



(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)



1-0031008

(51)<sup>8</sup> A23L 33/17

(13) B

(21) 1-2017-02938

(22) 30/12/2015

(86) PCT/FR2015/053784 30/12/2015

(87) WO2016/108036 07/07/2016

(30) 1463512 31/12/2014 FR; 1560013 20/10/2015 FR

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/10/2017 355A

(73) YNSECT (FR)

1 Rue Pierre Fontaine, 91058 Evry Cedex, France

(72) ARMENJON, Benjamin (FR); BEREZINA, Nathalie (FR); LAURENT, Sophie (FR);  
HUBERT, Antoine (FR); SOCOLSKY, Cecilia (AR); SANCHEZ, Lorena (MX).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM DINH DƯỠNG CHỨA CÁC PROTEIN VÀ CHITIN, VÀ PHƯƠNG  
PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm dinh dưỡng chứa ít nhất 67% khối lượng các protein  
thô, ít nhất 5% khối lượng chitin, các tỷ lệ khối lượng là so với tổng khối lượng của hỗn  
hợp, và 85% khối lượng protein có thể tiêu hóa được so với tổng khối lượng của protein  
thô. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm nêu trên. Chế phẩm này là  
hữu dụng để làm chất dinh dưỡng cho người và động vật.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa các protein và chitin. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm này và việc sử dụng chế phẩm này để cung cấp dinh dưỡng cho người và động vật, và cụ thể hơn trong thức ăn cho cá.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Chăn nuôi thủy sản hiện nay là một trong những lĩnh vực năng động nhất trong ngành công nghiệp thực phẩm. Nhu cầu cao đối với cá đã dẫn đến sự gia tăng đáng kể về giá thực phẩm dự định trong chăn nuôi cá.

Một trong những sản phẩm được sử dụng nhiều nhất trong thức ăn cho cá đó là bột thức ăn cho cá. Trên thực tế, bột thức ăn cho cá là một trong những nguồn protein chính trong thức ăn chăn nuôi thủy sản. Đó là bột rất giàu về protein động vật (giàu về các axit amin thuộc các loại lysin và methionin) mà các protein này dễ dàng tiêu hóa. Nhu cầu ngày càng tăng kèm theo nguồn cung cấp hạn chế đã dẫn đến sự gia tăng đáng kể về chi phí, tạo ra nguy cơ cho phát triển chăn nuôi thủy sản bền vững. Như vậy, có nhu cầu cao về các nguồn thay thế có chất lượng cao và tốt nhất là các protein có thể phục hồi cho thức ăn chăn nuôi thủy sản.

Bột côn trùng tạo ra các nguồn protein thay thế tự nhiên và triển vọng khả năng có thể được sản xuất hàng loạt với dấu ấn sinh thái tối thiểu. Cụ thể, một số côn trùng như *Tenebrio molitor*, có lợi thế thích hợp cho sản xuất tập trung số lượng lớn.

Tuy nhiên, các kết quả thử nghiệm thay thế các bột côn trùng khác nhau cho bột thức ăn cho cá đã chứng minh có thể được kết hợp. Trong trường hợp mà việc thay thế được chứng minh là có thể, thông thường không vượt quá 50%, các tác dụng bất lợi cho sự phát triển của cá được quan sát thấy ở trên mức hàm lượng này.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu để có thể chứng minh rằng, chế phẩm đặc trưng có thể được sử dụng thuận lợi để thay thế bột thức ăn cho cá trong thức ăn chăn nuôi thủy sản.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Do đó, sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm ít nhất 67% khối lượng các protein thô, ít nhất 5% khối lượng chitin, các tỷ lệ % khối lượng được xác định so với tổng khối lượng của chế phẩm, và 85% khối lượng các protein có thể tiêu hóa được so với tổng khối lượng của các protein thô.

