	6,85	10,5041	10,7452	0,2411	4,82
	1/500x (1)		0,0015	6,86	10,5152	10,7563	0,2411	4,82
	1/500x (2)		0,0015	6,85	10,574	10,8081	0,2341	4,68
B	5x (1)	4,0445	3,84	6,63	10,5021	10,7338	0,2317	4,63
	5x (2)	4,0445	3,84	6,65	10,4735	10,7152	0,2417	4,83
	1x (1)	4,3024	0,77	6,64	10,5011	10,7394	0,2383	4,77

**Thử
nghiệm**

Bộ	Mẫu	600nm		Độ pH	Tare (g)	Out wt (g)	g/L	
		Inoc. O.D.	mg/l Vit B12				Khối lượng pelet khô (g)	Sinh khối
	1x (2)	4,3024	0,77	6,65	10,4004	10,6362	0,2358	4,72
	1/2x (1)	4,1648	0,38	6,64	10,4599	10,71	0,2501	5,00
	1/2x (2)	4,1648	0,38	6,64	10,5630	10,804	0,241	4,82
	1/5x (1)	4,1600	0,15	6,63	10,6521	10,889	0,2369	4,74
	1/5x (2)	4,1600	0,15	6,63	10,5032	10,7341	0,2309	4,62
	1/10x (1)	4,4997	0,077	6,65	10,4726	10,6998	0,2272	4,54
	1/10x (2)	4,4997	0,077	6,64	10,4841	10,7279	0,2438	4,88
	1/20x (1)	4,9716	0,038	6,64	10,3785	10,6112	0,2327	4,65
	1/20x (2)	4,9716	0,038	6,64	10,3832	10,6154	0,2322	4,64
	1/50x (1)	4,3049	0,015	6,65	10,3782	10,612	0,2338	4,68
	1/50x (2)	4,3049	0,015	6,65	10,5546	10,7877	0,2331	4,66
	1/100x							
	(1)	4,6035	0,0077	6,65	10,4858	10,7172	0,2314	4,63
	1/100x							
	(2)	4,6035	0,0077	6,66	10,4771	10,7122	0,2351	4,70
	1/500x							
	(1)	4,4494	0,0015	6,65	10,6083	10,8163	0,208	4,16
	1/500x							
	(2)	4,4494	0,0015	6,65	10,5722	10,7896	0,2174	4,35
C	5x (1)	4,1784	3,84	6,77	10,4842	10,7237	0,2395	4,79
	5x (2)	4,1784	3,84	6,80	10,5261	10,7553	0,2292	4,58
	1x (1)	4,2842	0,77	6,80	10,3785	10,6194	0,2409	4,82
	1x (2)	4,2842	0,77	6,77	10,6083	10,8459	0,2376	4,75
	1/2x (1)	4,8865	0,38	6,81	10,5274	10,7183	0,1909	3,82
	1/2x (2)	4,8865	0,38	6,81	10,4713	10,6853	0,214	4,28
	1/5x (1)	4,5411	0,15	6,81	10,3831	10,5997	0,2166	4,33
	1/5x (2)	4,5411	0,15	6,84	10,5444	10,7666	0,2222	4,44
	1/10x (1)	5,2960	0,077	6,80	10,501	10,7181	0,2171	4,34
	1/10x (2)	5,2960	0,077	6,82	10,3783	10,5978	0,2195	4,39
	1/20x (1)	5,2480	0,038	6,82	10,4521	10,6539	0,2018	4,04
	1/20x (2)	5,2480	0,038	6,83	10,4018	10,5881	0,1863	3,73
	1/50x (1)	5,6680	0,015	6,82	10,5049	10,7248	0,2199	4,40
	1/50x (2)	5,6680	0,015	6,83	10,4197	10,6441	0,2244	4,49
	1/100x							
	(1)	4,9024	0,0077	6,83	10,5531	10,7847	0,2316	4,63

Thử nghiệm		600nm						g/L
Bộ	Mẫu	Inoc. O.D.	mg/l Vit B12	Độ pH	Tare (g)	Out wt (g)	Khối lượng pelet khô (g)	Sinh khối
	1/100x							
	(2)	4,9024	0,0077	6,83	10,7098	10,9412	0,2314	4,63
	1/500x							
	(1)	4,6011	0,0015	6,83	10,5543	10,7942	0,2399	4,80
	1/500x							
	(2)	4,6011	0,0015	6,83	10,3382	10,5746	0,2364	4,73
D	5x (1)	4,3297	3,84	6,85	10,3415	10,5976	0,2561	5,12
	5x (2)	4,3297	3,84	6,85	10,4549	10,698	0,2431	4,86
	1x (1)	5,3731	0,77	6,85	10,3785	10,6143	0,2358	4,72
	1x (2)	5,3731	0,77	6,85	10,6117	10,8401	0,2284	4,57
	1/2x (1)	4,9040	0,38	6,85	10,4318	10,6573	0,2255	4,51
	1/2x (2)	4,9040	0,38	6,85	10,6572	10,8742	0,217	4,34
	1/5x (1)	4,7084	0,15	6,85	10,552	10,7791	0,2271	4,54
	1/5x (2)	4,7084	0,15	6,85	10,7118	10,9623	0,2505	5,01
	1/10x (1)	4,9843	0,077	6,85	10,6174	10,8589	0,2415	4,83
	1/10x (2)	4,9843	0,077	6,86	10,5229	10,7614	0,2385	4,77
	1/20x (1)	4,7533	0,038	6,84	10,5045	10,7446	0,2401	4,80
	1/20x (2)	4,7533	0,038	6,84	10,5049	10,7281	0,2232	4,46
	1/50x (1)	4,3732	0,015	6,86	10,5161	10,7566	0,2405	4,81
	1/50x (2)	4,3732	0,015	6,85	10,5234	10,7574	0,234	4,68
	1/100x							
	(1)	4,0902	0,0077	6,86	10,4858	10,7193	0,2335	4,67
	1/100x							
	(2)	4,0902	0,0077	6,86	10,5523	10,7856	0,2333	4,67
	1/500x							
	(1)	4,2472	0,0015	6,86	10,553	10,8032	0,2502	5,00
	1/500x							
	(2)	4,2472	0,0015	6,86	10,4488	10,6976	0,2488	4,98
E	5x (1)	4,5635	3,84	6,79	10,3613	10,6103	0,249	4,98
	5x (2)	4,5635	3,84	6,80	10,5311	10,7546	0,2235	4,47
	1x (1)	4,2673	0,77	6,80	10,3311	10,5651	0,234	4,68
	1x (2)	4,2673	0,77	6,80	10,466	10,7162	0,2502	5,00
	1/2x (1)	5,1989	0,38	6,79	10,6796	10,9054	0,2258	4,52
	1/2x (2)	5,1989	0,38	6,80	10,5552	10,7836	0,2284	4,57

Thử nghiệm		600nm						g/L
Bộ	Mẫu	Inoc. O.D.	mg/l Vit B12	Độ pH	Tare (g)	Out wt (g)	Khối lượng pelet khô (g)	Sinh khối
	1/5x (1)	5,0275	0,15	6,80	10,4877	10,721	0,2333	4,67
	1/5x (2)	5,0275	0,15	6,80	10,5061	10,7331	0,227	4,54
	1/10x (1)	5,6680	0,077	6,81	10,3585	10,5946	0,2361	4,72
	1/10x (2)	5,6680	0,077	6,80	10,6807	10,9116	0,2309	4,62
	1/20x (1)	5,2891	0,038	6,81	10,3664	10,6143	0,2479	4,96
	1/20x (2)	5,2891	0,038	6,81	10,3745	10,6253	0,2508	5,02
	1/50x (1)	5,0356	0,015	6,81	10,4285	10,682	0,2535	5,07
	1/50x (2)	5,0356	0,015	6,80	10,4022	10,6524	0,2502	5,00
	1/100x							
	(1)	5,7271	0,0077	6,81	10,3332	10,5937	0,2605	5,21
	1/100x							
	(2)	5,7271	0,0077	6,81	10,525	10,7782	0,2532	5,06
	1/500x							
	(1)	5,1000	0,0015	6,81	10,4192	10,6785	0,2593	5,19
	1/500x							
	(2)	5,1000	0,0015	6,81	10,3991	10,6668	0,2677	5,70
F	5x (1)	4,5635	3,84	6,75	10,524	10,7696	0,2456	5,23
	5x (2)	4,5635	3,84	6,75	10,3291	10,5729	0,2438	4,88
	1x (1)	4,2673	0,77	6,75	10,4927	10,7424	0,2497	4,99
	1x (2)	4,2673	0,77	6,76	10,5257	10,7652	0,2395	4,79
	1/2x (1)	5,1989	0,38	6,75	10,463	10,6908	0,2278	4,56
	1/2x (2)	5,1989	0,38	6,76	10,3756	10,6003	0,2247	4,49
	1/5x (1)	5,0275	0,15	6,76	10,4212	10,6704	0,2492	4,98
	1/5x (2)	5,0275	0,15	6,76	10,5061	10,7509	0,2448	4,90
	1/10x (1)	5,6680	0,077	6,76	10,3829	10,6062	0,2233	4,47
	1/10x (2)	5,6680	0,077	6,76	10,3651	10,6068	0,2417	4,83
	1/20x (1)	5,2891	0,038	6,75	10,5096	10,7442	0,2346	4,69
	1/20x (2)	5,2891	0,038	6,77	10,3875	10,6226	0,2351	4,70
	1/50x (1)	5,0356	0,015	6,78	10,3584	10,6063	0,2479	4,96
	1/50x (2)	5,0356	0,015	6,76	10,5235	10,7671	0,2436	4,87
	1/100x							
	(1)	5,7271	0,0077	6,77	10,3664	10,6148	0,2484	4,97
	1/100x							
	(2)	5,7271	0,0077	6,78	10,5055	10,7441	0,2386	4,77
	1/500x	5,1000	0,0015	6,79	10,3322	10,5868	0,2546	5,09

Thử nghiệm		600nm						g/L
Bộ	Mẫu	Inoc. O.D.	mg/l Vit B12	Độ pH	Tare (g)	Out wt (g)	Khối lượng pelet khô (g)	Sinh khối
	(1)							
	1/500x							
	(2)	5,1000	0,0015	6,80	10,3279	10,591	0,2631	5,26
G	5x (1)	3,7017	3,84	6,83	10,362	10,6077	0,2457	4,91
	5x (2)	3,7017	3,84	6,82	10,3595	10,6145	0,255	5,10
	1x (1)	4,2905	0,77	6,84	10,3648	10,6151	0,2503	5,01
	1x (2)	4,2905	0,77	6,85	10,3356	10,5972	0,2616	5,23
	1/2x (1)	4,4548	0,38	6,84	10,5096	10,7683	0,2587	5,17
	1/2x (2)	4,4508	0,38	6,84	10,435	10,6889	0,2539	5,08
	1/5x (1)	4,6844	0,15	6,84	10,3305	10,5868	0,2563	5,13
	1/5x (2)	4,6844	0,15	6,85	10,4964	10,7476	0,2512	5,02
	1/10x (1)	5,8389	0,077	6,85	10,3637	10,6173	0,2536	5,07
	1/10x (2)	5,8389	0,077	6,85	10,3351	10,5881	0,253	5,06
	1/20x (1)	4,4483	0,038	6,85	10,4393	10,6958	0,2565	5,13
	1/20x (2)	4,4483	0,038	6,86	10,3798	10,6416	0,2618	5,24
	1/50x (1)	3,9821	0,015	6,86	10,3619	10,619	0,2571	5,14
	1/50x (2)	3,9821	0,015	6,87	10,5179	10,7721	0,2542	5,08
	1/100x							
	(1)	5,0043	0,0077	6,87	10,4756	10,7288	0,2532	5,06
	1/100x							
	(2)	5,0043	0,0077	6,87	10,4993	10,7561	0,2568	5,14
	1/500x							
	(1)	5,0108	0,0015	6,88	10,434	10,6941	0,2601	5,20
	1/500x							
	(2)	5,0108	0,0015	6,87	10,3896	10,6446	0,255	5,10
H	1/500x							
	(1)	4,6921	0,0015	6,85	10,3599	10,5954	0,2355	4,71
	1/500x							
	(2)	4,6921	0,0015	6,85	10,3720	10,6254	0,2534	5,07
	0x (1)	4,8144	0,0000	6,85	10,3624	10,6052	0,2428	4,86
0x (2)	4,8144	0,0000	6,86	10,3585	10,6093	0,2508	5,02	
I	1/500x							
	(1)	4,7906	0,0015	6,89	10,5492	10,7920	0,2428	4,86
	1/500x	4,7906	0,0015	6,90	10,5958	10,8508	0,255	5,10

Thử nghiệm		600nm						g/L	
Bộ	Mẫu	Inoc. O.D.	mg/l Vit B12	Độ pH	Tare (g)	Out wt (g)	Khối lượng pelet khô (g)	Sinh khối	
	(2)								
	0x (1)	4,7063	0,0000	6,89	10,5505	10,8037	0,2532	5,06	
	0x (2)	4,7063	0,0000	6,89	10,5120	10,7693	0,2573	5.15	
J	1/500x								
	(1)	5,8805	0,0015	6,99	10,5433	10,8089	0,2656	5,31	
	1/500x								
	(2)	5,8805	0,0015	7,00	10,5974	10,8714	0,274	5,48	
	0x (1)	4,6385	0,0000	7,00	10,5509	10,8145	0,2636	5,27	
	0x (2)	4,6385	0,0000	6,98	10,5462	10,8252	0,279	5,58	
K	1/500x								
	(1)	4,7133	0,0015	6,87	10,5424	10,8085	0,2661	5,32	
	1/500x								
	(2)	4,7133	0,0015	6,88	10,3444	10,6111	0,2667	5,33	
	0x (1)	4,2141	0,0000	6,86	10,3873	10,6587	0,2714	5,43	
	0x (2)	4,2141	0,0000	6,86	10,4188	10,6866	0,2678	5,36	

Thử nghiệm		%	%	%	(n-6)	(n-3)	%	%
Bộ	Mẫu	16:0	ARA	EPA	DPA	DPA	DHA	Chất béo
A	5x (1)	27,53	1,67	16,01	2,22	2,33	41,72	67,22
	5x (2)	27,65	1,71	16,02	2,16	2,41	41,17	66,07
	1x (1)	27,73	1,72	16,00	2,15	2,44	41,06	66,25
	1x (2)	27,72	1,75	16,32	2,10	2,48	40,46	65,42
	1/2x							
	(1)	27,86	1,74	16,36	2,09	2,49	40,54	65,45
	1/2x							
	(2)	27,73	1,77	16,53	2,14	2,32	40,93	66,57
	1/5x							
	(1)	27,60	1,73	16,33	2,13	2,38	41,03	66,59
	1/5x							
	(2)	27,88	1,74	15,94	2,7	2,43	41,04	66,28
	1/10x							
	(1)	27,87	1,75	16,28	2,09	2,56	40,66	65,14
	1/10x	27,81	1,74	16,07	2,13	2,48	40,96	65,39

Thử nghiệm		%	%	%	(n-6)	(n-3)	%	%
Bộ	Mẫu	16:0	ARA	EPA	DPA	DPA	DHA	Chất béo
	(2)							
	1/20x							
	(1)	27,70	1,75	16,36	2,08	2,52	40,53	65,64
	1/20x							
	(2)	27,63	1,75	16,42	2,13	2,36	40,93	66,30
	1/50x							
	(1)	27,83	1,76	16,61	2,07	2,43	40,60	66,02
	1/50x							
	(2)	27,82	1,69	16,35	2,11	2,49	40,84	64,97
	1/100x							
	(1)	27,50	1,72	16,13	2,16	2,50	41,19	66,21
	1/100x							
	(2)	27,60	1,69	15,64	2,24	2,34	41,72	66,56
	1/500x							
	(1)	27,58	1,70	15,63	2,24	2,28	41,74	66,99
	1/500x							
	(2)	27,57	1,75	16,86	2,06	2,41	40,59	64,91
B	5x (1)	28,30	1,75	16,44	2,32	2,35	42,35	64,09
	5x (2)	28,45	1,74	15,96	2,36	2,36	42,62	62,46
	1x (1)	28,55	1,74	16,10	2,32	2,43	42,35	62,96
	1x (2)	28,47	1,78	16,33	2,33	2,44	42,26	63,13
	1/2x							
	(1)	28,21	1,71	15,90	2,39	2,34	42,95	64,75
	1/2x							
	(2)	28,15	1,75	16,65	2,29	2,33	42,32	63,50
	1/5x							
	(1)	28,51	1,74	16,34	2,29	2,37	42,23	62,02
	1/5x							
	(2)	28,43	1,75	16,35	2,29	2,48	42,24	63,88
	1/10x							
	(1)	28,66	1,77	15,85	2,37	2,45	42,45	62,47
	1/10x							
	(2)	28,52	1,74	15,74	2,40	2,39	42,70	63,14
	1/20x							
	(1)	28,67	1,75	15,86	2,33	2,37	42,55	63,10
	1/20x	28,36	1,75	16,13	2,35	2,26	42,62	63,90

Thử nghiệm		%	%	%	(n-6)	(n-3)	%	%
Bộ	Mẫu	16:0	ARA	EPA	DPA	DPA	DHA	Chất béo
	(2)							
	1/50x							
	(1)	28,36	1,79	16,64	2,29	2,42	42,04	62,31
	1/50x							
	(2)	28,43	1,77	15,92	2,40	2,42	42,57	62,77
	1/100x							
	(1)	28,81	1,75	16,01	2,30	2,49	42,16	61,70
	1/100x							
	(2)	28,61	1,73	15,93	2,35	2,40	42,51	63,60
	1/500x							
	(1)	28,62	1,85	17,15	2,17	2,59	41,19	60,91
	1/500x							
	(2)	28,30	1,84	17,39	2,20	2,43	41,40	61,56
C	5x (1)	27,97	1,95	16,08	2,60	2,43	42,37	67,30
	5x (2)	28,24	1,96	15,99	2,55	2,54	42,02	66,72
	1x (1)	28,20	1,94	15,96	2,60	2,61	42,06	66,98
	1x (2)	28,10	1,98	16,39	2,54	2,64	41,73	66,30
	1/2x							
	(1)	27,77	2,14	17,67	2,40	2,85	40,46	64,53
	1/2x							
	(2)	27,84	2,10	17,27	2,50	2,62	40,85	65,79
	1/5x							
	(1)	27,57	2,06	17,37	2,46	2,64	41,17	66,69
	1/5x							
	(2)	27,71	2,05	17,05	2,50	2,70	41,31	65,86
	1/10x							
	(1)	28,02	2,06	16,89	2,48	2,70	41,27	65,53
	1/10x							
	(2)	27,66	2,05	16,76	2,55	2,64	41,66	65,85
	1/20x							
	(1)	27,64	2,13	17,27	2,52	2,74	41,03	65,00
	1/20x							
	(2)	27,56	2,19	18,62	2,27	2,88	39,82	64,23
	1/50x							
	(1)	27,78	2,02	16,98	2,51	2,52	41,61	66,22
	1/50x	27,82	2,01	16,92	2,53	2,65	41,47	65,85

Thử nghiệm		%	%	%	(n-6)	(n-3)	%	%
Bộ	Mẫu	16:0	ARA	EPA	DPA	DPA	DHA	Chất béo
	(2)							
	1/100x							
	(1)	27,85	2,01	16,77	2,54	2,67	41,50	65,23
	1/100x							
	(2)	27,91	2,01	16,61	2,58	2,59	41,72	66,87
	1/500x							
	(1)	27,73	2,02	17,42	2,41	2,58	41,10	65,60
	1/500x							
	(2)	27,48	2,05	17,93	2,39	2,54	40,85	65,85
D	5x (1)	27,80	1,85	15,97	2,59	2,32	42,99	67,08
	5x (2)	27,89	1,86	16,27	2,52	2,42	42,60	66,60
	1x (1)	27,60	1,92	16,59	2,54	2,53	42,42	66,32
	1x (2)	27,75	1,89	16,40	2,53	2,48	42,60	66,35
	1/2x							
	(1)	27,35	1,98	17,19	2,52	2,53	41,97	65,19
	1/2x							
	(2)	27,26	2,01	17,65	2,45	2,45	41,58	66,67
	1/5x							
	(1)	27,42	1,97	17,53	2,42	2,55	41,72	66,69
	1/5x							
	(2)	27,46	1,91	16,60	2,60	2,45	42,44	66,58
	1/10x							
	(1)	27,45	1,97	17,03	2,50	2,61	42,04	66,06
	1/10x							
	(2)	27,45	1,90	16,66	2,52	2,46	42,46	66,91
	1/20x							
	(1)	27,45	1,96	16,95	2,58	2,41	42,11	66,10
	1/20x							
	(2)	27,30	2,00	17,94	2,42	2,45	41,50	65,30
	1/50x							
	(1)	27,58	1,87	16,65	2,55	2,33	42,61	66,84
	1/50x							
	(2)	27,69	1,89	16,85	2,50	2,44	42,27	65,40
	1/100x							
	(1)	27,44	1,92	16,88	2,51	2,51	42,38	65,88
	1/100x	27,47	1,92	16,67	2,58	2,43	42,56	65,83

Thử nghiệm		%	%	%	(n-6)	(n-3)	%	%
Bộ	Mẫu	16:0	ARA	EPA	DPA	DPA	DHA	Chất béo
	(2)							
	1/500x							
	(1)	26,91	1,98	18,05	2,40	2,47	41,66	66,18
	1/500x							
	(2)	27,03	1,99	18,08	2,40	2,36	41,69	65,80
E	5x (1)	27,46	1,89	16,02	2,60	2,30	43,33	66,12
	5x (2)	27,86	1,93	16,05	2,50	2,38	43,02	63,64
	1x (1)	27,75	1,95	15,91	2,58	2,39	43,09	65,41
	1x (2)	27,51	1,94	15,59	2,72	2,29	43,52	67,35
	1/2x							
	(1)	27,07	2,04	16,99	2,52	2,42	42,64	65,01
	1/2x							
	(2)	26,86	2,05	17,23	2,48	2,35	42,59	65,00
	1/5x							
	(1)	27,05	1,96	16,65	2,55	2,29	43,21	65,66
	1/5x							
	(2)	27,12	1,98	16,69	2,52	2,41	43,08	63,58
	1/10x							
	(1)	27,35	1,95	16,45	2,55	2,48	42,94	64,34
	1/10x							
	(2)	27,31	1,92	16,22	2,60	2,41	43,24	64,49
	1/20x							
	(1)	26,72	1,93	16,73	2,64	2,31	43,21	65,83
	1/20x							
	(2)	26,47	1,94	17,11	2,65	2,21	43,14	66,13
	1/50x							
	(1)	26,63	1,86	16,30	2,72	2,19	43,84	65,30
	1/50x							
	(2)	26,68	1,86	16,33	2,69	2,26	43,76	65,67
	1/100x							
	(1)	26,47	1,87	16,39	2,69	2,28	43,89	63,98
	1/100x							
	(2)	26,45	1,89	16,78	2,62	2,38	43,49	65,21
	1/500x							
	(1)	26,06	1,88	17,13	2,60	2,23	43,73	66,13