Lưu ý rằng, trong ngữ cảnh của đơn sáng chế này, và trừ khi được quy định theo cách khác, các khoảng giá trị nêu ra được hiểu là bao gồm tất cả.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig. 1 là đồ thị minh họa sự biến thiên của nhiệt độ của nước và về các mức oxy hòa tan trong các bể mà ở đó cá hồi nuôi bằng các liều lượng khác nhau của chế phẩm theo sáng chế được nuôi,

Fig. 2 bao gồm hai biểu đồ minh họa sự ảnh hưởng lên thể trọng cuối cùng (Fig. 2A) và tỷ lệ chuyển đổi thức ăn (Fig. 2B) của cá hồi được nuôi bằng các liều lượng khác nhau của chế phẩm theo sáng chế,

Fig. 3 minh họa sự phân bố các lipit nguồn gốc từ côn trùng được phát hiện trong dịch ép và bánh ép thu được bằng phương pháp bao gồm bước ép hoặc bước nghiền, sau đó ép, và

Fig. 4 là biểu đồ trình bày phân tích sắc ký loại trừ không gian về kích thước của các protein của chế phẩm theo sáng chế.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Việc định lượng “các protein thô” là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo cách ví dụ, phương pháp Dumas hoặc phương pháp Kjeldahl có thể được kể đến. Tốt hơn, phương pháp Dumas, tương ứng với tiêu chuẩn NF EN ISO 16634-1 (2008) được sử dụng.

Trong toàn bộ bản mô tả này, khi không có ngày tháng được chỉ rõ trong quy định, tiêu chuẩn hoặc hướng dẫn, thì tham chiếu quy định, tiêu chuẩn hoặc hướng dẫn hiệu lực vào ngày nộp.

Tốt hơn, chế phẩm chứa 68% khối lượng các protein thô, tốt hơn nữa 70% khối

lượng các protein thô, các tỷ lệ % khối lượng được xác định so với tổng khối lượng của chế phẩm.

Thuật ngữ “các protein có thể tiêu hóa được”, có nghĩa là các protein có thể tiêu hóa được được xác định khả năng tiêu hóa pepsin. Việc định lượng các protein có thể tiêu hóa được tốt hơn được thực hiện bằng phương pháp mô tả trong hướng dẫn số 72/199/EC.

Tốt hơn, chế phẩm chứa 86%, tốt hơn nữa 88% khối lượng các protein có thể tiêu hóa được so với tổng khối lượng của các protein thô.

Theo sáng chế, thuật ngữ “chitin” có nghĩa là loại dẫn xuất chitin bất kỳ, tức là, loại dẫn xuất polysacarit bất kỳ bao gồm các đơn vị N-axetyl-glucosamin và các đơn vị D-glucosamin, đặc biệt là các copolyme chitin-polypeptit (đôi khi còn được gọi là “phức hợp chitin-polypeptit”). Các copolyme này cũng có thể được kết hợp với các sắc tố, thường thuộc loại melanin.

Chitin là polyme tổng hợp phổ biến đứng hàng thứ hai trong thế giới sinh vật sống sau xenluloza. Trên thực tiễn, chitin được tổng hợp bởi nhiều loài trong thế giới sinh vật sống: nó cấu thành một phần của bộ xương ngoài của các động vật giáp xác và các côn trùng và vách bên bao xung quanh và bảo vệ nấm. Cụ thể hơn nữa, ở côn trùng, chitin như vậy cấu thành 3 đến 60% bộ xương ngoài của chúng.

Hàm lượng chitin được xác định bằng cách chiết. Phương pháp như vậy có thể là phương pháp AOAC 991.43 được mô tả trong ví dụ 2, và là phương pháp ưu tiên cho phương pháp xác định này.

Tốt hơn, chế phẩm chứa từ 5 đến 16% khối lượng chitin, tốt hơn nữa từ 8 đến 14% chitin, các tỷ lệ % khối lượng được xác định so với tổng khối lượng của chế phẩm.