Thử nghiệm		%	%	%	(n-6)	(n-3)	%	%
Bộ	Mẫu	16:0	ARA	EPA	DPA	DPA	DHA	Chất béo
	1/500x							
	(2)	25,95	1,88	17,58	2,57	2,10	43,40	65,46
F	5x (1)	25,71	1,96	17,50	2,46	2,34	43,56	65,46
	5x (2)	25,91	1,93	17,26	2,47	2,38	43,73	65,71
	1x (1)	25,93	1,90	16,70	2,54	2,43	43,93	66,05
	1x (2)	26,03	1,94	17,17	2,48	2,39	43,41	65,34
	1/2x							
	(1)	25,76	2,03	18,11	2,43	2,38	42,76	65,27
	1/2x							
	(2)	25,74	2,05	18,52	2,37	2,31	42,52	65,75
	1/5x							
	(1)	25,44	1,95	17,62	2,49	2,27	43,73	65,80
	1/5x							
	(2)	25,41	1,94	17,35	2,52	2,32	43,99	65,88
	1/10x							
	(1)	26,13	2,04	18,06	2,36	2,55	42,43	64,10
	1/10x							
	(2)	25,62	1,98	17,53	2,48	2,44	43,52	65,51
	1/20x							
	(1)	25,77	2,01	17,97	2,45	2,34	42,94	65,21
	1/20x							
	(2)	25,55	2,03	18,45	2,42	2,24	42,78	66,05
	1/50x							
	(1)	25,26	1,96	17,54	2,55	2,18	44,07	66,41
	1/50x							
	(2)	25,48	1,95	17,58	2,50	2,30	43,72	65,93
	1/100x							
	(1)	25,50	1,93	17,00	2,62	2,23	44,36	65,37
	1/100x							
	(2)	25,59	1,96	17,37	2,56	2,26	43,80	65,18
	1/500x							
	(1)	25,54	1,99	18,11	2,45	2,20	43,08	65,05
	1/500x							
	(2)	25,55	2,00	18,59	2,36	2,18	42,66	64,57
G	5x (1)	25,74	1,95	17,58	2,37	2,08	43,04	63,68

Thử nghiệm		%	%	%	(n-6)	(n-3)	%	%
Bộ	Mẫu	16:0	ARA	EPA	DPA	DPA	DHA	Chất béo
	5x (2)	25,79	1,89	16,83	2,51	2,04	43,69	63,67
	1x (1)	26,01	1,90	16,69	2,52	2,08	43,42	64,95
	1x (2)	25,71	1,91	16,74	2,57	1,98	43,85	65,37
	1/2x							
	(1)	25,47	1,93	17,14	2,52	1,97	43,69	64,28
	1/2x							
	(2)	25,68	1,95	17,80	2,42	1,94	42,76	64,15
	1/5x							
	(1)	25,63	1,94	17,43	2,46	2,02	43,21	63,70
	1/5x							
	(2)	25,86	1,91	17,03	2,47	2,04	43,16	64,14
	1/10x							
	(1)	26,34	1,95	17,09	2,48	2,14	42,35	63,27
	1/10x							
	(2)	26,24	1,93	16,79	2,52	2,04	42,93	64,71
	1/20x							
	(1)	25,47	1,97	18,06	2,37	2,12	42,62	63,38
	1/20x							
	(2)	25,38	1,98	18,16	2,40	1,95	42,73	62,81
	1/50x							
	(1)	25,46	1,94	18,06	2,37	2,02	42,72	63,38
	1/50x							
	(2)	25,50	1,94	17,46	2,46	2,04	43,15	63,66
	1/100x							
	(1)	25,52	1,92	16,69	2m60	1,81	44,16	65,74
	1/100x							
	(2)	25,96	1,92	17,11	2,48	1,96	43,00	63,89
	1/500x							
	(1)	25,71	1,95	17,78	2,41	1,97	42,83	64,61
	1/500x							
	(2)	25,56	2,02	18,25	2,37	1,90	42,63	64,80
H	1/500x							
	(1)	25,19	2,03	19,36	2,14	2,02	41,86	65,21
	1/500x							
	(2)	25,41	1,94	17,85	2,37	1,83	43,31	65,75
	0x (1)	21,45	2,62	27,54	1,31	2,50	35,78	67,83

Thử nghiệm		%	%	%	(n-6)	(n-3)	%	%
Bộ	Mẫu	16:0	ARA	EPA	DPA	DPA	DHA	Chất béo
	0x (2)	21,79	2,63	27,33	1,30	2,51	35,66	67,07
I	1/500x							
	(1)	25,21	2,02	19,89	2,15	2,10	41,48	64,17
	1/500x							
	(2)	25,00	2,02	20,00	2,11	2,09	41,63	64,04
	0x (1)	21,82	2,62	28,55	1,20	2,61	34,16	67,22
	0x (2)	21,66	2,64	28,83	1,18	2,55	34,20	66,93
J	1/500x							
	(1)	24,44	1,81	16,75	2,49	2,22	45,20	63,43
	1/500x							
	(2)	24,34	1,82	17,73	2,39	1,95	44,71	63,88
	0x (1)	21,56	2,58	26,96	1,30	2,60	36,04	66,74
	0x (2)	21,53	2,61	27,30	1,31	2,43	35,96	65,71
K	1/500x							
	(1)	23,87	1,82	17,33	2,46	2,00	45,45	64,67
	1/500x							
	(2)	24,07	1,82	17,67	2,42	1,93	45,06	64,30
	0x (1)	21,77	2,63	26,13	1,39	2,81	36,49	66,14
	0x (2)	21,91	2,63	27,19	1,29	2,63	35,60	66,81

Thử nghiệm		(g/l)		(g/l)	(g/l)	g B12/		
Bộ	Mẫu	Hiệu suất	mg/g	Hiệu suất	mg/g	LFDW	g LFDW	g/l chất béo
A	5x (1)	0,53	107,64	1,39	291,68	1,62	0,0024	3,32
	5x (2)	0,50	105,83	1,28	282,95	1,60	0,0024	3,11
	1x (1)	0,49	105,99	1,26	282,93	1,56	0,00049	3,06
	1x (2)	0,47	106,77	1,17	275,34	1,52	0,00051	2,88
	1/2x							
	(1)	0,47	107,06	1,17	275,98	1,52	0,00025	2,88
	1/2x							
	(2)	0,51	110,04	1,26	283,39	1,55	0,00025	3,09
	1/5x							
	(1)	0,50	108,74	1,26	284,18	1,54	0,00010	3,07

Thử nghiệm		(g/l)		(g/l)	(g/l)	g B12/		
Bộ	Mẫu	Hiệu suất EPA	mg/g EPA	Hiệu suất DHA	mg/g DHA	LFDW	g LFDW	g/l chất béo
	1/5x							
	(2)	0,48	105,63	1,22	282,95	1,52	0,00010	2,98
	1/10x							
	(1)	0,48	106,01	1,20	275,47	1,58	0,000049	2,94
	1/10x							
	(2)	0,48	105,07	1,22	278,58	1,57	0,000049	2,97
	1/20x							
	(1)	0,48	107,36	1,19	276,71	1,54	0,000025	2,95
	1/20x							
	(2)	0,51	108,87	1,26	282,24	1,57	0,000024	3,08
	1/50x							
	(1)	0,48	109,67	1,16	278,77	1,47	0,000010	2,86
	1/50x							
	(2)	0,48	106,19	1,19	275,96	1,58	0,000010	2,93
	1/100x							
	(1)	0,50	106,81	1,27	283,69	1,57	0,0000049	3,07
	1/100x							
	(2)	0,50	104,11	1,34	288,86	1,61	0,0000048	3,21
	1/500x							
	(1)	0,50	104,68	1,35	290,83	1,59	0,00000094	3,23
	1/500x							
	(2)	0,51	109,46	1,23	274,01	1,64	0,00000091	3,04
B	5x (1)	0,49	105,34	1,26	279,16	1,66	0,0023	2,97
	5x (2)	0,48	99,71	1,29	273,81	1,81	0,0021	3,02
	1x (1)	0,48	101,34	1,27	274,22	1,77	0,00044	3,00
	1x (2)	0,49	103,10	1,26	274,39	1,74	0,00044	2,98
	1/2x							
	(1)	0,52	102,99	1,39	286,04	1,76	0,00022	3,24
	1/2x							
	(2)	0,51	105,75	1,30	276,38	1,76	0,00022	3,06
	1/5x							
	(1)	0,48	101,36	1,24	269,37	1,80	0,000083	2,94
	1/5x							
	(2)	0,48	104,41	1,25	277,49	1,67	0,000090	2,95

Thử nghiệm		(g/l)		(g/l)	(g/l)	g B12/		
Bộ	Mẫu	Hiệu suất EPA	mg/g EPA	Hiệu suất DHA	mg/g DHA	LFDW	g LFDW	g/l chất béo
	1/10x							
	(1)	0,45	98,98	1,20	272,75	1,71	0,000045	2,84
	1/10x							
	(2)	0,48	99,38	1,31	277,29	1,80	0,000043	3,08
	1/20x							
	(1)	0,47	100,10	1,25	276,16	1,72	0,000022	2,94
	1/20x							
	(2)	0,48	103,06	1,26	280,15	1,68	0,000023	2,97
	1/50x							
	(1)	0,48	103,67	1,22	269,42	1,76	0,0000085	2,91
	1/50x							
	(2)	0,47	99,90	1,25	274,84	1,74	0,0000086	2,93
	1/100x							
	(1)	0,46	98,77	1,20	267,53	1,77	0,0000043	2,86
	1/100x							
	(2)	0,48	101,29	1,27	278,11	1,71	0,0000045	2,99
	1/500x							
	(1)	0,43	104,49	1,04	258,03	1,63	0,00000092	2,53
	1/500x							
	(2)	0,47	107,03	1,11	262,14	1,67	0,00000090	2,68
C	5x (1)	0,52	108,25	1,37	292,82	1,57	0,0025	3,22
	5x (2)	0,49	106,70	1,29	287,91	1,53	0,0025	3,06
	1x (1)	0,51	106,88	1,36	289,31	1,59	0,00048	3,23
	1x (2)	0,52	108,67	1,31	284,09	1,60	0,00048	3,15
	1/2x							
	(1)	0,44	114,02	1,00	268,13	1,35	0,00028	2,46
	1/2x							
	(2)	0,49	113,61	1,15	275,95	1,46	0,00026	2,82
	1/5x							
	(1)	0,50	115,85	1,19	281,94	1,44	0,00010	2,89
	1/5x							
	(2)	0,50	112,29	1,21	279,43	1,52	0,00010	2,93
	1/10x							
	(1)	0,48	110,70	1,17	277,71	1,50	0,000051	2,85

Thử nghiệm		(g/l)		(g/l)	(g/l)	g B12/		
Bộ	Mẫu	Hiệu suất EPA	mg/g EPA	Hiệu suất DHA	mg/g DHA	LFDW	g LFDW	g/l chất béo
	1/10x							
	(2)	0,48	110,39	1,20	281,73	1,50	0,000051	2,89
	1/20x							
	(1)	0,45	112,23	1,08	273,88	1,41	0,000027	2,62
	1/20x							
	(2)	0,45	119,57	0,95	262,65	1,33	0,000029	2,39
	1/50x							
	(1)	0,49	112,42	1,21	282,97	1,49	0,000010	2,91
	1/50x							
	(2)	0,50	111,40	1,23	280,41	1,53	0,000010	2,96
	1/100x							
	(1)	0,51	109,40	1,25	278,02	1,61	0,0000048	3,02
	1/100x							
	(2)	0,51	111,08	1,29	286,49	1,53	0,0000050	3,09
	1/500x							
	(1)	0,55	114,30	1,29	276,88	1,65	0,00000091	3,15
	1/500x							
	(2)	0,56	118,05	1,27	276,25	1,61	0,00000093	3,11
D	5x (1)	0,55	107,16	1,48	296,16	1,69	0,0023	3,44
	5x (2)	0,53	108,39	1,38	291,37	1,62	0,0024	3,24
	1x (1)	0,52	110,03	1,33	288,89	1,59	0,00048	3,13
	1x (2)	0,50	108,83	1,29	290,26	1,54	0,00050	3,03
	1/2x							
	(1)	0,51	112,05	1,23	281,00	1,57	0,00024	2,94
	1/2x							
	(2)	0,51	117,67	1,20	284,69	1,45	0,00026	2,89
	1/5x							
	(1)	0,53	116,92	1,26	285,74	1,51	0,00010	3,03
	1/5x							
	(2)	0,55	110,50	1,42	290,20	1,67	0,000090	3,34
	1/10x							
	(1)	0,54	112,52	1,34	285,20	1,64	0,000047	3,19
	1/10x							
	(2)	0,53	111,48	1,36	291,77	1,58	0,000049	3,19

Thử nghiệm		(g/l)		(g/l)	(g/l)	g B12/		
Bộ	Mẫu	Hiệu suất EPA	mg/g EPA	Hiệu suất DHA	mg/g DHA	LFDW	g LFDW	g/l chất béo
	1/20x							
	(1)	0,54	112,02	1,34	285,86	1,63	0,000023	3,17
	1/20x							
	(2)	0,52	117,18	1,21	278,32	1,55	0,000025	2,91
	1/50x							
	(1)	0,54	111,32	1,37	292,53	1,59	0,0000094	3,22
	1/50x							
	(2)	0,52	110,19	1,29	283,91	1,62	0,0000093	3,06
	1/100x							
	(1)	0,52	111,21	1,30	286,73	1,59	0,0000048	3,08
	1/100x							
	(2)	0,51	109,75	1,31	287,74	1,59	0,0000048	3,07
	1/500x							
	(1)	0,60	119,41	1,38	283,11	1,69	0,00000089	3,31
	1/500x							
	(2)	0,59	118,98	1,37	281,74	1,70	0,00000088	3,27
E	5x (1)	0,53	105,94	1,43	294,23	1,69	0,0023	3,29
	5x (2)	0,46	102,13	1,22	281,16	1,63	0,0024	2,84
	1x (1)	0,49	104,07	1,32	289,48	1,62	0,00048	3,06
	1x (2)	0,53	104,97	1,47	301,01	1,63	0,00047	3,37
	1/2x							
	(1)	0,50	110,46	1,25	284,65	1,58	0,00024	2,94
	1/2x							
	(2)	0,51	112,01	1,26	284,34	1,60	0,00024	2,97
	1/5x							
	(1)	0,51	109,31	1,32	291,38	1,60	0,000094	3,06
	1/5x							
	(2)	0,48	106,13	1,24	281,31	1,65	0,000091	2,89
	1/10x							
	(1)	0,50	105,82	1,30	283,74	1,68	0,000046	3,04
	1/10x							
	(2)	0,48	104,57	1,29	286,39	1,64	0,000047	2,98
	1/20x							
	(1)	0,55	110,12	1,41	292,12	1,69	0,000022	3,26

Thử nghiệm		(g/l)		(g/l)	(g/l)	g B12/		
Bộ	Mẫu	Hiệu suất EPA	mg/g EPA	Hiệu suất DHA	mg/g DHA	LFDW	g LFDW	g/l chất béo
	1/20x							
	(2)	0,57	113,13	1,43	293,02	1,70	0,000022	3,32
	1/50x							
	(1)	0,54	106,44	1,45	294,03	1,76	0,0000085	3,31
	1/50x							
	(2)	0,54	107,21	1,44	295,14	1,72	0,0000087	3,29
	1/100x							
	(1)	0,55	104,88	1,46	288,40	1,88	0,0000041	3,33
	1/100x							
	(2)	0,55	109,40	1,44	291,26	1,76	0,0000044	3,30
	1/500x							
	(1)	0,59	113,27	1,50	296,97	1,76	0,00000085	3,43
	1/500x							
	(2)	0,66	115,09	1,62	291,79	1,97	0,00000076	3,73
F	5x (1)	0,60	114,57	1,49	292,02	1,80	0,00212779	3,42
	5x (2)	0,55	113,41	1,40	294,25	1,67	0,00229687	3,20
	1x (1)	0,55	110,28	1,45	297,11	1,70	0,00045415	3,30
	1x (2)	0,54	112,21	1,36	290,41	1,66	0,00046376	3,13
	1/2x							
	(1)	0,54	118,20	1,27	285,84	1,58	0,00024017	2,97
	1/2x							
	(2)	0,55	121,79	1,26	286,25	1,54	0,00024686	2,95
	1/5x							
	(1)	0,58	115,91	1,43	294,66	1,70	0,00008801	3,28
	1/5x							
	(2)	0,56	114,29	1,42	296,75	1,67	0,00008979	3,23
	1/10x							
	(1)	0,52	115,79	1,21	278,51	1,60	0,00004803	2,86
	1/10x							
	(2)	0,56	114,86	1,38	291,97	1,67	0,00004619	3,17
	1/20x							
	(1)	0,55	117,21	1,31	286,75	1,63	0,00002328	3,06
	1/20x							
	(2)	0,57	121,84	1,33	289,39	1,60	0,00002381	3,11

Thử nghiệm		(g/l)		(g/l)	(g/l)	g B12/		
Bộ	Mẫu	Hiệu suất	mg/g	Hiệu suất	mg/g			g/l chất béo
		EPA	EPA	DHA	DHA	LFDW	g LFDW	
	1/50x							
	(1)	0,58	116,45	1,45	299,69	1,67	0,00000901	3,29
	1/50x							
	(2)	0,56	115,90	1,40	295,17	1,66	0,00000904	3,21
	1/100x							
	(1)	0,55	111,13	1,44	296,95	1,72	0,00000448	3,25
	1/100x							
	(2)	0,54	113,25	1,36	292,35	1,66	0,00000463	3,11
	1/500x							
	(1)	0,60	117,81	1,43	286,97	1,78	0,00000084	3,31
	1/500x							
	(2)	0,63	120,03	1,45	282,05	1,86	0,00000080	3,40
G	5x (1)	0,55	111,96	1,35	279,27	1,78	0,00215168	3,13
	5x (2)	0,55	107,14	1,42	283,43	1,85	0,00207251	3,25
	1x (1)	0,54	108,42	1,41	287,31	1,75	0,00043883	3,25
	1x (2)	0,57	109,44	1,50	292,04	1,81	0,00042495	3,42
	1/2x							
	(1)	0,57	110,17	1,45	286,10	1,85	0,00020558	3,33
	1/2x							
	(2)	0,58	114,19	1,39	279,49	1,82	0,00020874	3,26
	1/5x							
	(1)	0,57	111,03	1,41	280,46	1,86	0,00008062	3,27
	1/5x							
	(2)	0,55	109,25	1,39	282,05	1,80	0,00008326	3,22
	1/10x							
	(1)	0,55	108,14	1,36	273,02	1,86	0,00004134	3,21
	1/10x							
	(2)	0,55	108,66	1,41	283,05	1,79	0,00004313	3,27
	1/20x							
	(1)	0,59	114,48	1,39	275,22	1,88	0,00002023	3,25
	1/20x							
	(2)	0,60	114,04	1,41	273,40	1,95	0,00001951	3,29
	1/50x							
	(1)	0,59	114,46	1,39	275,82	1,88	0,00000797	3,26

Thử nghiệm		(g/l)		(g/l)	(g/l)	g B12/		
Bộ	Mẫu	Hiệu suất	mg/g	Hiệu suất	mg/g	LFDW	g LFDW	g/l chất béo
		EPA	EPA	DHA	DHA			
	1/50x							
	(2)	0,57	111,16	1,40	279,89	1,85	0,00000812	3,24
	1/100x							
	(1)	0,56	109,75	1,47	295,79	1,73	0,00000444	3,33
	1/100x							
	(2)	0,56	109,31	1,41	279,92	1,85	0,00000415	3,28
	1/500x							
	(1)	0,60	114,86	1,44	281,92	1,84	0,00000081	3,36
	1/500x							
	(2)	0,60	118,27	1,41	281,47	1,79	0,00000084	3,31
H	1/500x							
	(1)	0,59	126,25	1,29	279,17	1,64	0,00000092	3,07
	1/500x							
	(2)	0,59	117,35	1,44	291,28	1,74	0,00000086	3,33
	0x (1)	0,91	186,81	1,18	248,20	1,56	0,00000000	3,29
I	0x (2)	0,92	183,32	1,20	244,63	1,65	0,00000000	3,36
	1/500x							
	(1)	0,62	127,64	1,29	272,24	1,74	0,00000086	3,12
	1/500x							
	(2)	0,65	128,06	1,36	272,66	1,83	0,00000082	3,27
J	0x (1)	0,97	191,93	1,16	234,87	1,66	0,00000000	3,40
	0x (2)	0,99	192,97	1,18	234,10	1,70	0,00000000	3,44
	1/500x							
	(1)	0,56	106,22	1,52	292,66	1,94	0,00000077	3,37
	1/500x							
K	(2)	0,62	113,25	1,57	291,57	1,98	0,00000076	3,50
	0x (1)	0,95	179,92	1,27	245,50	1,75	0,00000000	3,52
	0x (2)	1,00	179,38	1,32	241,17	1,91	0,00000000	3,67
	1/500x							
	(1)	0,60	112,09	1,56	298,08	1,88	0,00000080	3,44
	1/500x							
	(2)	0,61	113,60	1,55	293,84	1,90	0,00000079	3,43
	0x (1)	0,94	172,82	1,31	244,79	1,84	0,00000000	3,59

Thử nghiệm		(g/l)		(g/l)	(g/l)	g B12/		
Bộ	Mẫu	Hiệu suất	mg/g	Hiệu suất	mg/g	LFDW	g LFDW	g/l chất béo
		EPA	EPA	DHA	DHA			
	0x (2)	0,97	181,66	1,27	241,23	1,78	0,00000000	3,58

Kết luận: Sự sinh trưởng của PTA-10208 và năng suất EPA không thay đổi ở các nồng độ Vitamin B12 nằm trong khoảng từ 5x (3,84mg/l) đến 1/500x (0,0015mg/l) trong DSDFM-O ở 10% CO₂. Tuy nhiên, khi Vitamin B12 được loại bỏ hoàn toàn khỏi DSDFM-O, % EPA tăng khoảng 50%, trong khi đó khối lượng khô và % chất béo cũng gia tăng nhẹ, dẫn đến sự tăng 60% về năng suất EPA.

Tất cả các khía cạnh, phương án, và điều kiện khác nhau được mô tả ở đây có thể được kết hợp với bất kỳ hoặc tất cả các thay đổi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất sinh khối vi sinh vật có các axit béo và nồng độ EPA, bao gồm các bước:

(a) lên men vi sinh vật này trong bình lên men để tạo ra canh trường lên men có pha nước và sinh khối trong đó pha nước có khí hòa tan trong đó vi sinh vật này bao gồm *Thraustochytrid* mà sản xuất sinh khối có ít nhất 3% EPA theo tổng khối lượng các axit béo; và

(b) điều chỉnh CO₂ hòa tan >5% khí hòa tan.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước điều chỉnh áp suất trên sinh khối để thu được mức EPA mong muốn trong sinh khối.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước điều chỉnh nhiệt độ trong canh trường để thu được mức EPA mong muốn trong sinh khối.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó lượng sinh khối, EPA hoặc DHA được đo trước khi điều chỉnh CO₂ hòa tan.

5. Phương pháp làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối của *Thraustochytrid* có các axit béo và nồng độ EPA, bao gồm các bước:

(a) lên men *Thraustochytrid* trong bình lên men để tạo ra sinh khối; và

(b) cung cấp áp suất trên sinh khối lớn hơn hoặc bằng 0,5psi (3,447kPa) lớn hơn áp suất khí quyển trong thời gian đủ để làm tăng nồng độ EPA trong sinh khối.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó bình này có áp suất đỉnh nằm trong khoảng từ 0,4psi (2,758kPa) đến 30psi (206,82kPa).

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó bình này có áp suất đỉnh nằm trong khoảng từ 1psi (6,894kPa) đến 30psi (206,82kPa).

8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó bình này có áp suất đỉnh nằm trong khoảng từ 1psi (6,894kPa) đến 20psi (137,88kPa).

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 8, trong đó áp suất này được cung cấp lên đến 120 giờ.

10. Phương pháp sản xuất dầu, trong đó phương pháp này bao gồm bước sản xuất sinh khối theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, và thu được dầu từ sinh khối này.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó dầu này được chiết từ sinh khối.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó sinh khối này được tạo ra từ vi sinh vật được phân lập được lưu giữ với số đăng ký tại ATCC là PTA-10208, trong đó dầu này bao gồm các axit béo, trong đó các axit béo còn bao gồm các axit béo omega-3 không bão hòa đa, trong đó các axit béo omega-3 không bão hòa đa bao gồm DHA và EPA với lượng $\geq 90\%$ khối lượng, theo tổng lượng các axit béo omega-3 không bão hòa đa và lượng EPA, theo khối lượng, nằm trong khoảng từ 6% đến 65% tổng lượng của EPA và DHA.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó:

(a) lượng EPA, theo khối lượng, nằm trong khoảng từ 6% đến 28% tổng lượng của EPA và DHA;

(b) lượng EPA, theo khối lượng, nằm trong khoảng từ 36% đến 65% tổng lượng của EPA và DHA; hoặc

(c) lượng EPA, theo khối lượng, nằm trong khoảng từ 28% đến 36% tổng lượng của EPA và DHA.