Các chế phẩm trước đây có khả năng chứa cả protein và chitin thông thường là các chế phẩm thu được từ côn trùng và/hoặc động vật giáp xác. Tuy nhiên, các hàm lượng protein thô và protein có thể tiêu hóa được trong chế phẩm theo sáng chế chỉ có thể thu được duy nhất bằng phương pháp xử lý côn trùng và/hoặc động vật giáp xác mà phương pháp này bao gồm bước thủy phân. Bước thủy phân có tác dụng làm giảm hàm lượng chitin xuống mức khoảng 5% khối lượng, như thấp hơn 5% khối lượng, so với

tổng khối lượng của hỗn hợp.

Hiện nay, chitin thường được coi là một loại yếu tố kháng dinh dưỡng vì nó khó tiêu hóa. Điều này giải thích vì sao đối với các ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm nông nghiệp, các chế phẩm dựa vào côn trùng được khử chitin, tức là, bước loại bỏ chitin được thực hiện. Công việc của các tác giả sáng chế cũng giúp cho có thể chứng minh được rằng, trái ngược với các ý tưởng đã lĩnh hội, chitin không có tác động gì lên sự phát triển của cá được nuôi bằng chế phẩm theo sáng chế, chứa hàm lượng chitin đáng kể (xem trong ví dụ 4 dưới đây). Trái lại, chế phẩm theo sáng chế có thể thay thế một cách tiện lợi không chỉ một phần mà còn có thể thay thế hoàn toàn bột thức ăn cho cá trong thức ăn chăn nuôi thủy sản. Trên thực tiễn, chế phẩm theo sáng chế giúp cho có thể cải thiện sự sinh trưởng của động vật được nuôi bằng chế phẩm này.

Tuy nhiên, trong quá trình sản xuất thức ăn, việc đưa vào chế phẩm theo sáng chế cũng có một số lợi ích: giảm thiểu sự thất thoát các vitamin hòa tan trong nước trong các xử lý nhiệt tùy ý và giảm năng lượng cần thiết trong bước đun tùy ý.

Tốt hơn, chế phẩm theo sáng chế có hàm lượng độ ẩm còn lại nằm trong khoảng từ 2 đến 15%, tốt hơn từ 5 đến 10%, tốt hơn nữa từ 6 đến 8%. Hàm lượng độ ẩm này có thể, ví dụ, được xác định theo phương pháp tuân theo tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009 ngày 27-01-2009 (103°C / 4 giờ).

Tốt hơn, chế phẩm theo sáng chế có hàm lượng tro thấp hơn hoặc bằng 4% khối lượng so với tổng khối lượng của chế phẩm, và thậm chí tốt hơn nữa, thấp hơn hoặc bằng 3,5%.

Tro cấu thành phần bã còn lại sinh ra từ việc đốt cháy chế phẩm theo sáng chế.

Phương pháp xác định hàm lượng tro đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tốt hơn, hàm lượng tro được xác định theo phương pháp dựa theo tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009 ngày 27-01-2009.

Hàm lượng chất béo của chế phẩm theo sáng chế tốt hơn nằm trong khoảng từ 5 đến 20% khối lượng so với tổng khối lượng của chế phẩm, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 9 đến 17%.

Các phương pháp xác định hàm lượng chất béo đã biết đối với người có hiểu biết

trung bình trong lĩnh vực này. Theo cách ví dụ và theo cách ưu tiên, hàm lượng này sẽ được xác định theo phương pháp tuân theo tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009.

Như được nêu ở trên, chế phẩm theo sáng chế có thể thu được từ côn trùng.

Thuật ngữ “thu được” từ côn trùng, có nghĩa cụ thể hơn là chế phẩm thu được duy nhất từ côn trùng và tùy ý, nước. Chế phẩm thu được từ việc xử lý cơ học, nhiệt để loại trừ bất kỳ xử lý hóa học nào (không phải bằng nước) của các côn trùng.

Cụ thể hơn, chế phẩm là bột côn trùng. Thuật ngữ “bột côn trùng”, có nghĩa là bột có kích thước hạt chấp nhận được để dinh dưỡng cho người và động vật. Thuật ngữ “kích thước hạt chấp nhận được để dinh dưỡng cho người và động vật”, có nghĩa là kích thước hạt nằm trong khoảng từ 100µm đến 1,5mm, tốt hơn nằm trong khoảng từ 300µm đến 1mm, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 500 đến 800µm.

Côn trùng được ưu tiên trong điều chế bột như vậy là, ví dụ bộ cánh cứng (bộ cánh cứng), bộ hai cánh, bộ cánh vảy, bộ cánh đều, bộ cánh thẳng, bộ cánh màng, bộ gián, bộ cánh nửa, phân bộ cánh nửa, bộ phù du và bộ cánh dài, tốt hơn là bộ cánh cứng, bộ hai cánh, bộ cánh thẳng, bộ cánh vảy hoặc hỗn hợp của chúng.

Tốt hơn, các côn trùng được lựa chọn từ nhóm bao gồm *Tenebrio molitor*, *Hermetia illucens*, *Galleria mellonella*, *Alphitobius diaperinus*, *Zophobas morio*, *Blattella fusca*, *Tribolium castaneum*, *Rhynchophorus ferrugineus*, *Musca domestica*, *Chrysomya megacephala*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Acheta domesticus*, *Samia ricini* hoặc hỗn hợp của chúng, và thậm chí tốt hơn nữa, *Tenebrio molitor*.

Tốt hơn, chế phẩm theo sáng chế chứa từ 35 đến 65% khối lượng các protein hòa tan so với tổng khối lượng của các protein thô, và ít nhất 50% các protein hòa tan có kích thước nhỏ hơn hoặc bằng 12400g/mol.

Thuật ngữ “các protein hòa tan”, có nghĩa là, trong số các protein thô, các protein mà có thể hòa tan trong dung dịch nước mà độ pH của nó nằm trong khoảng từ 6 đến 8, tốt hơn nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,6.

Tốt hơn, dung dịch nước là dung dịch đậm mà độ pH của nó nằm trong khoảng từ 6 đến 8, tốt hơn nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,6. Tốt hơn, dung dịch đậm là dung

dịch đệm phosphat NaCl, độ pH của nó tương đương 7,4 +/- 0,2.

Khả năng tiêu hóa của các protein ở người và động vật đã được xác định rất nhiều bằng kích thước của các protein. Trong dinh dưỡng ở động vật, thông thường cần làm giảm kích thước của các protein nhằm để tạo thuận lợi cho sự tiêu hóa của động vật. Việc giảm kích thước này của các protein thường được thực hiện bằng các quá trình thủy phân (ví dụ, enzym), việc thực hiện công việc này đặc biệt tốt kém.

Chế phẩm theo sáng chế, thu được bằng quy trình không liên quan đến thủy phân, chứa lượng lớn các protein hòa tan mà kích thước của chúng được làm giảm đủ để tạo thuận lợi cho việc tiêu hóa bởi động vật. Chế phẩm theo sáng chế cũng thuận lợi ở chỗ, có khả năng được điều chế với chi phí thấp hơn.

Tốt hơn, chế phẩm theo sáng chế chứa từ 30 đến 60% khối lượng, tốt hơn từ 35 đến 55% khối lượng các protein hòa tan so với tổng khối lượng của các protein thô.

Tốt hơn, ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% các protein hòa tan có kích thước nhỏ hơn hoặc bằng 12400g/mol.

Cụ thể hơn, các protein hòa tan có kích thước nằm trong khoảng từ 6500 đến 12400g/mol.

Tốt hơn là thấp hơn 10%, tốt hơn nữa là thấp hơn 8%, còn tốt hơn nữa là thấp hơn 5%, và thậm chí tốt hơn nữa là 0% các protein hòa tan có kích thước cao hơn hoặc bằng 66000g/mol.

Việc phân bố các protein hòa tan như vậy được chứng minh trong Ví dụ 6.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều chế chế phẩm theo sáng chế.