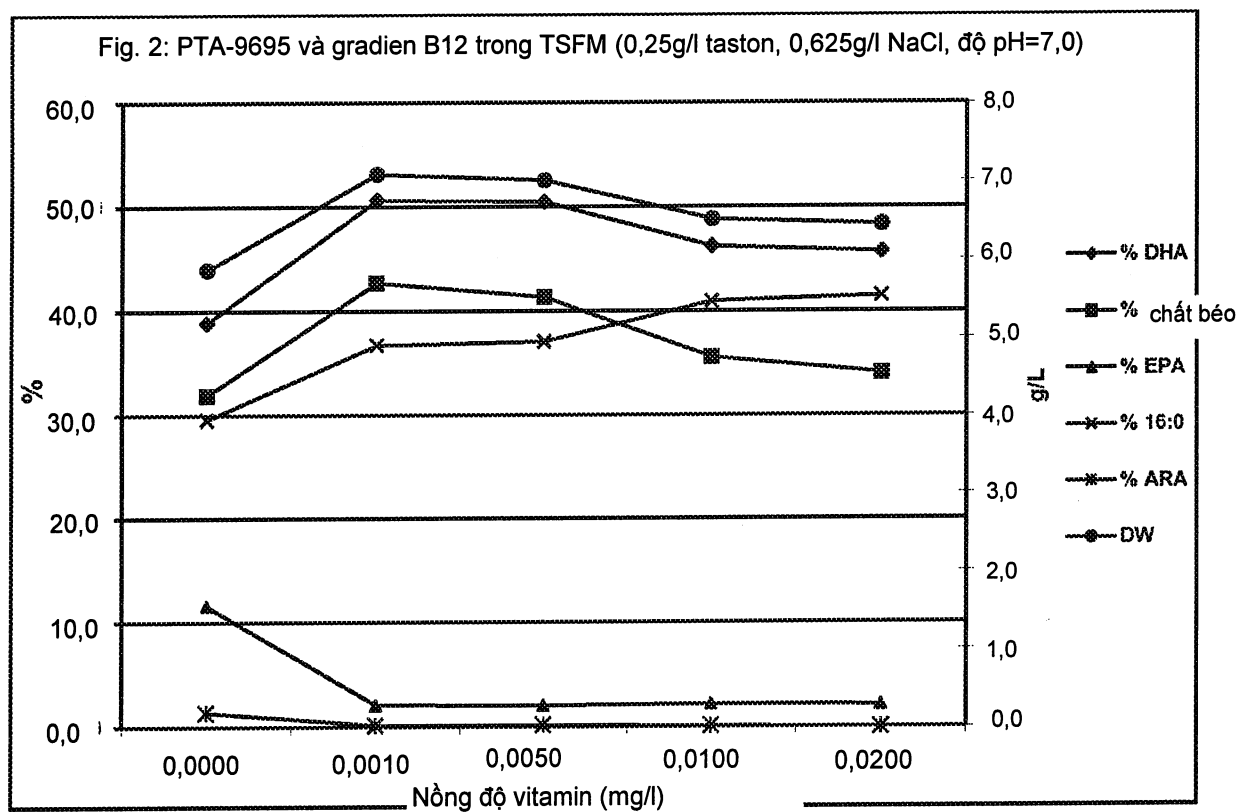
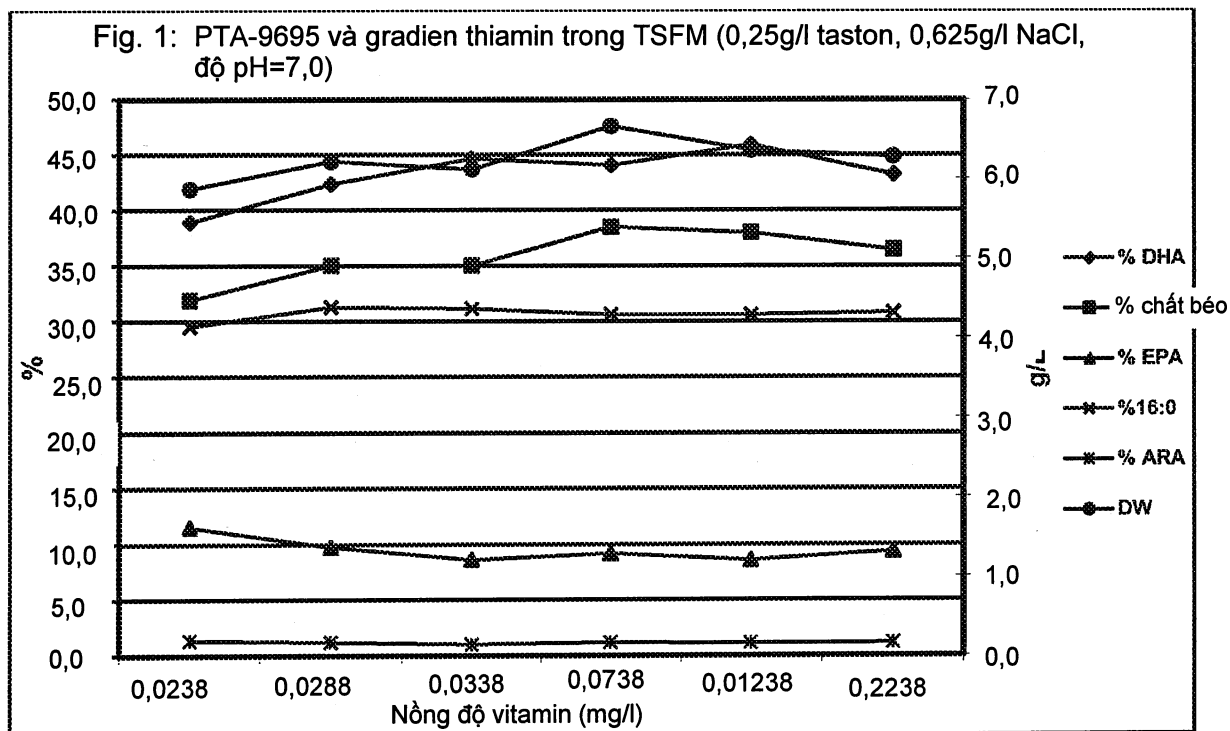
14. Phương pháp theo điểm 11, trong đó sinh khối này được tạo ra từ vi sinh vật được phân lập được lưu giữ với số đăng ký tại ATCC là PTA-10212, trong đó dầu này bao gồm các axit béo, trong đó các axit béo còn bao gồm DHA và EPA và lượng EPA, theo khối lượng, nằm trong khoảng từ 15 đến 70% tổng khối lượng của EPA và DHA.

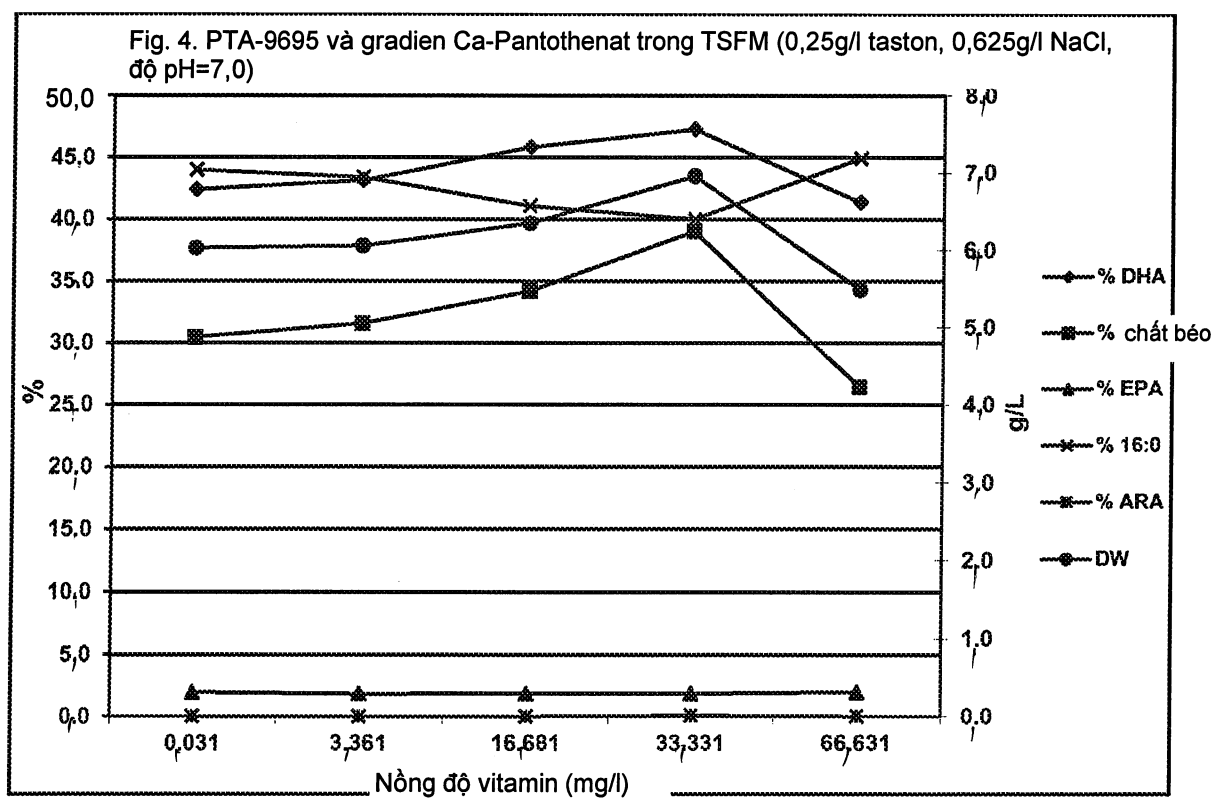
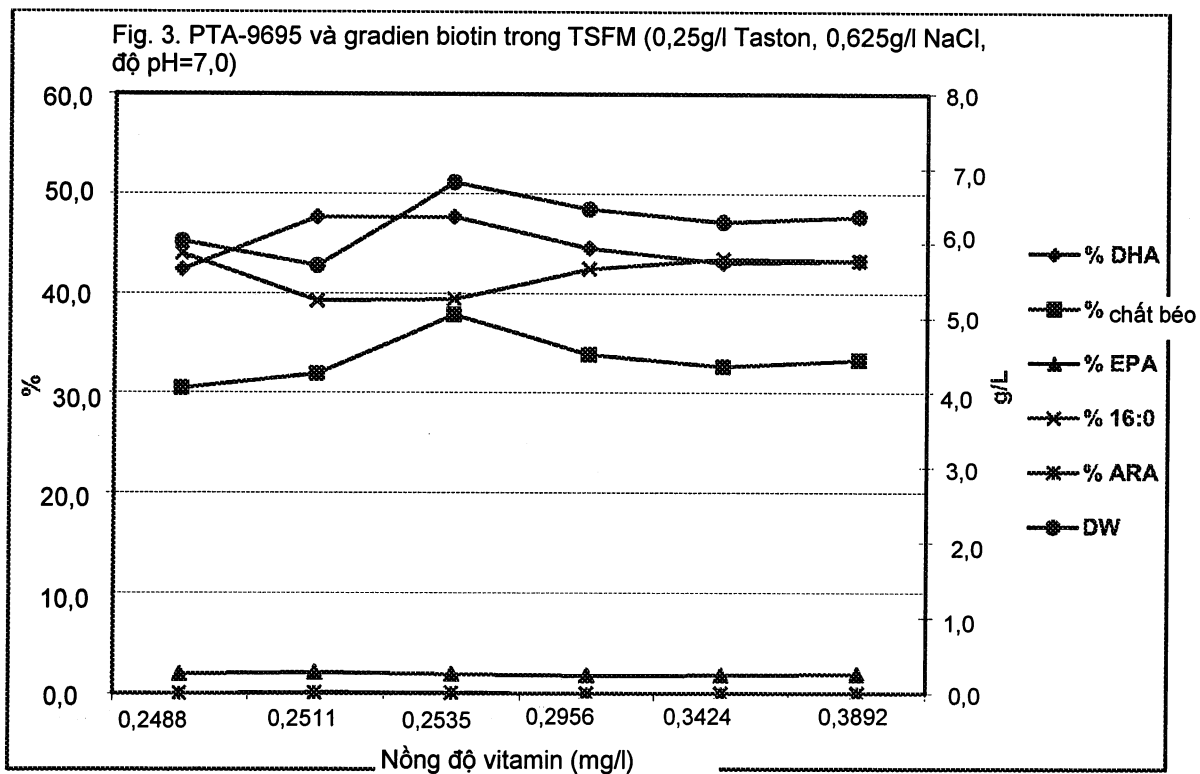
15. Phương pháp theo điểm 11, trong đó sinh khối này được tạo ra từ vi sinh vật được phân lập được lưu giữ với số đăng ký tại ATCC là PTA-9695, trong đó dầu này bao gồm các axit béo, trong đó các axit béo còn bao gồm các axit béo omega-3 không bão hòa đa, trong đó các axit béo omega-3 không bão hòa đa bao gồm DHA và EPA với lượng từ 50 đến 70% khối lượng, theo tổng lượng các axit béo omega-3 không bão hòa đa và lượng EPA, theo khối lượng, với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 60% tổng khối lượng EPA và DHA.

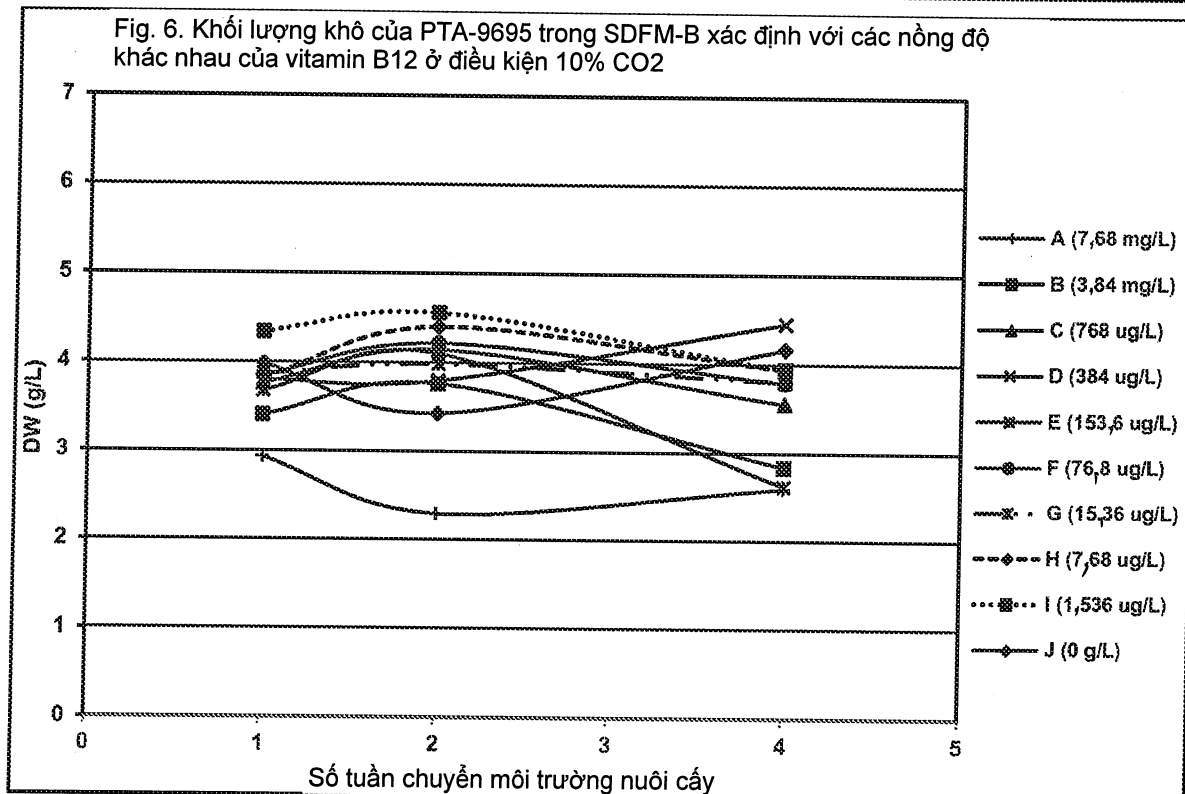
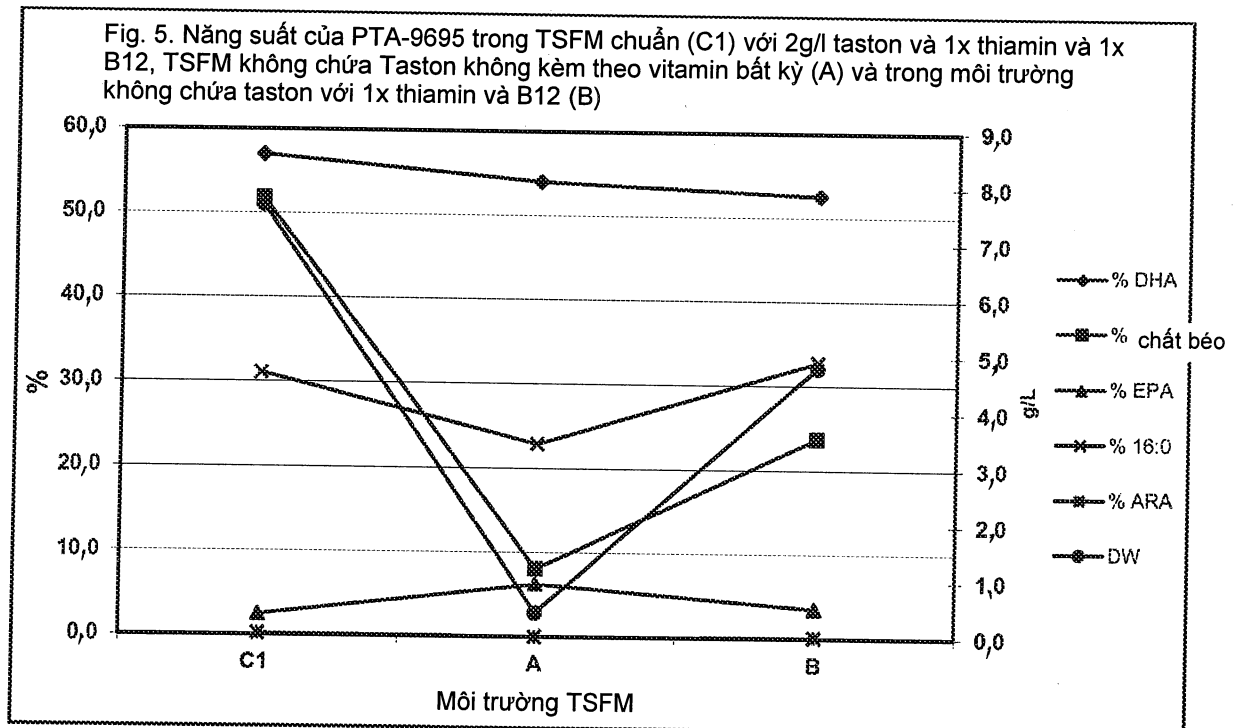
16. Phương pháp theo điểm 11, trong đó sinh khối này được tạo ra từ vi sinh vật được phân lập được lưu giữ với số đăng ký tại ATCC là PTA-9695, trong đó dầu này bao gồm các axit béo, trong đó các axit béo còn bao gồm các axit béo omega-3 không bão hòa đa, trong đó các axit béo omega-3 không bão hòa đa bao gồm DHA và EPA với lượng là 60% khối lượng, theo tổng lượng các axit béo omega-3 không bão hòa đa và lượng EPA, theo khối lượng, với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 60% tổng khối lượng EPA và DHA.

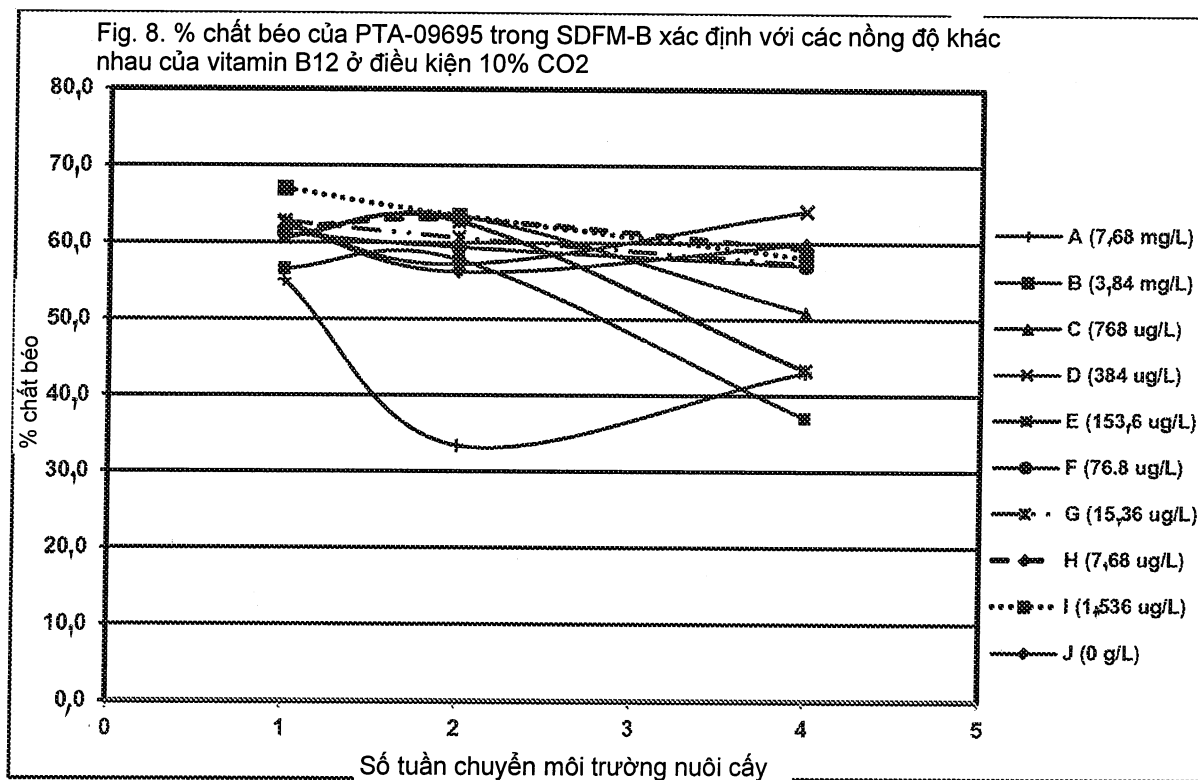
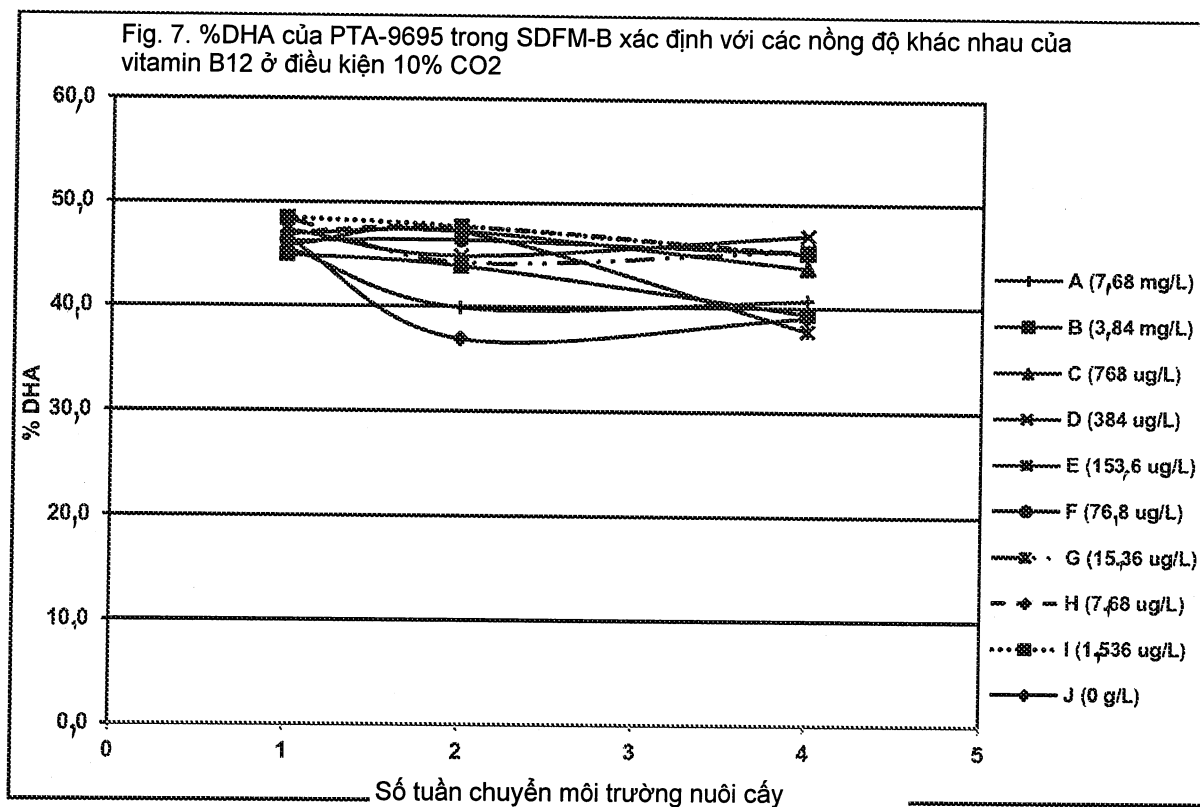
17. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 16, trong đó dầu thô thu được và trong đó quy trình này còn bao gồm bước tinh chế dầu thô này.