Phương pháp điều chế chế phẩm theo sáng chế bao gồm bước ép côn trùng.

Mục đích của bước ép là để khử dầu ở các côn trùng và do đó, thu được bánh ép có hàm lượng dầu (hoặc chất béo) thấp hơn hoặc bằng 20% khối lượng so với khối lượng khô của bánh ép, tốt hơn thấp hơn hoặc bằng 17%.

Bước ép được mô tả đầy đủ hơn trong bước 2 của phương pháp điều chế mô tả chi tiết sau đây.

Cụ thể, có thể thực hiện ép nóng hoặc ép lạnh. Tốt hơn, hệ ép trục vít đơn được

sử dụng.

Cụ thể hơn, phương pháp điều chế theo sáng chế bao gồm các bước sau:

- i) giết côn trùng,
- ii) ép các côn trùng để thu được bánh ép, và
- iii) nghiền bánh ép.

Côn trùng có thể được giết bằng cách đun sôi hoặc chần nước sôi, như được mô tả đầy đủ hơn sau đây trong bước 1 của phương pháp mô tả chi tiết.

Tương tự, việc nghiền được mô tả đầy đủ hơn trong bước 4 của phương pháp mô tả chi tiết.

Sau cùng, phương pháp điều chế theo sáng chế cũng có thể bao gồm bước sấy khô bánh ép.

Bước sấy khô tốt hơn được thực hiện sau bước ép và trước bước nghiền.

Thao tác sấy khô được mô tả đầy đủ hơn trong bước 3 của phương pháp mô tả chi tiết.

Phương pháp chi tiết về điều chế chế phẩm theo sáng chế:

- Bước 1: giết côn trùng

Bước giết 1 này tốt hơn có thể được thực hiện bằng cách đun sôi hoặc bằng cách chần nước sôi. Bước 1 này giúp cho có thể giết các côn trùng trong khi làm giảm tải lượng vi khuẩn (giảm nguy cơ tổn hại và nguy cơ đối với sức khỏe) và bằng cách bất hoạt các nội enzym của các côn trùng mà chúng có thể khởi phát sự tự phân giải, và do đó, làm chín vàng chúng nhanh chóng.

Để đun sôi, các côn trùng, tốt hơn là ấu trùng, được đun sôi theo cách như vậy với nước trong thời gian từ 2 đến 20 phút, tốt hơn từ 5 đến 15 phút. Tốt hơn, nước là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 95 đến 105°C, tốt hơn là 100°C.

Lượng nước đưa vào trong khi đun sôi được xác định như sau: tỷ lệ của thể tích nước tính bằng mL trên khối lượng tính bằng g của côn trùng tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5, thậm chí tốt hơn nữa nằm



trong trong khoảng từ 0,7 đến 3, thậm chí tốt hơn nữa bằng 1.

Để chần nước sôi, các côn trùng, tốt hơn là ấu trùng, được chần bằng hơi (các vò hoặc giàn hơi) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 130°C, tốt hơn nằm trong khoảng từ 90 đến 120°C, tốt hơn nữa từ 95 đến 105°C, tốt hơn là 98°C hoặc bằng nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 95 đến 105°C, tốt hơn là 100°C (bằng các vò phun) hoặc theo phương thức kết hợp (nước + hơi) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 130°C, tốt hơn nằm trong khoảng từ 90 đến 120°C, tốt hơn nữa từ 95 đến 105°C, tốt hơn là 98°C. Thời gian duy trì ở ngăn chần nước sôi nằm trong khoảng từ 1 đến 15 phút, tốt hơn nằm trong khoảng từ 3 và 7 phút.

- Bước (tùy ý): nghiền

Côn trùng được lấy ra khỏi bể đun sôi hoặc ngăn chần nước sôi, sau đó chúng được rây (hoặc xả ra), và được đưa vào trong máy nghiền, như máy nghiền dao cắt, giúp cho có thể biến đổi côn trùng thành các hạt.