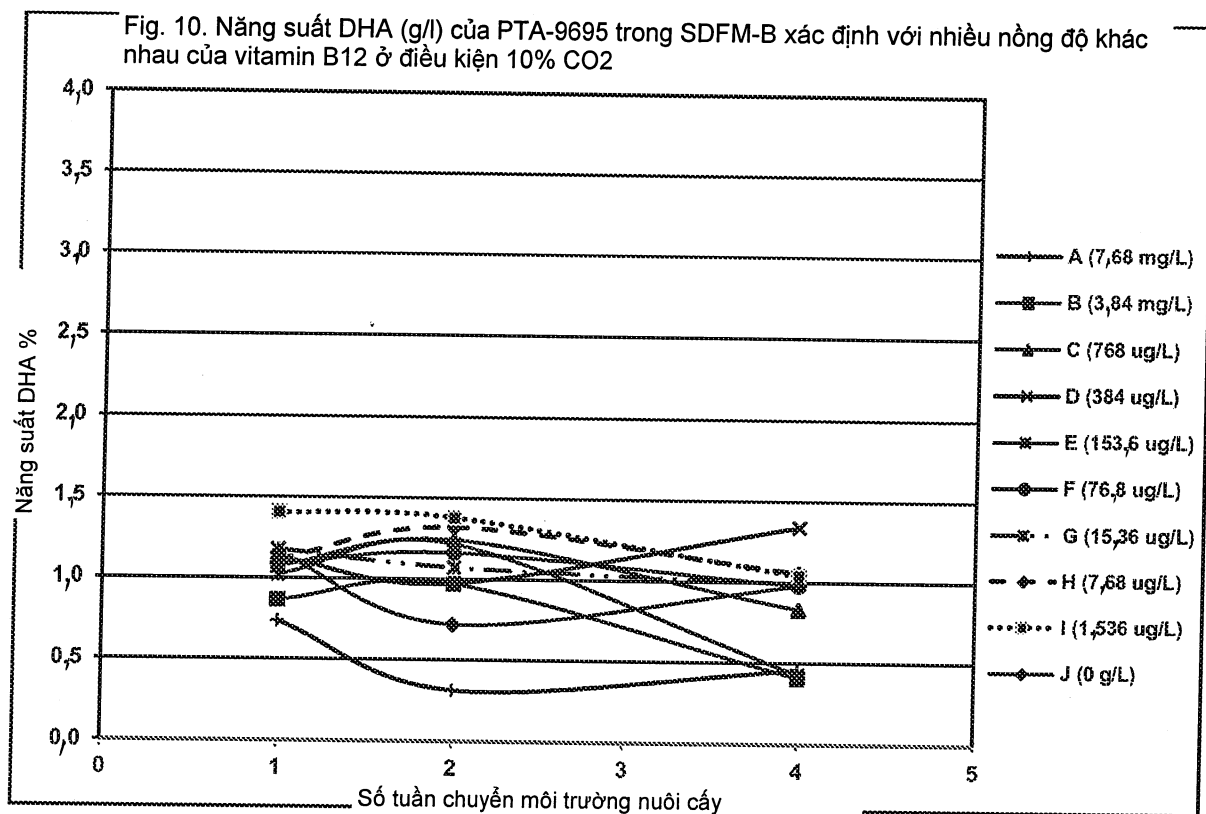
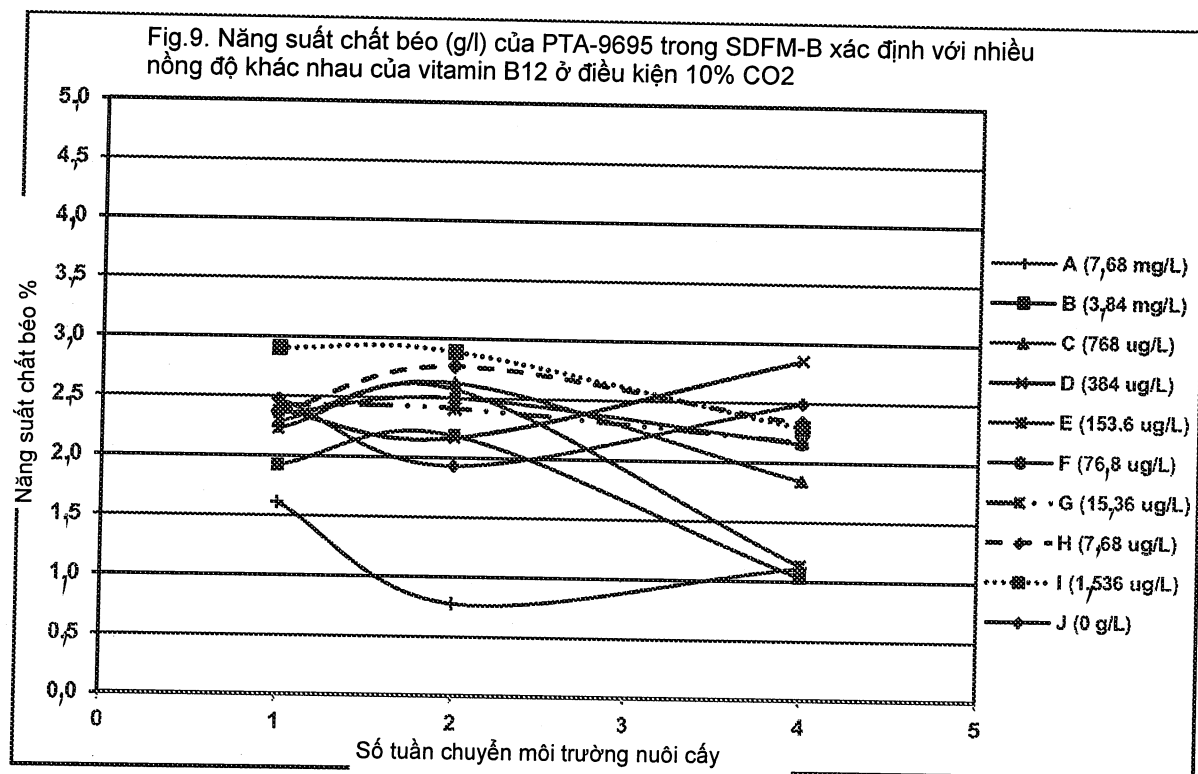
18. Sinh khối thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

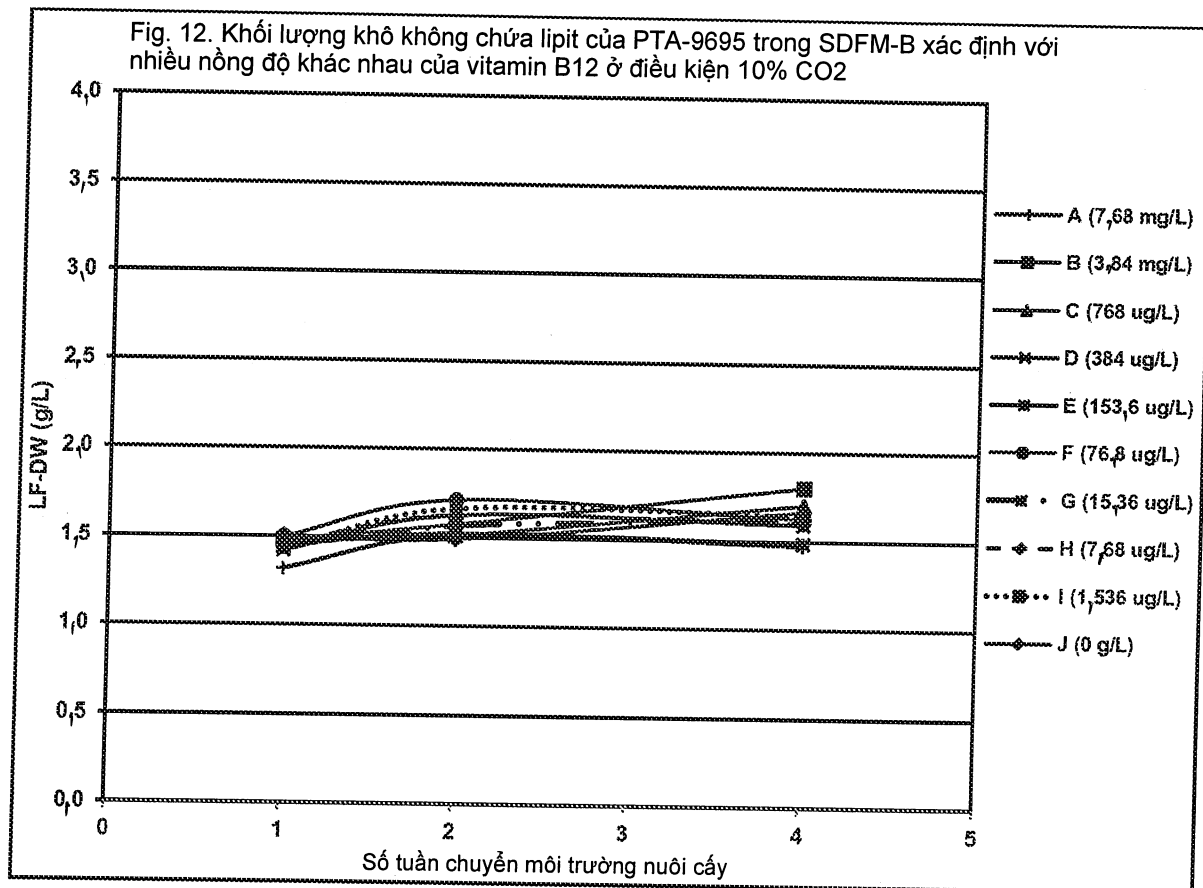
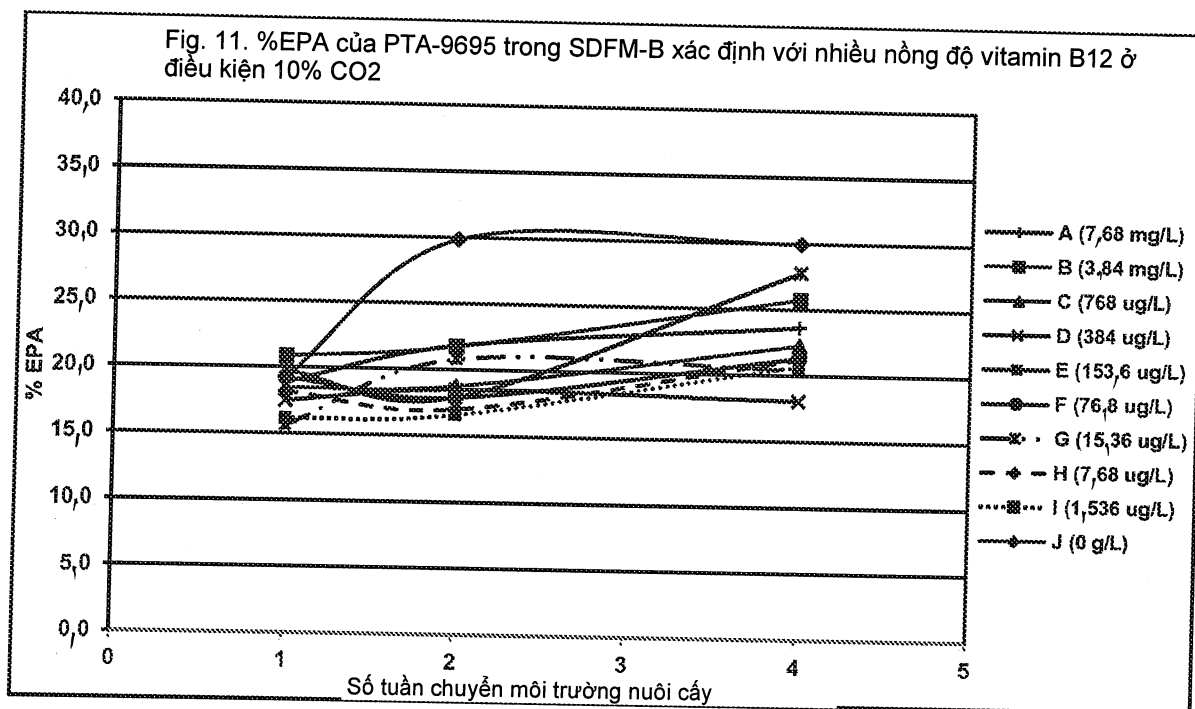


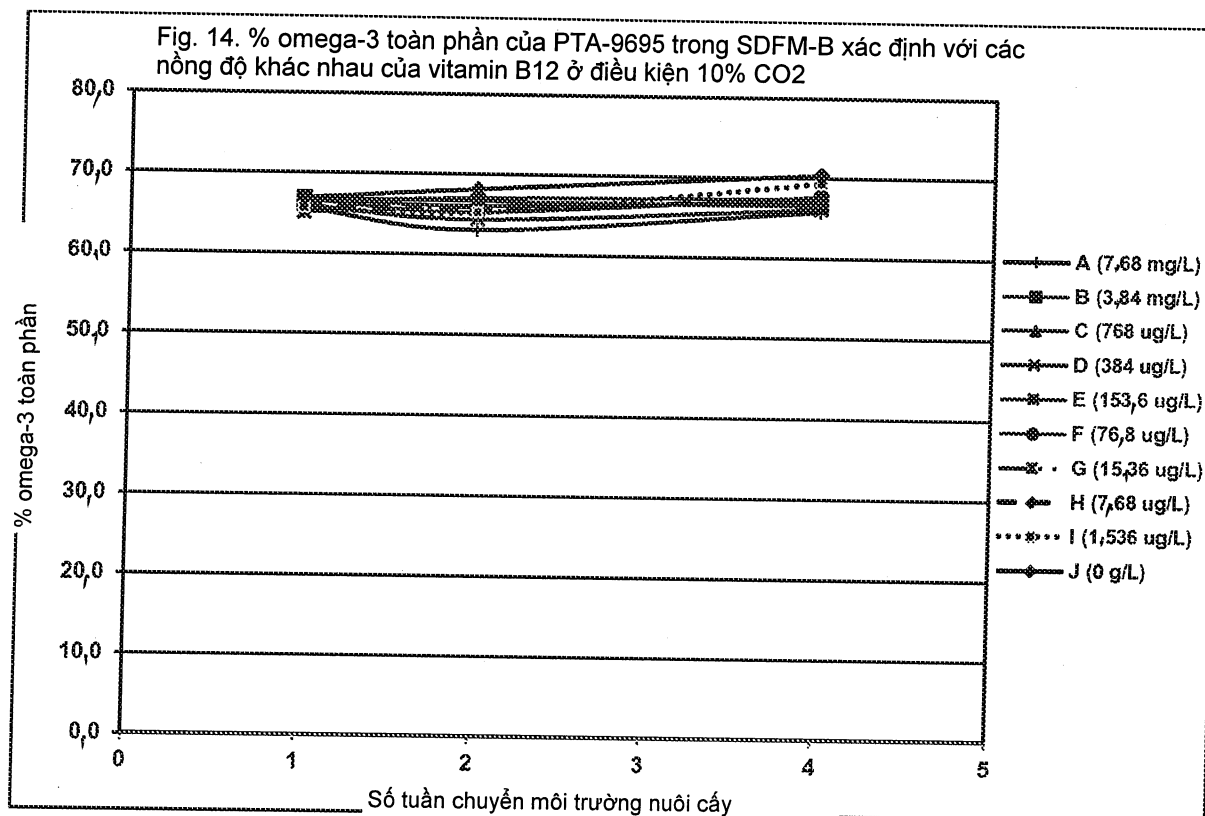
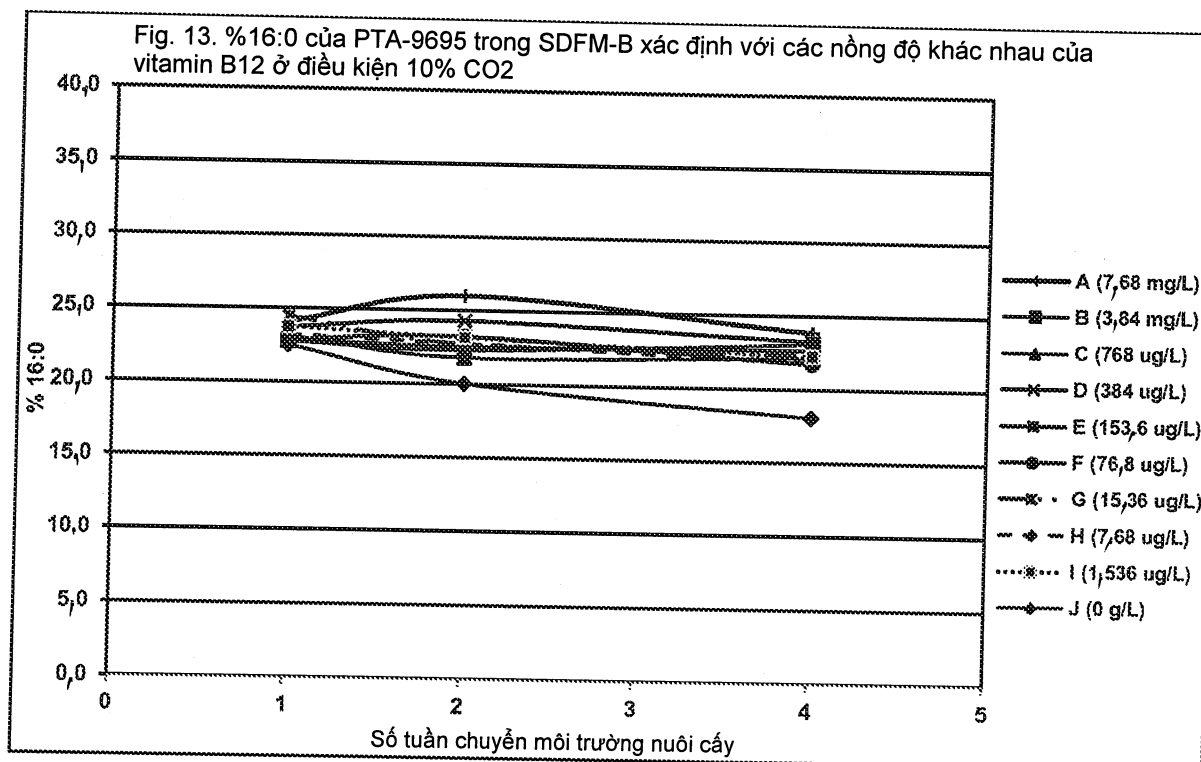


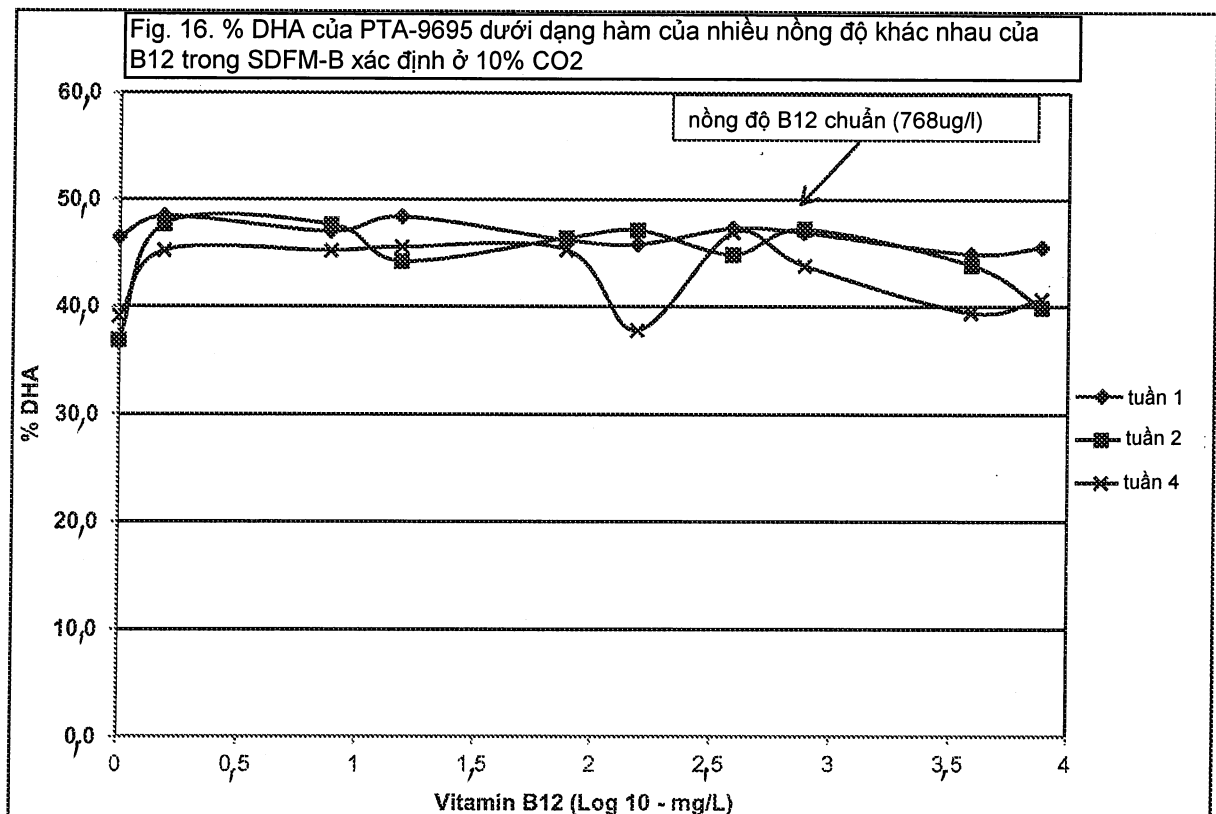
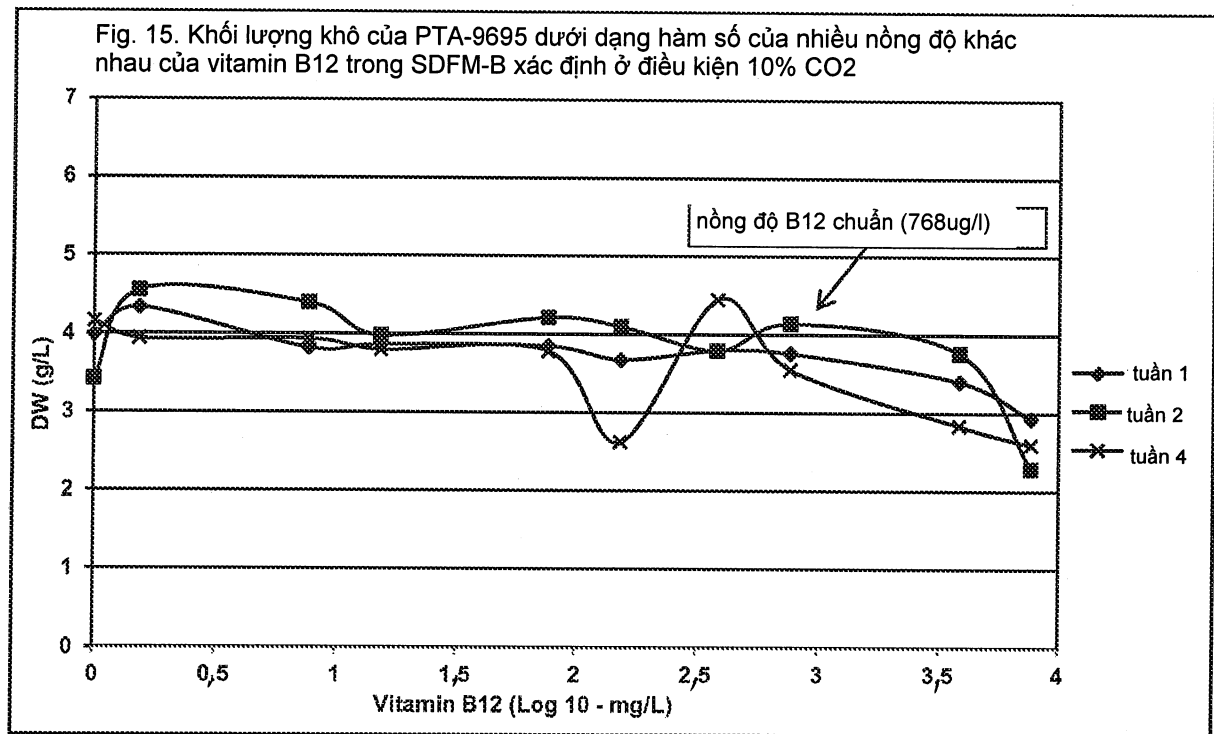


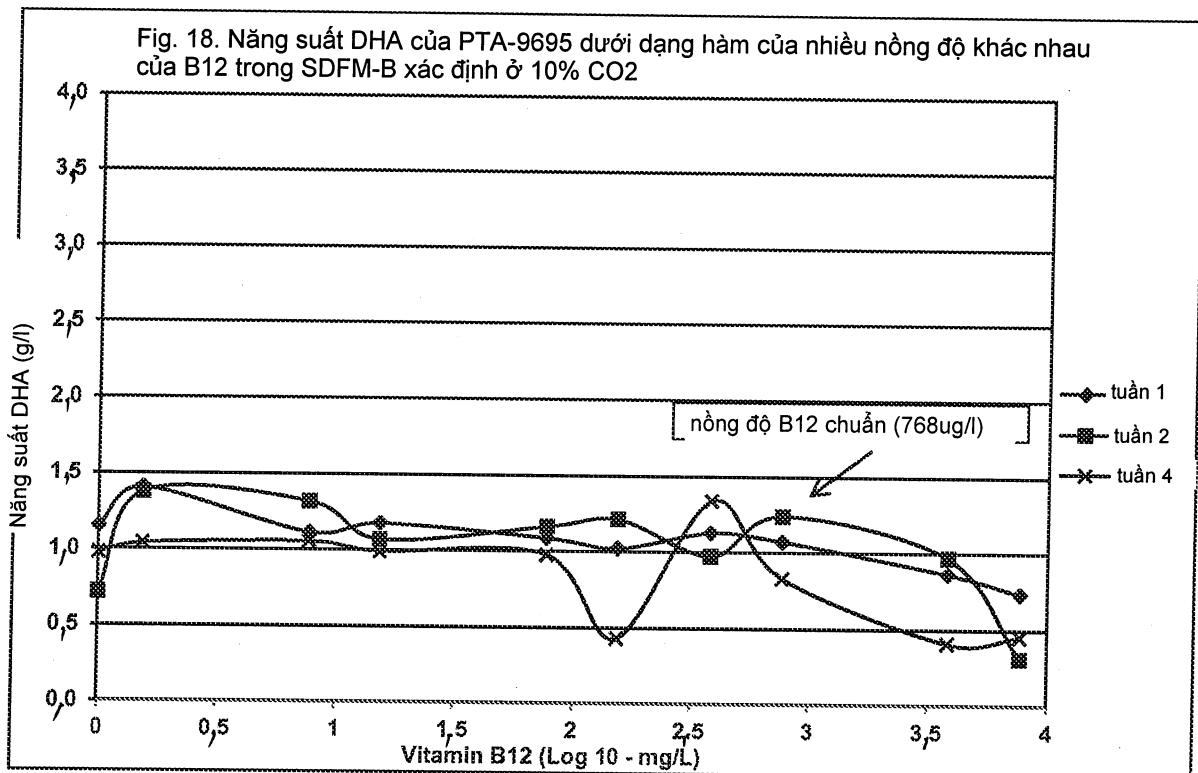
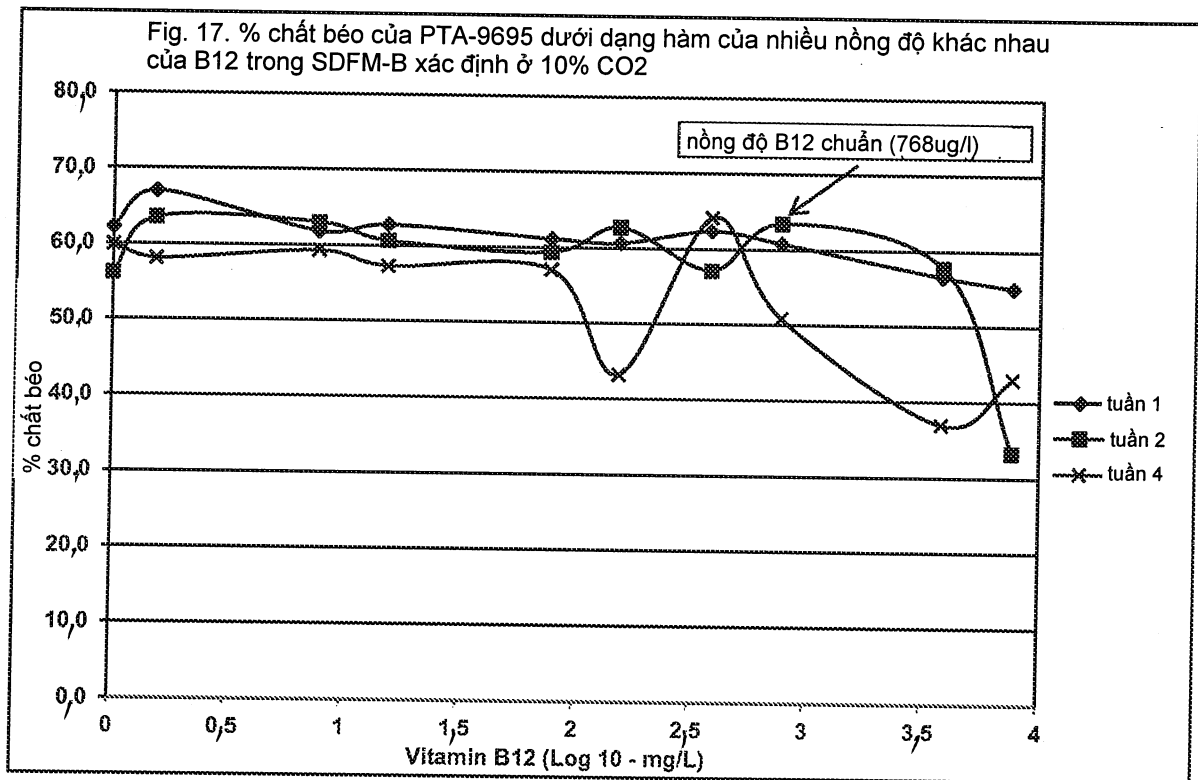


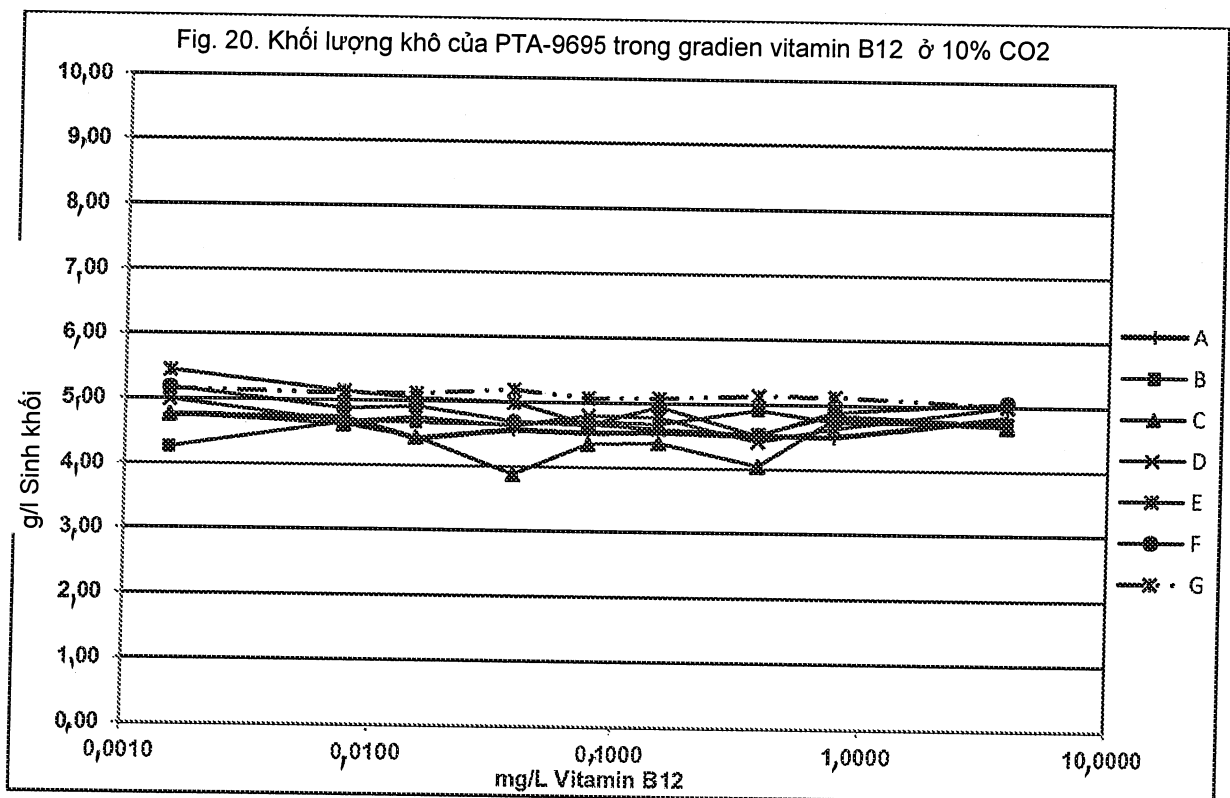
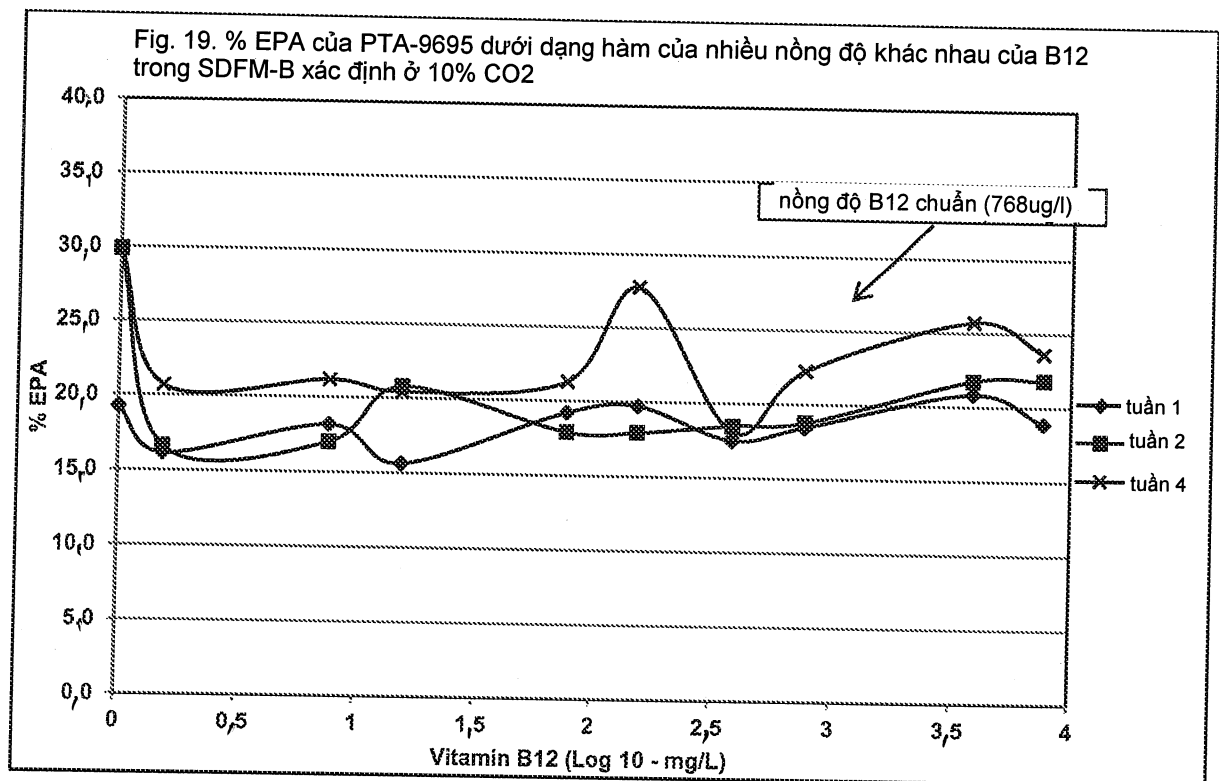


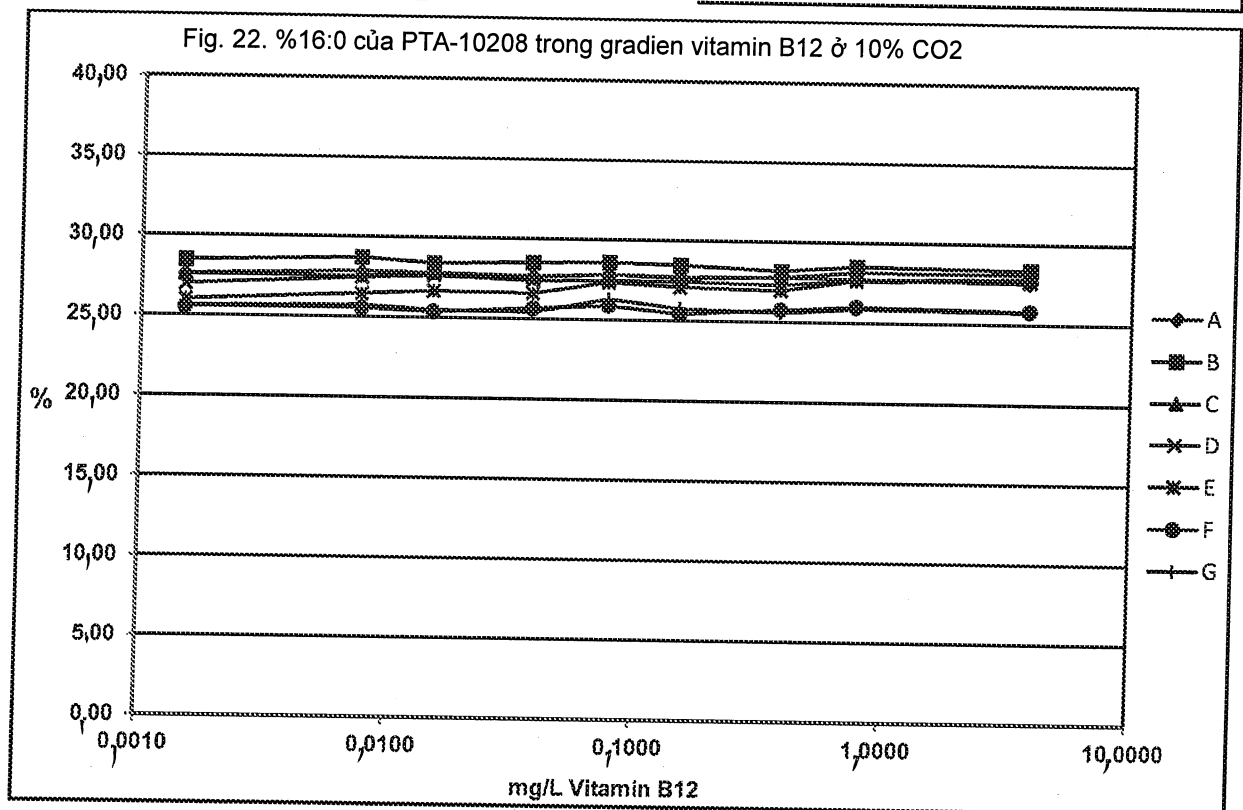
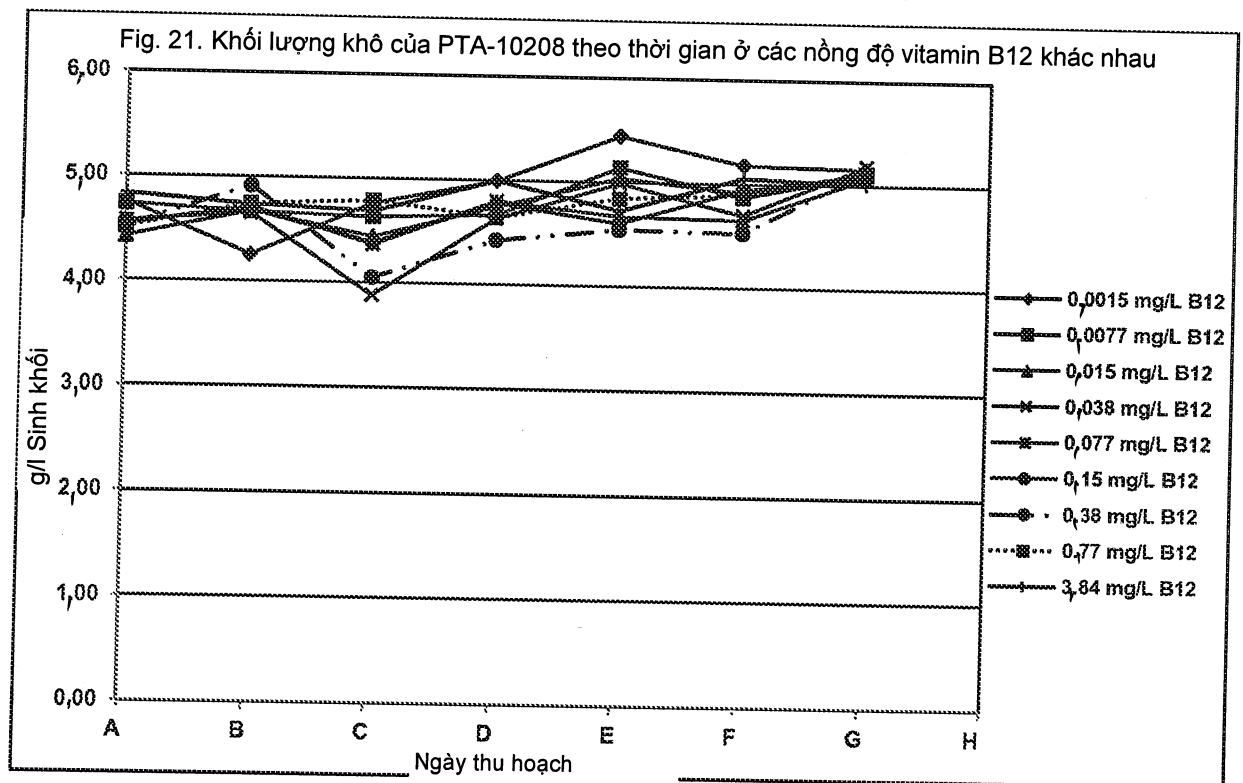


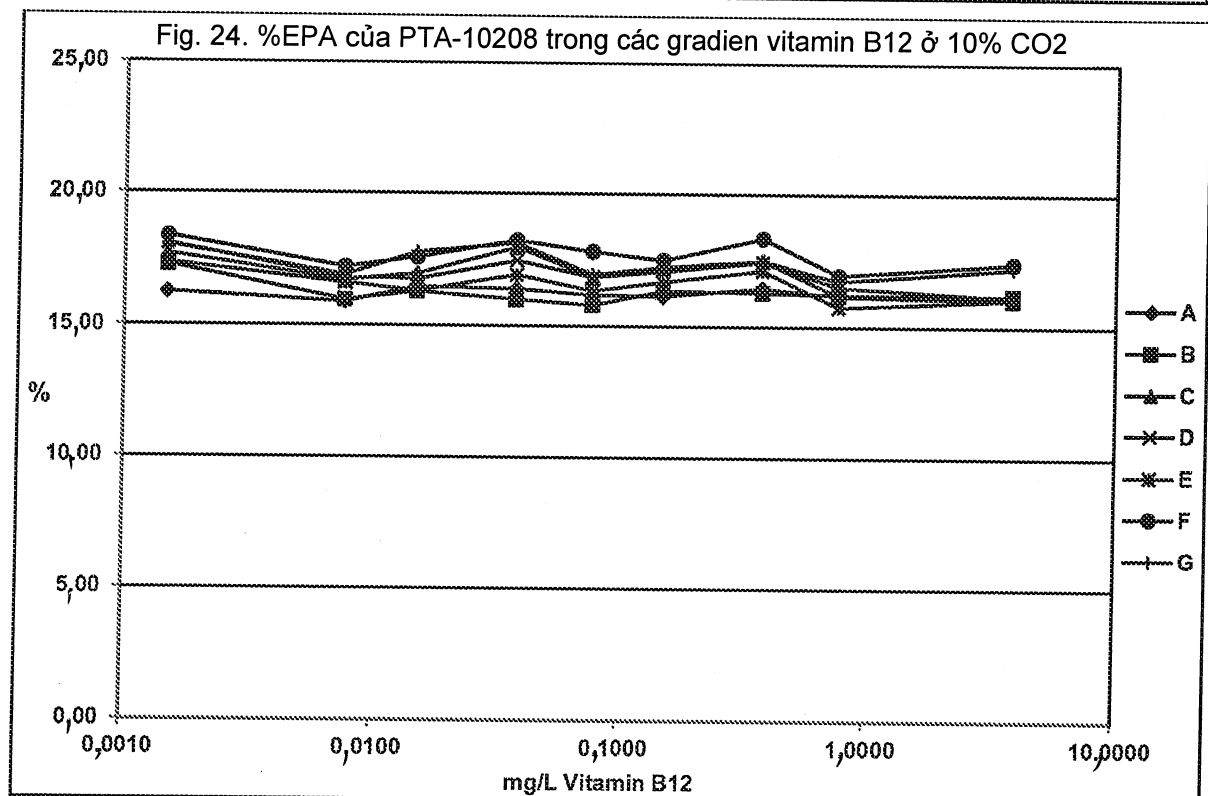
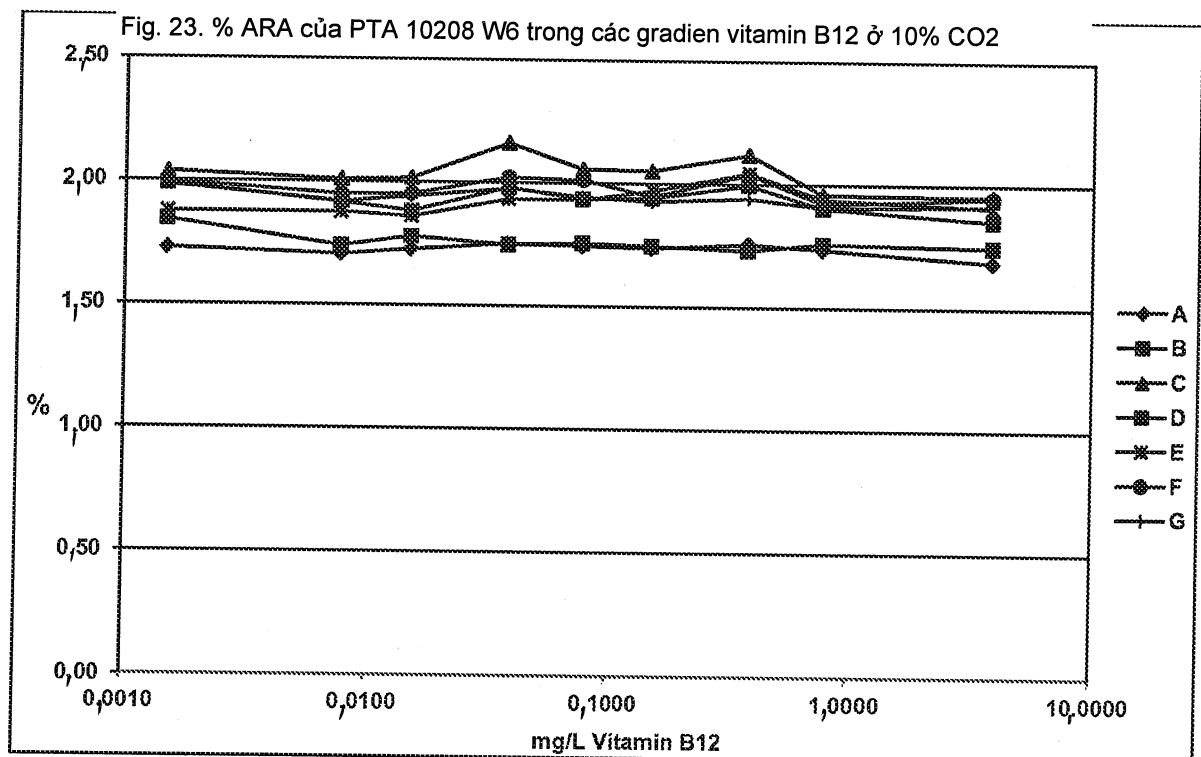