Để tạo thuận lợi cho bước nghiền, lượng nước có thể được bổ sung. Lượng nước này tương tự như lượng nước đưa vào trong bước đun sôi 1: tỷ lệ của thể tích nước tính bằng mL trên khối lượng tính bằng g của côn trùng tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10, tốt hơn nữa từ 0,5 đến 5, thậm chí tốt hơn nữa từ 0,7 đến 3, thậm chí tốt hơn nữa bằng 1. Cũng có thể duy trì nước đun sôi và/hoặc nước phát sinh từ bước chần nước sôi để thực hiện bước này.

Tốt hơn, khi hoàn thành bước nghiền, kích thước của hạt côn trùng nhỏ hơn 1 cm (kích thước hạt lớn nhất có thể quan sát được sử dụng kính hiển vi), tốt hơn nhỏ hơn 0,5 cm. Tốt hơn, kích thước hạt nằm trong khoảng từ 300µm đến 3 mm, tốt hơn nữa từ 500µm đến 1 mm. Không nhất thiết phải giảm quá mức kích thước hạt, ví dụ tới kích thước nhỏ hơn 250µm.

- Bước 2: ép

Côn trùng xuất phát từ bước giết 1 hoặc hỗn hợp nhão ướt phát sinh từ bước nghiền tùy ý sau đó được đưa vào trong hệ ép theo phương thức để có thể ép và tách dịch ép bao gồm cả phần chất béo và phần protein.

Tốt hơn, bước ép giúp cho có thể thu được bánh ép chứa hàm lượng dầu thấp hơn

hoặc bằng 20% khối lượng so với khối lượng khô của bánh ép, tốt hơn thấp hơn hoặc bằng 17%, tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 15%.

Tương tự, bước ép giúp cho có thể thu được bánh ép có hàm lượng chất khô nằm trong khoảng từ 30% đến 60%, tốt hơn từ 40% đến 55%, và tốt hơn nữa từ 45% đến 55%.

Hệ thống ép bất kỳ có thể được sử dụng để thực hiện bước ép, ví dụ như hệ ép trục vít đơn hoặc trục vít đôi (trục vít đôi kiểu Angel), hệ lọc ép (hệ lọc ép kiểu Choquenot), hệ ép tấm, v.v.. Các hệ thống này đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là người có khả năng xác định các điều kiện ép để thu được các hàm lượng dầu và/hoặc nước nêu trên.

Cụ thể, có thể thực hiện ép nóng hoặc ép lạnh. Tốt hơn, bước ép được thực hiện nóng, giúp cho có thể gia tăng việc khử dầu của bánh ép. Cụ thể, ép nóng giúp cho có thể thu được bánh ép chứa hàm lượng dầu thấp hơn hoặc bằng 17% khối lượng so với khối lượng khô của bánh ép, tốt hơn thấp hơn hoặc bằng 15%.

- Bước 3: sấy khô

Tiếp theo, bánh ép được sấy khô bằng các kỹ thuật chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Bước sấy khô có thể là trực tiếp hoặc gián tiếp (thiết bị sấy khô lớp mỏng, “thiết bị sấy khô cánh quạt”, “thiết bị sấy khô dạng ống”, “thiết bị sấy khô kiểu đĩa”, v.v..) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 200°C, trong thời gian từ 15 phút đến 24 giờ. Theo cách ví dụ, bánh ép có thể được sắp xếp và được sấy khô trong không khí thông gió/không khí khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 100°C, tốt hơn ở nhiệt độ 90°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 7 giờ, tốt hơn là 5 giờ.

Mục đích của bước sấy khô này là để thu được bánh ép có hàm lượng độ ẩm nằm trong khoảng từ 2 đến 15%, tốt hơn từ 5 đến 10%, thậm chí tốt hơn nữa từ 4 đến 8%.

- Bước 4: bước nghiền cuối cùng

Tiếp theo, bánh ép sấy khô được đưa vào trong máy nghiền, như máy nghiền kiểu búa đập, giúp cho có thể biến đổi bánh ép thành các hạt.