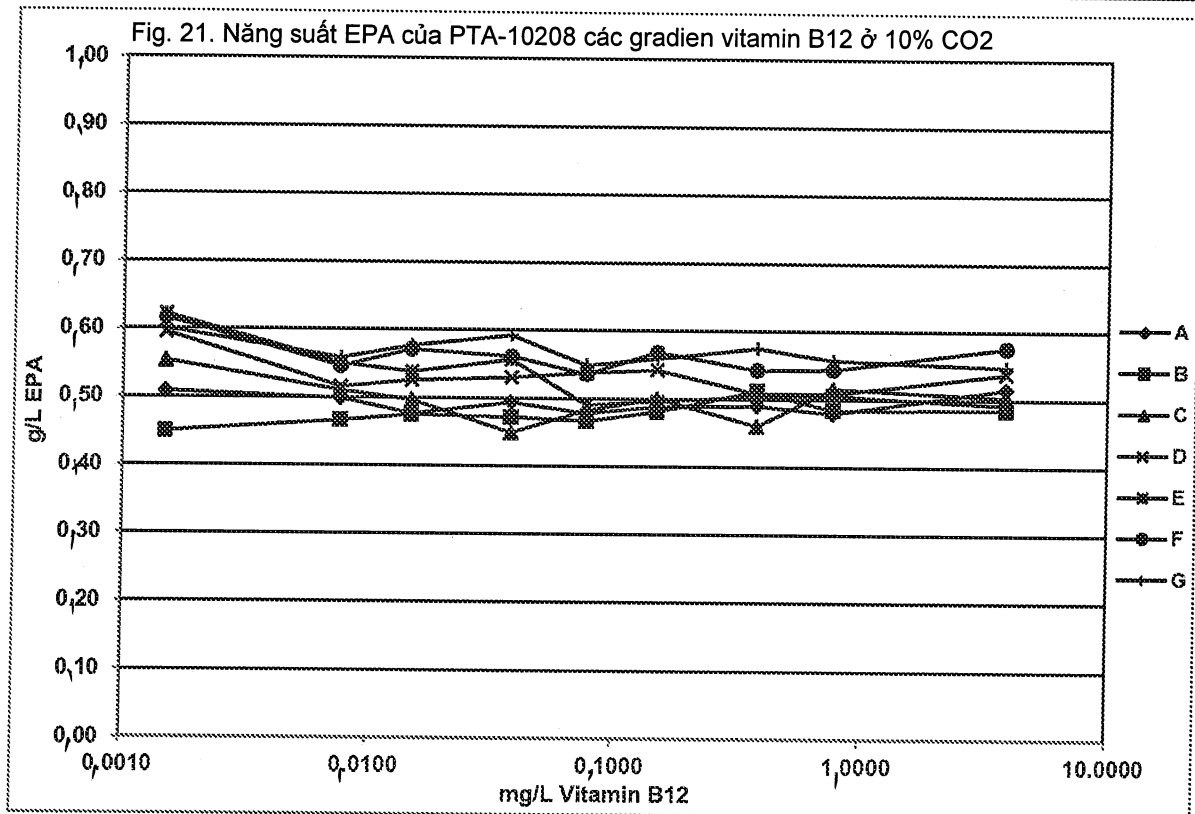
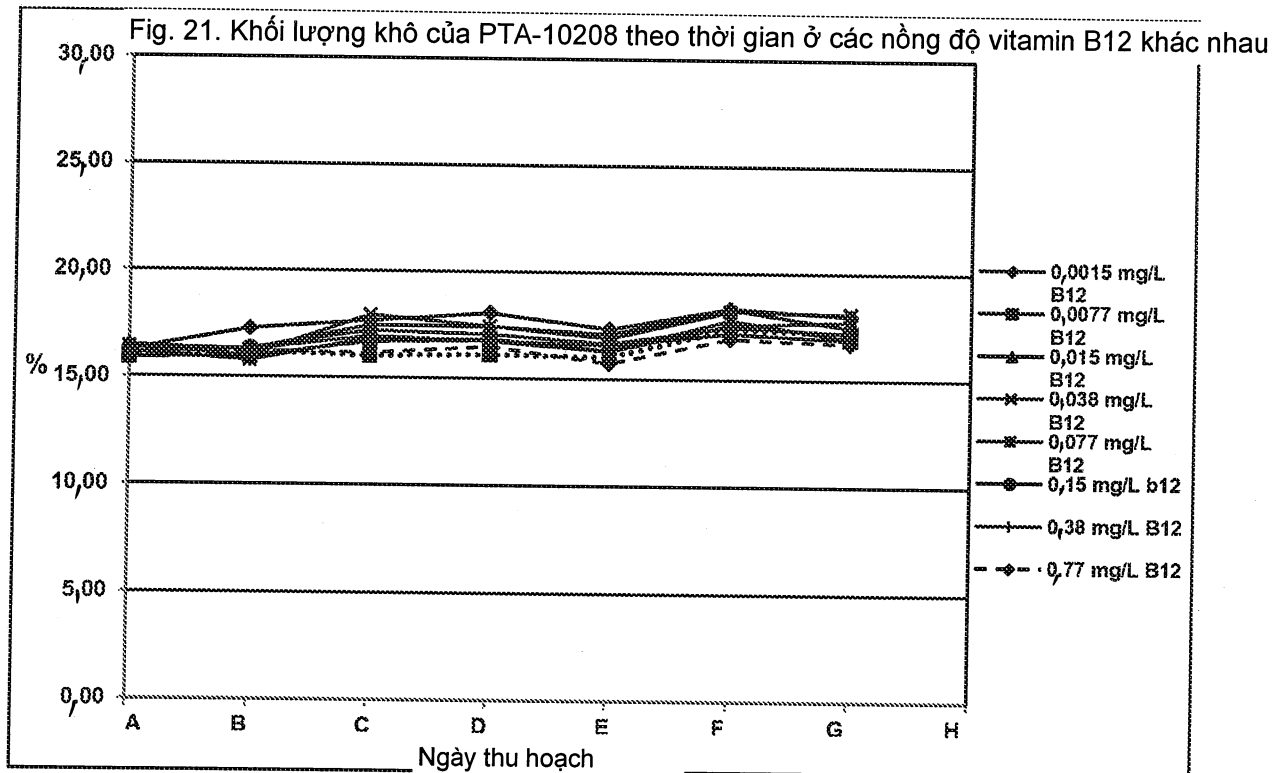


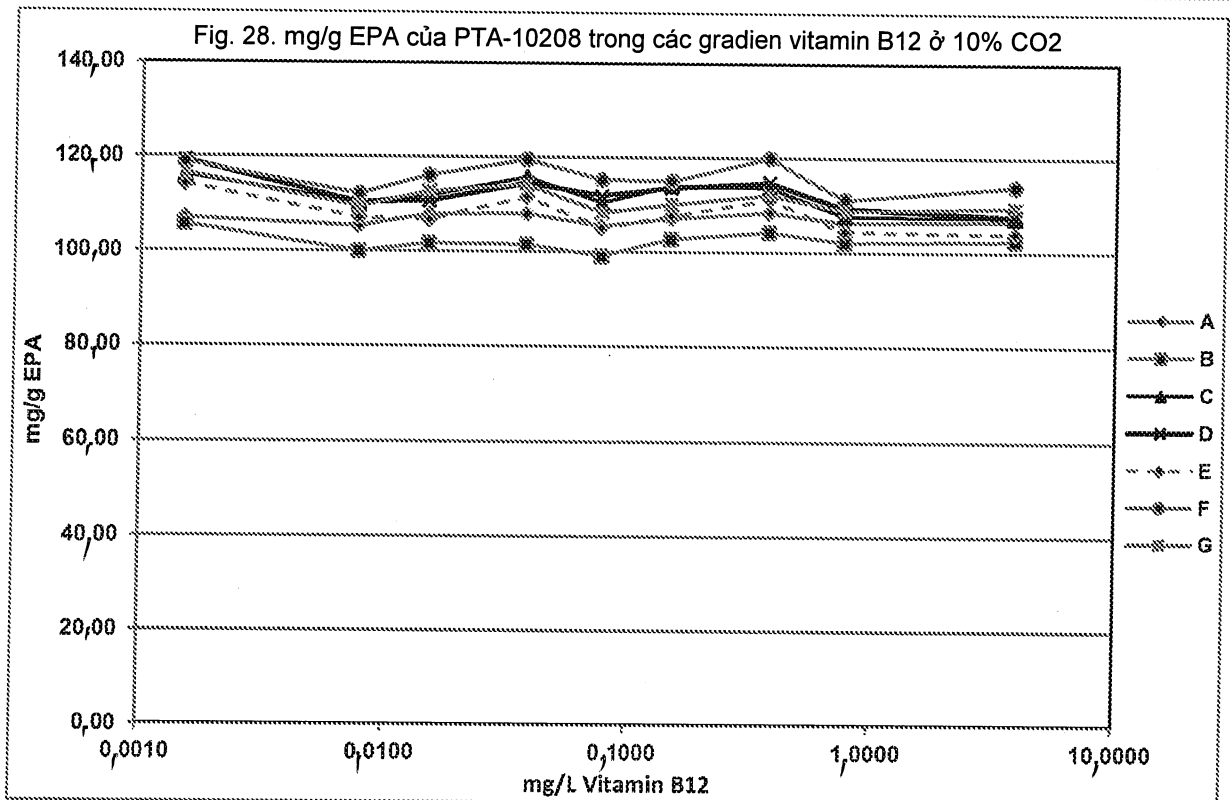
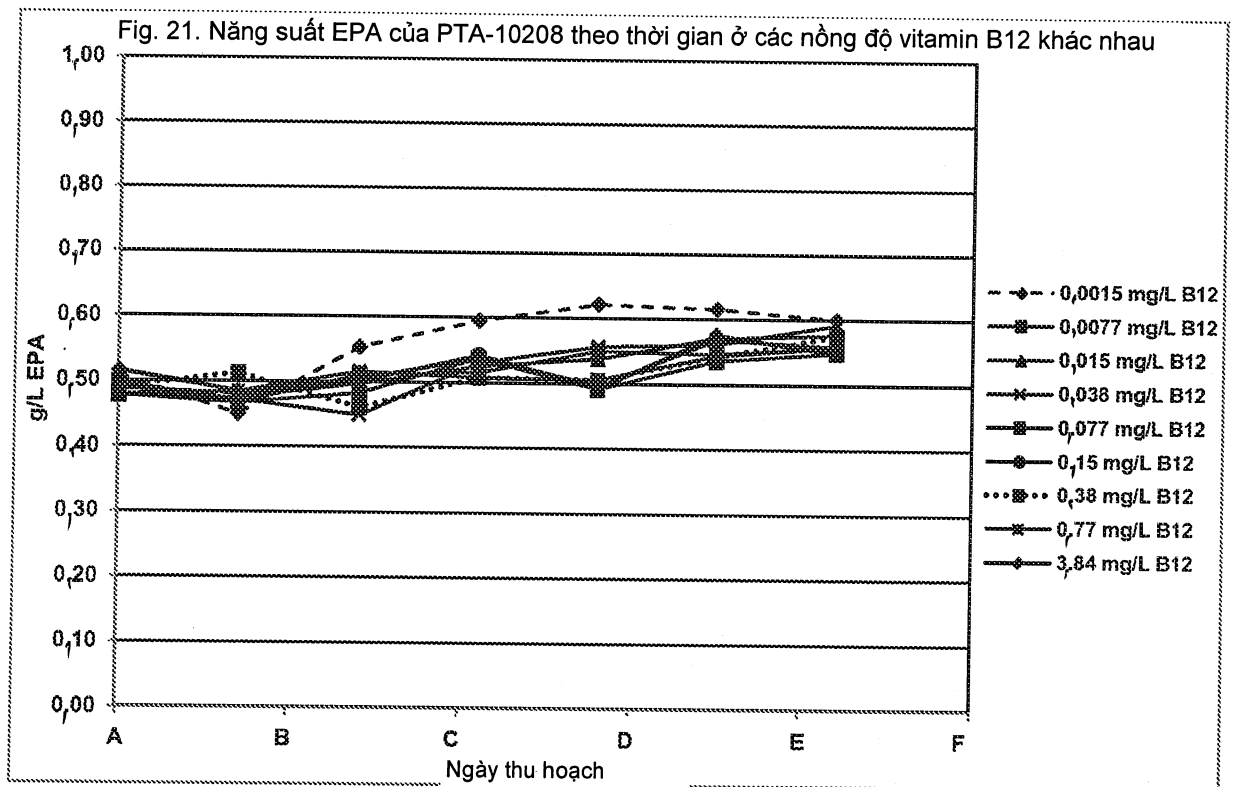


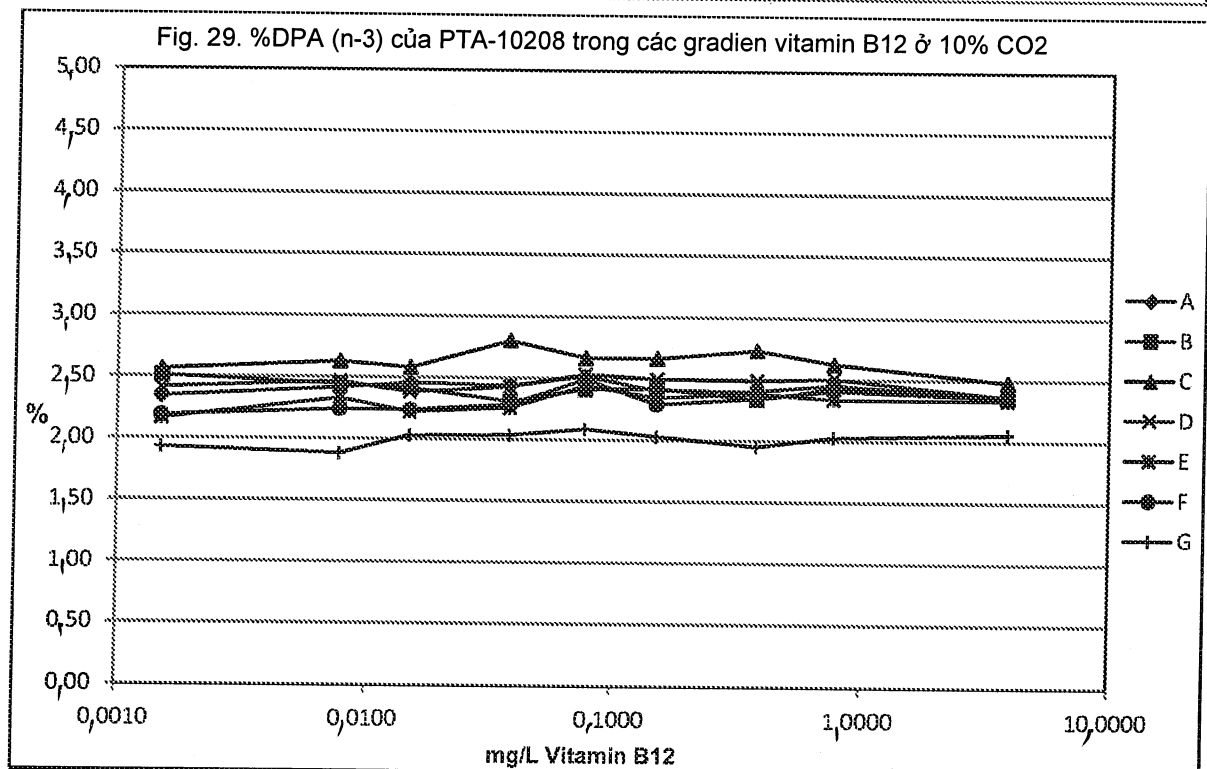
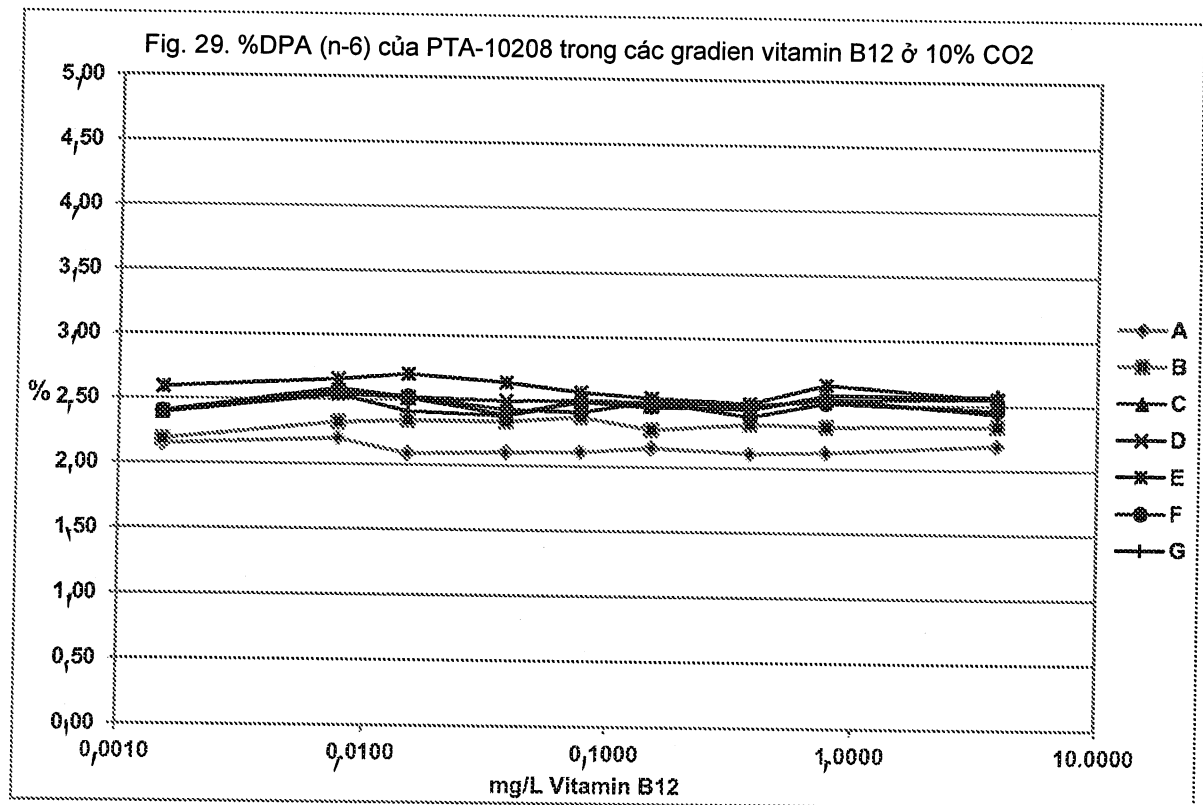


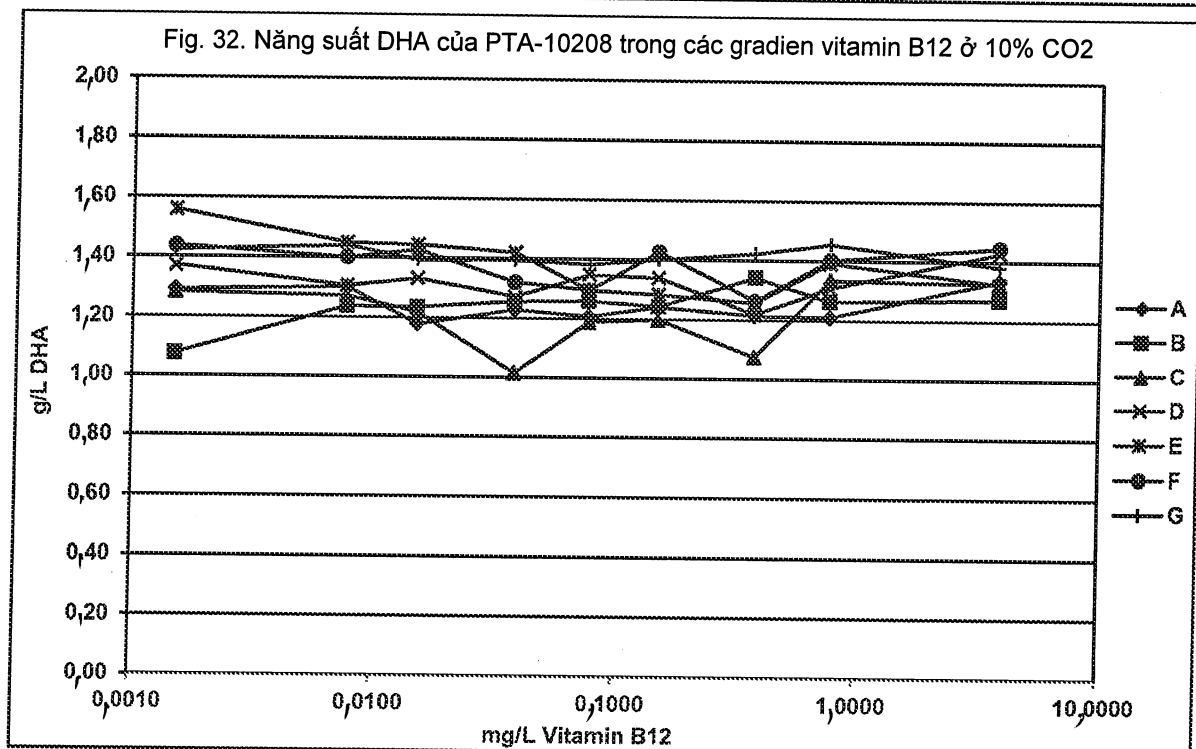
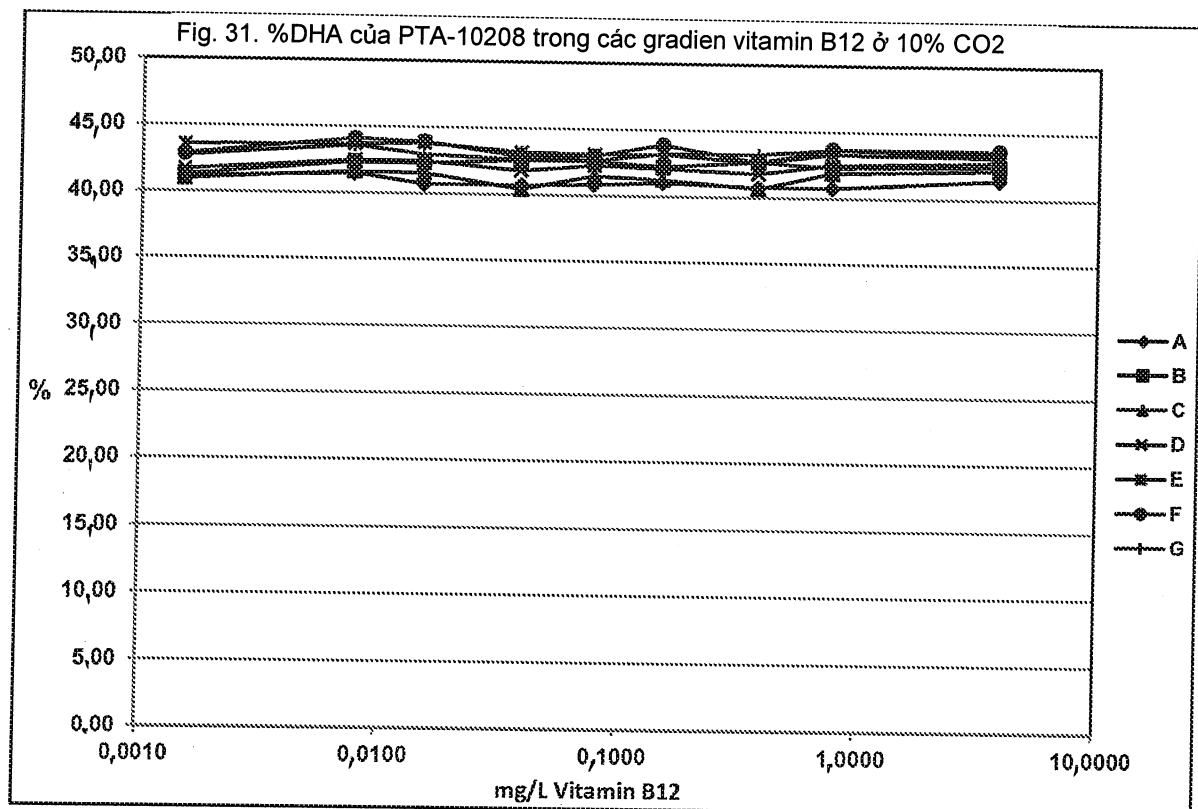


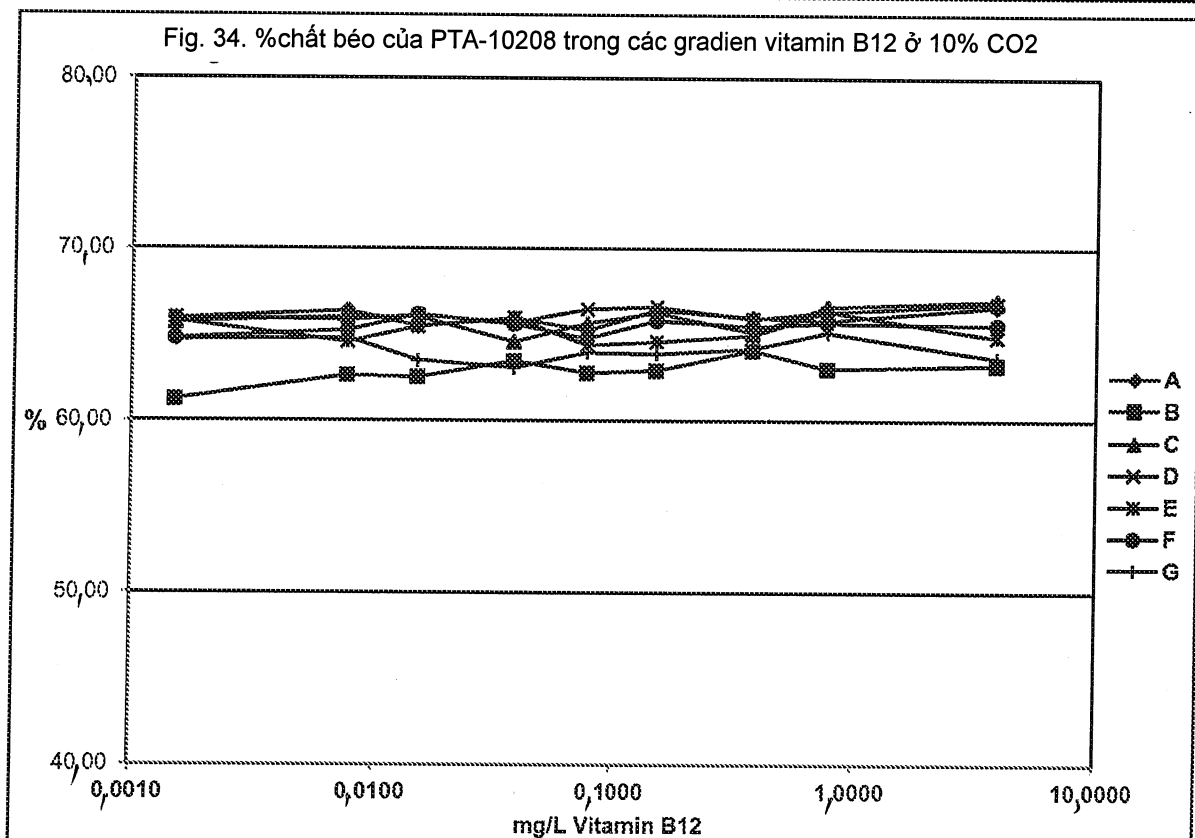
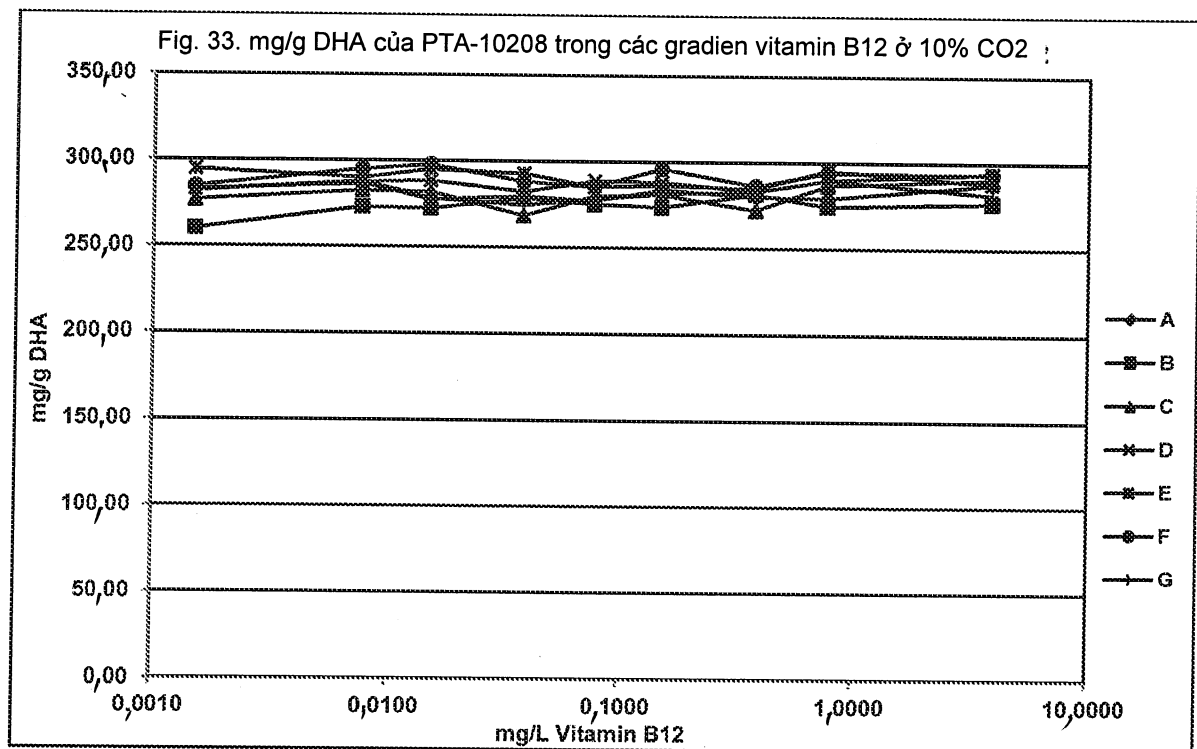


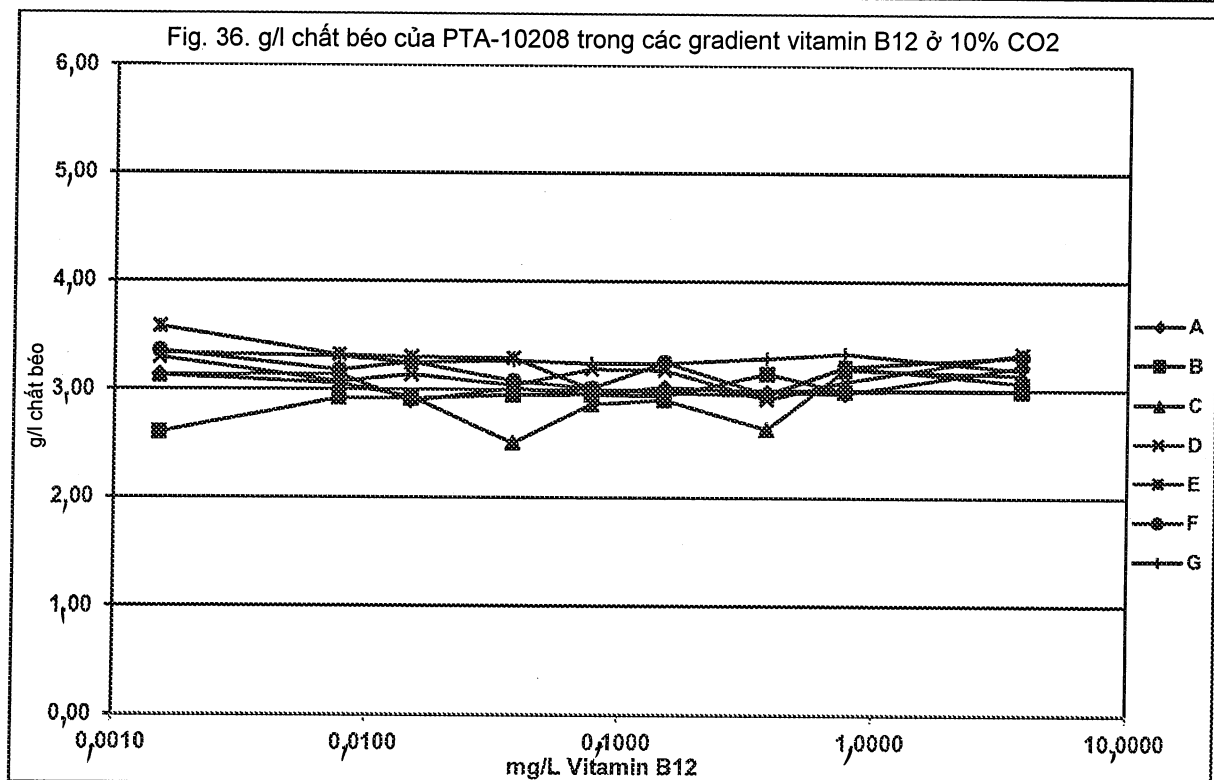
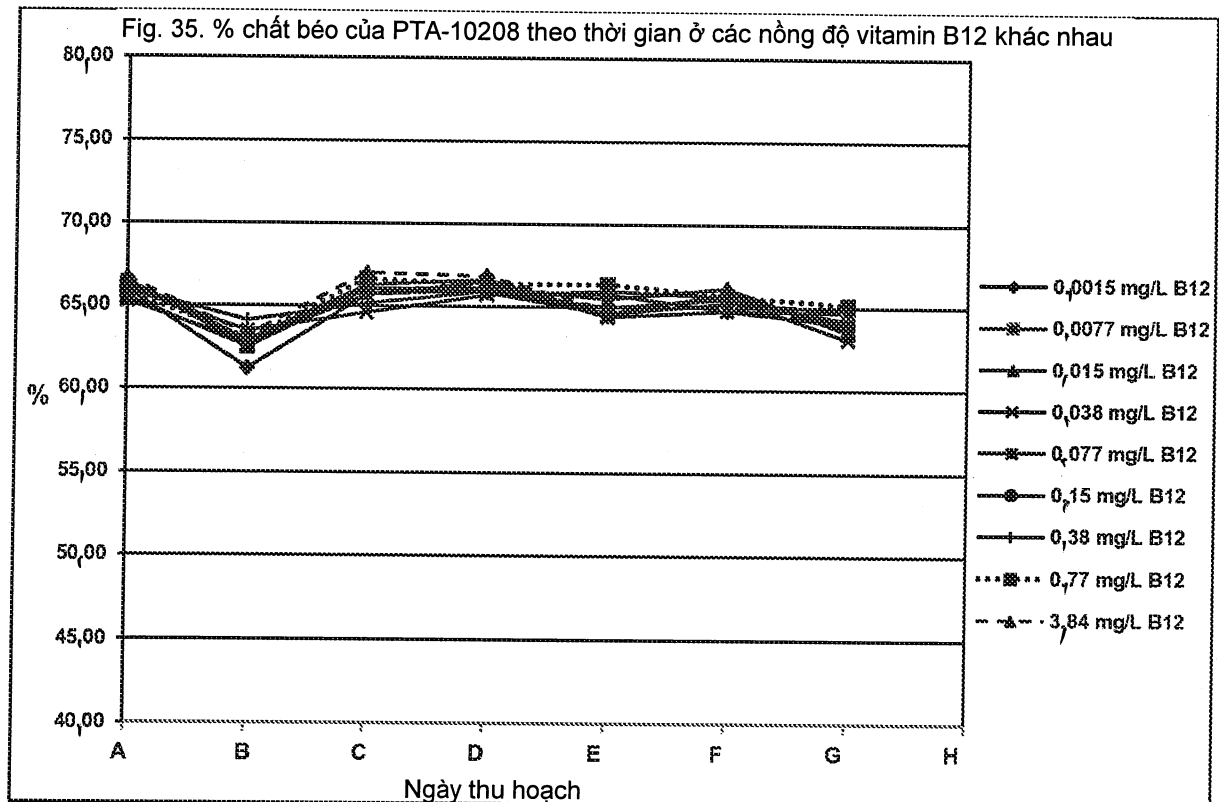


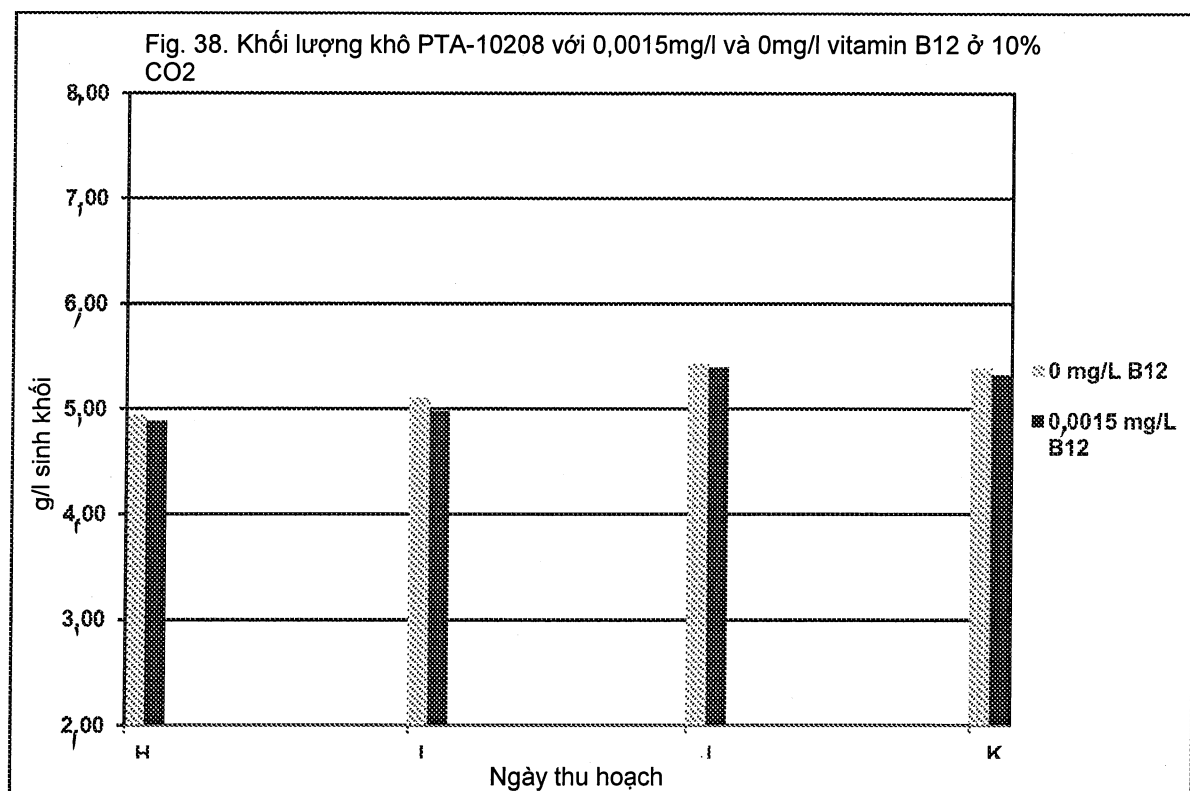
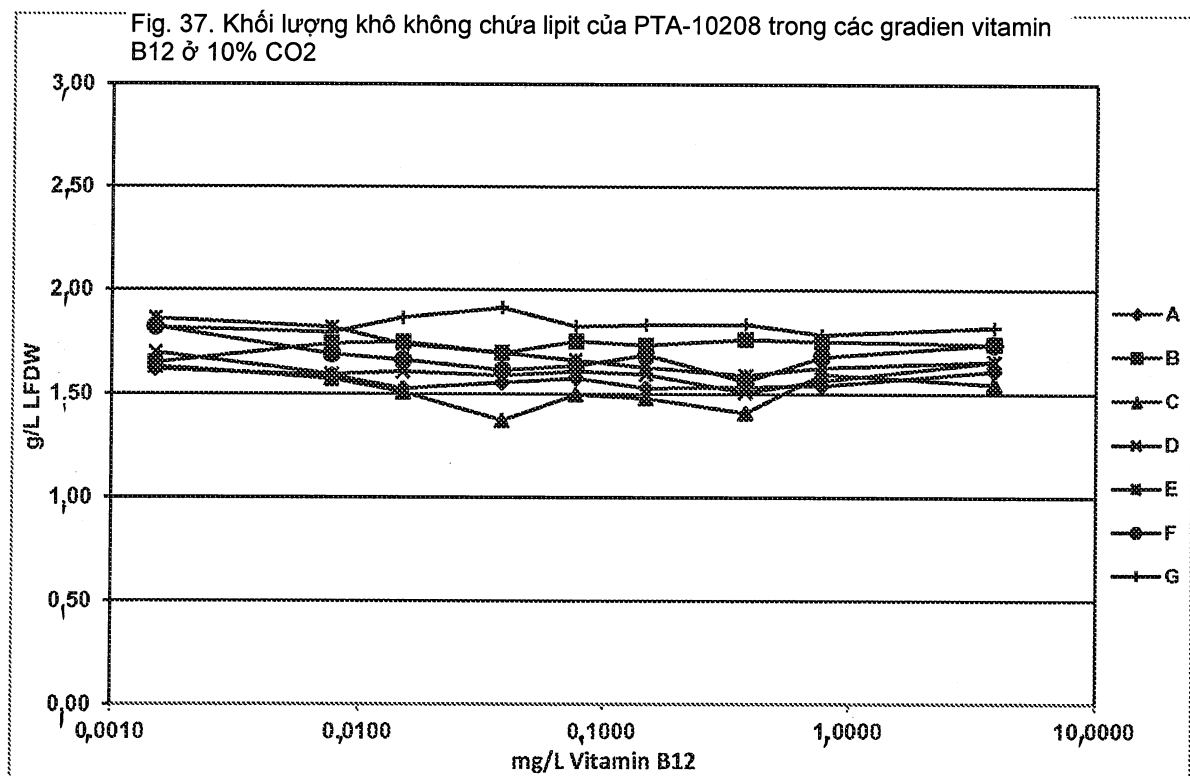