Tốt hơn, khi hoàn thành bước nghiền sau cùng này, kích thước của hạt còn trùng

nhỏ hơn 0,5cm (kích thước hạt lớn nhất có thể quan sát được sử dụng kính hiển vi), tốt hơn là 1mm. Cụ thể hơn, kích thước hạt nằm trong khoảng từ 300µm đến 1mm, thậm chí tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 500 đến 800µm.

Chuỗi gồm 4 bước này giúp cho có thể thu được chế phẩm theo sáng chế, chứa mức protein thô và protein có thể tiêu hóa được cao trong khi duy trì được hàm lượng chitin ở mức ít nhất 5% khối lượng so với tổng khối lượng của hỗn hợp.

Như được nêu ở trên, bước ép có thể được thực hiện lạnh hoặc nóng.

Theo cách ví dụ về phương pháp để thu được chế phẩm theo sáng chế, bao gồm bước ép lạnh:

Ấu trùng, ví dụ ấu trùng *T. molitor*, được đưa vào một cốc mỡ chứa 200mL nước được đun sôi trước, và được giết bằng cách đun sôi trong một bình nước ở nhiệt độ 100°C. Sau thời gian 5 phút, cốc mỡ được lấy ra khỏi bình nước, ấu trùng được xả ra, sau đó được kết hợp với một thể tích nước 200mL. Dịch thu được theo cách như vậy được chuyển vào trong hệ ép kiểu trục vít đôi. Bánh ép thu được theo cách như vậy được sấy khô trong thời gian 24 giờ trong lò sấy ở nhiệt độ 70°C, sau đó được nghiền tới 250µm.

Theo cách ví dụ về phương pháp để thu được chế phẩm theo sáng chế, bao gồm bước ép nóng:

Ấu trùng, ví dụ ấu trùng *T. molitor*, được đưa vào ngăn chặn nước sôi và được chặn trong hơi nước trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 100°C. Tiếp theo, ấu trùng đã chặn theo cách như vậy được đưa vào hệ ép kiểu "sấy khô" thích hợp với các sản phẩm chứa nhiều nước. Bánh ép thu được theo cách như vậy được sấy khô trong thời gian 5 giờ trong lò sấy ở nhiệt độ 90°C, tiếp theo được nghiền trong máy nghiền kiểu búa đập tới 1mm.

Tốt hơn, phương pháp điều chế chế phẩm theo sáng chế bao gồm các bước sau:

- i) giết côn trùng,
- ii) ép các côn trùng để thu được bánh ép,
- iii) sấy khô bánh ép, và

iv) nghiền bánh ép.

Theo phương án thứ nhất của phương pháp theo sáng chế, bước ép được tiến hành trước bởi bước nghiền các côn trùng.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm theo sáng chế bao gồm các bước sau:

- i) giết côn trùng,
- ii) ép các côn trùng để thu được bánh ép,
- iii) sấy khô bánh ép, và
- iv) nghiền bánh ép,

trong đó, bước ép được tiến hành trước bởi bước nghiền các côn trùng.

Lợi ích của bước nghiền các côn trùng trước bước ép được mô tả đầy đủ hơn trong ví dụ 5.

Theo phương án thứ hai của phương pháp theo sáng chế, bước ép các côn trùng được thực hiện nóng.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm theo sáng chế bao gồm các bước sau:

- i) giết côn trùng,
- ii) ép các côn trùng để thu được bánh ép,
- iii) sấy khô bánh ép, và
- iv) nghiền bánh ép,

trong đó, bước ép được thực hiện nóng.

Như được nêu ở trên, ép nóng giúp cho có thể thu được bánh ép chứa hàm lượng dầu thấp hơn hoặc bằng 17% khối lượng so với khối lượng khô của bánh ép, tốt hơn thấp hơn hoặc bằng 15%.