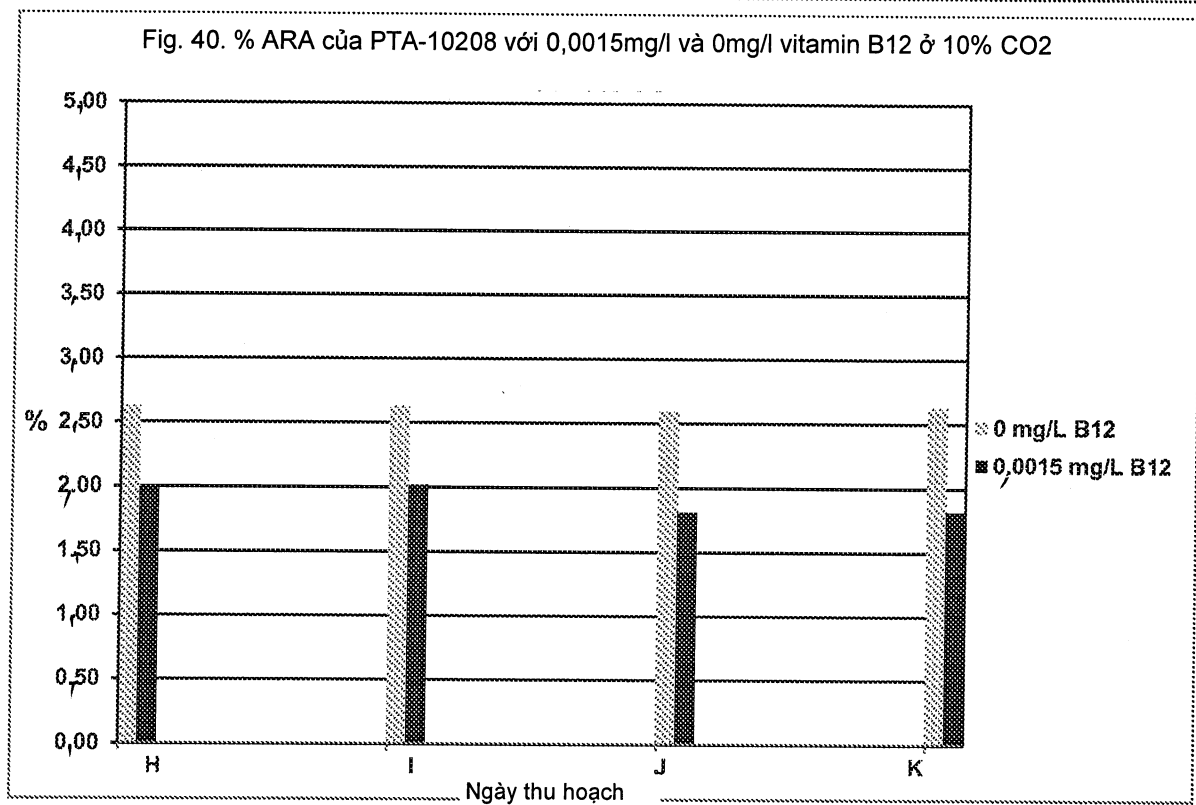
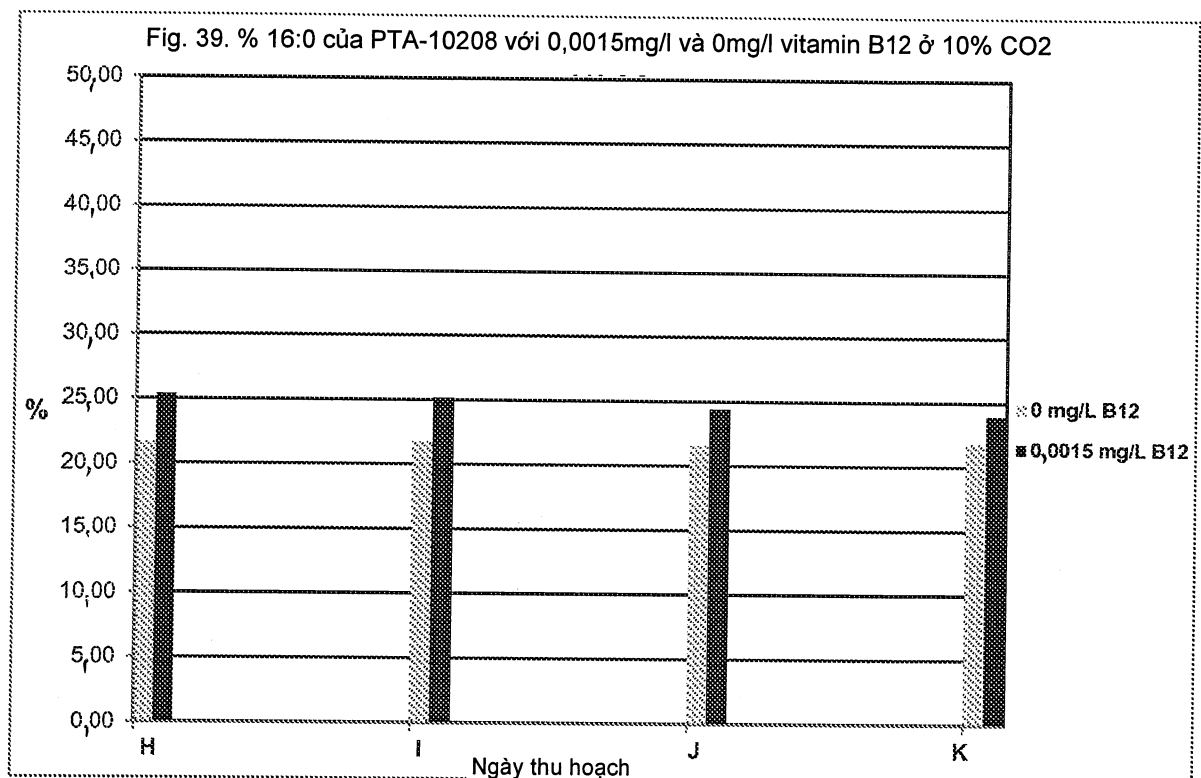
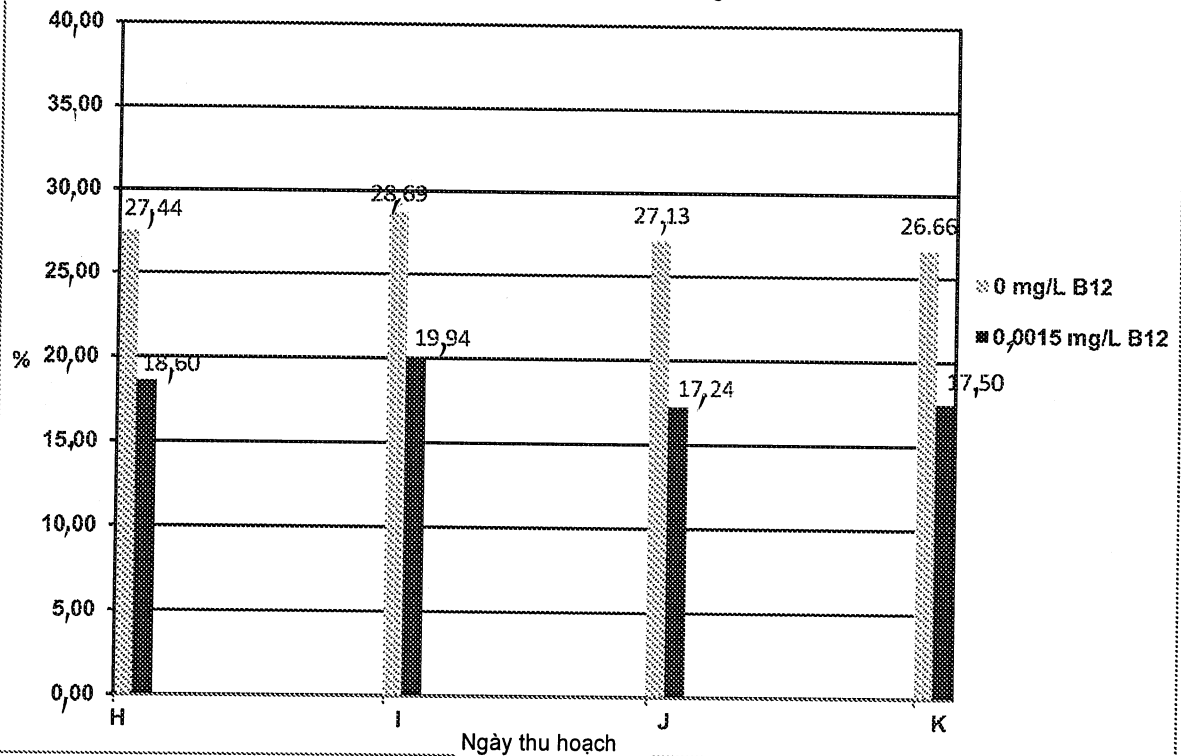
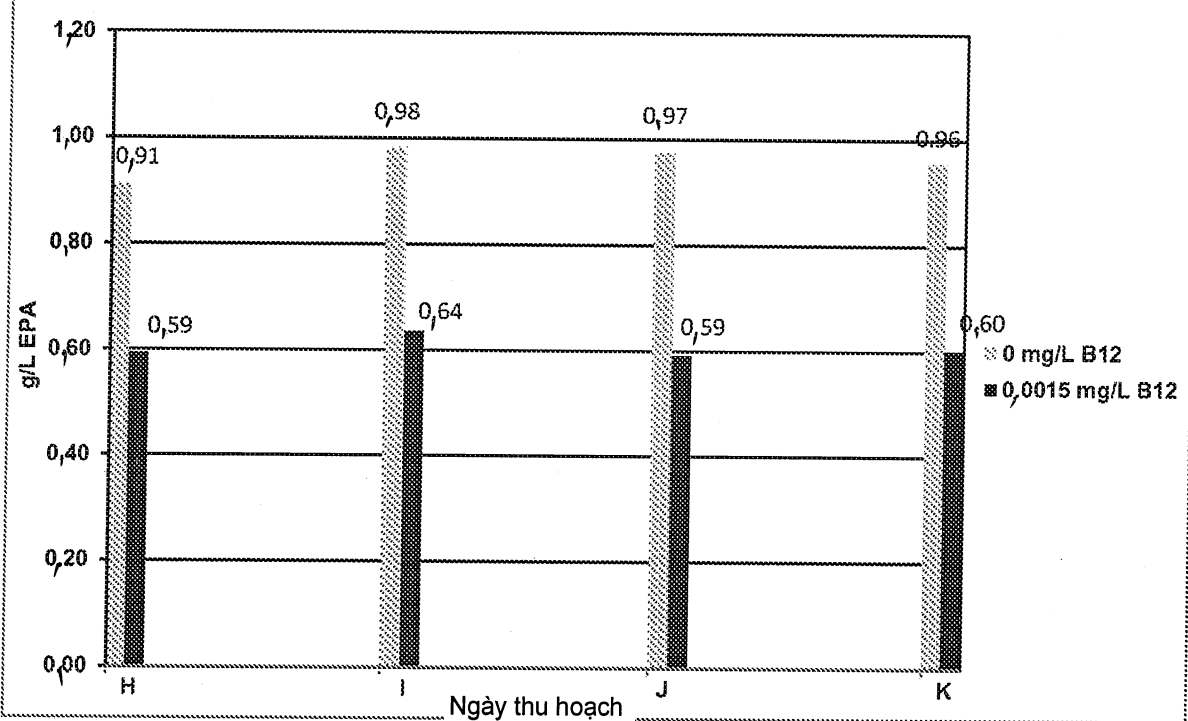


Fig. 41. % EPA của PTA-10208 với 0,0015mg/l và 0mg/l vitamin B12 ở 10% CO₂Fig. 42. Năng suất EPA của PTA-10208 với 0,0015mg/l và 0mg/l vitamin B12 ở 10% CO₂

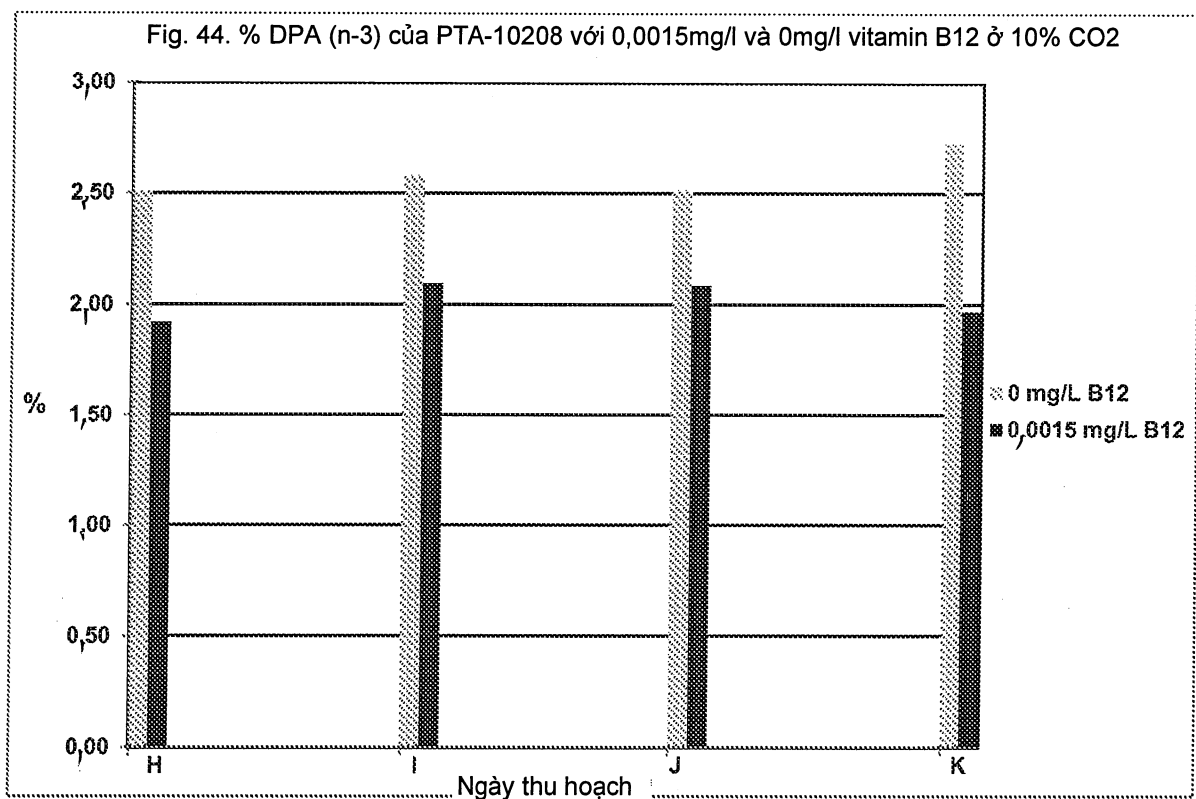
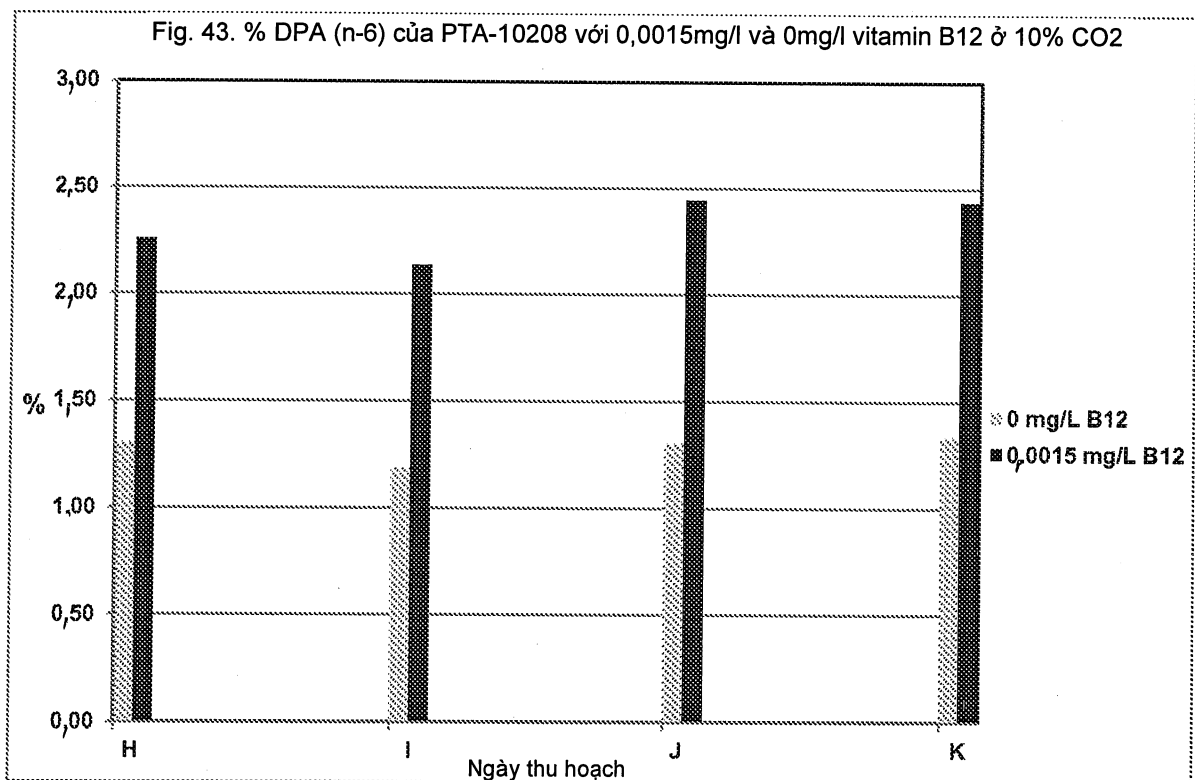


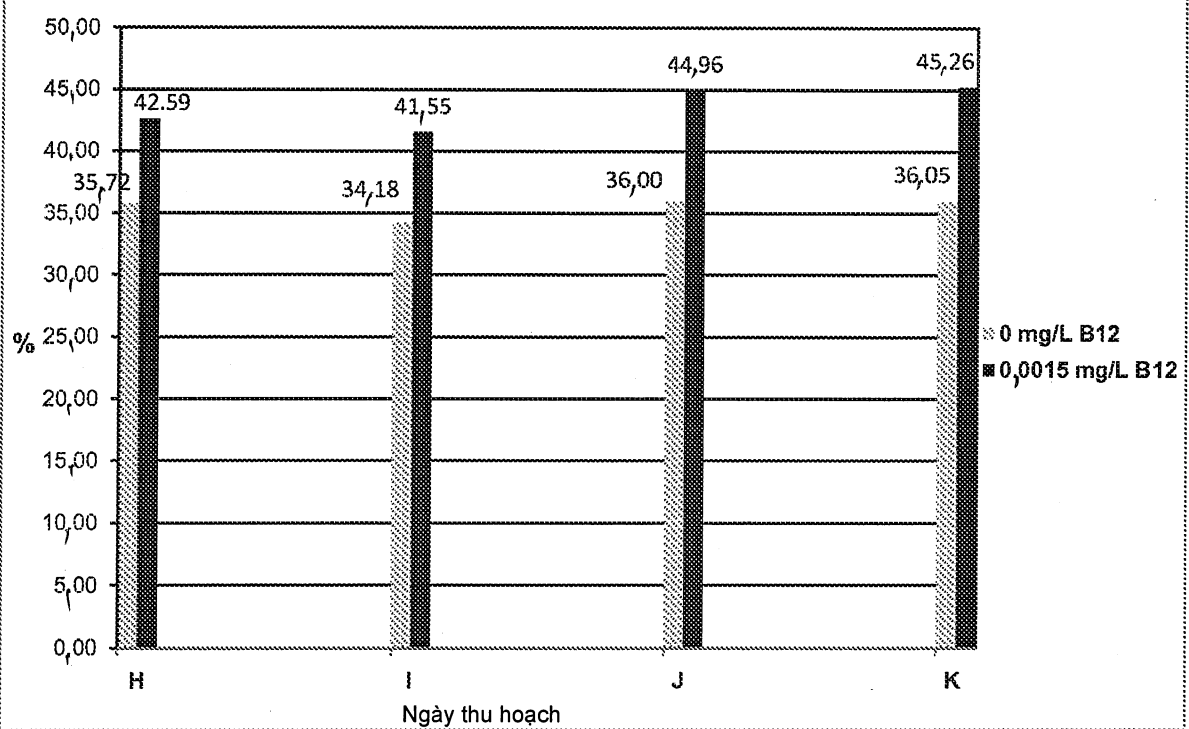
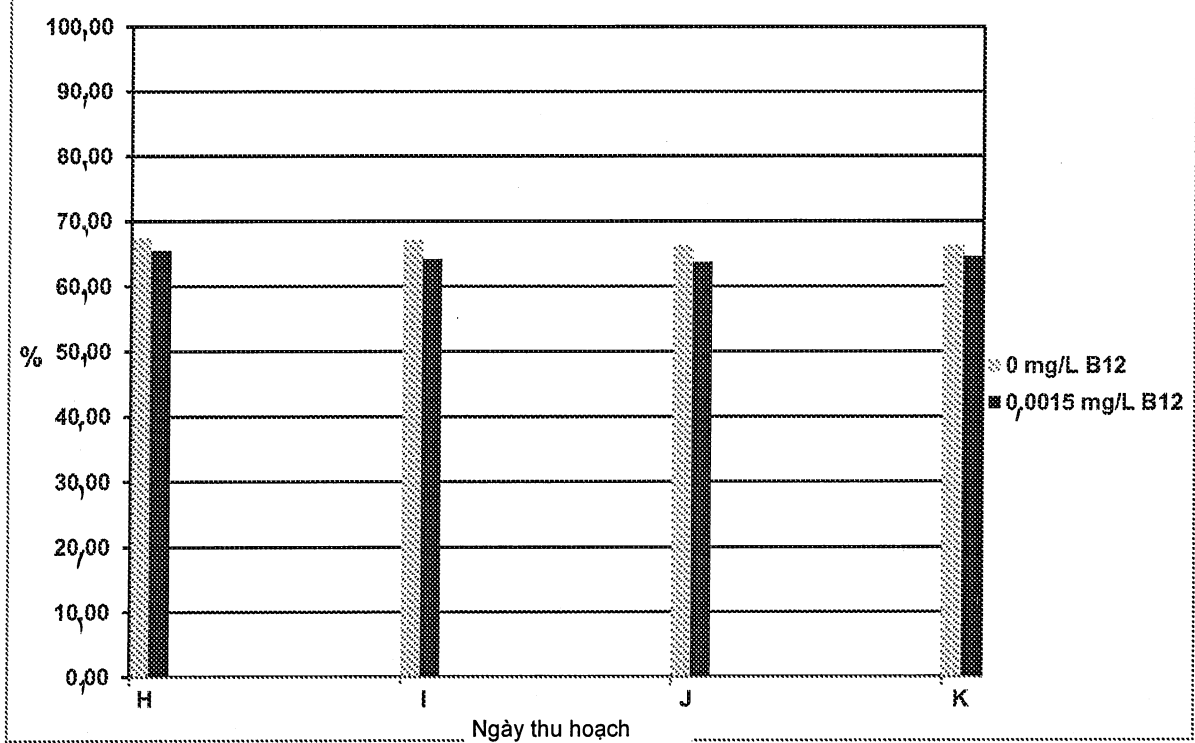
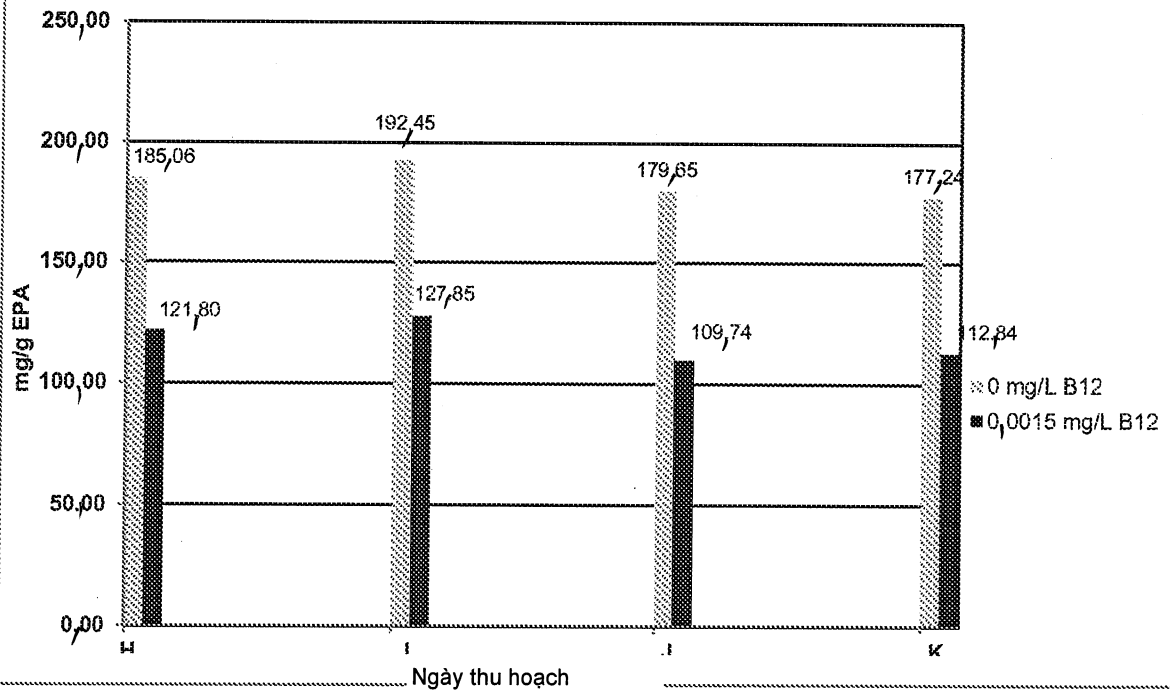
Fig. 45. % DHA của PTA-10208 với 0,0015mg/l và 0mg/l vitamin B12 ở 10% CO₂Fig. 46. % chất béo của PTA-10208 với 0,0015mg/l và 0mg/l vitamin B12 ở 10% CO₂

Fig. 47. mg/g EPA của PTA-10208 với 0,0015mg/l và 0mg/l vitamin B12 ở 10% CO₂Fig. 48. Năng suất DHA của PTA-10208 với 0,0015mg/l và 0mg/l vitamin B12 ở 10% CO₂