Theo phương án thứ ba của phương pháp theo sáng chế, bước nghiền bánh ép được thực hiện tới kích thước hạt nằm trong khoảng từ 300 $\mu$ m đến 1mm, tốt hơn từ 500 đến 800 $\mu$ m.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm theo sáng chế bao gồm các bước sau:

- i) giết côn trùng,
- ii) ép các côn trùng để thu được bánh ép,
- iii) sấy khô bánh ép, và
- iv) nghiền bánh ép,

trong đó, bước nghiền bánh ép được thực hiện tới kích thước hạt nằm trong khoảng từ 300 $\mu$ m đến 1mm.

Cụ thể hơn, trong phương án thứ ba này của phương pháp theo sáng chế, bước ép các côn trùng có thể được thực hiện nóng. Theo cách khác, bước ép có thể được tiến hành trước bởi nghiền các côn trùng.

Sau cùng, sáng chế bộc lộ việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế trong dinh dưỡng cho người và động vật.

Tốt hơn, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trong thức ăn cho động vật cảnh như chó, mèo, chim, cá, bò sát và động vật gặm nhấm.

Cụ thể hơn, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trong chăn nuôi thủy sản (cá, các động vật giáp xác, động vật thân mềm, loài có vỏ như tôm sò hến), thức ăn cho gia cầm (gà, gà tây, thú săn như chim cú, gà lôi, chim ôtit), lợn, động vật nhai lại (gia súc, cừu, dê, ngựa) và chồn.

Sau cùng, chế phẩm theo sáng chế tốt hơn có thể được sử dụng để thay thế bột protein.

Bột protein cụ thể hơn có nghĩa là bột thức ăn cho cá, sữa bột hoặc bột lactoserum, protein đậu nành đậm đặc ("CSP"), bột thịt, ví dụ như bột thịt gia cầm.

Việc thay thế có thể là một phần hoặc toàn bộ.

Tốt hơn, chế phẩm theo sáng chế được sử dụng để thay thế một phần hoặc toàn bộ bột thức ăn cho cá, như thay thế 50 hoặc 100%.

Các dấu hiệu và lợi thế khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần ví dụ sau,

được đưa ra để minh họa.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phương pháp điều chế chế phẩm theo sáng chế

Chế phẩm theo sáng chế được điều chế từ ấu trùng *Tenebrio molitor*. Khi tiếp nhận ấu trùng, chúng có thể được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong thời gian từ 0 đến 15 ngày trong các bể nuôi của chúng không làm suy biến nhiều trước khi được giết. Khối lượng (tuổi) của ấu trùng sử dụng thay đổi và do đó, thành phần của chúng có thể thay đổi, như được minh họa trong bảng 1 dưới đây:

Bảng 1: Thành phần sinh hóa của ấu trùng *Tenebrio molitor* theo khối lượng của chúng

| Sinh khối<br>(các côn trùng) | mg | 23   | 35   | 58   | 80   | 108  | 154  |
|------------------------------|----|------|------|------|------|------|------|
| Chất khô                     | %* | 34   | 34   | 34,2 | 37,9 | 39,6 | 39,5 |
| Tro                          | %* | 1,59 | 1,52 | 1,6  | 1,75 | 1,67 | 1,43 |
| Các protein thô              | %* | 22,6 | 22,2 | 22   | 23,2 | 23,1 | 23,2 |
| Lipit                        | %* | 6,62 | 6,88 | 7,98 | 10,3 | 10,9 | 11,7 |

\* Tỷ lệ % được biểu diễn là khối lượng khô so với khối lượng ẩm của ấu trùng.

#### • Bước 1: Chần nước sôi các côn trùng

Ấu trùng sống (+4°C đến + 25°C) được vận chuyển theo các lớp với độ dày nằm trong khoảng từ 2 đến 10 cm, trên băng chuyền đục lỗ (1mm) tới ngăn chần nước sôi. Như vậy, côn trùng được chần trong hơi nước (các vòi hoặc giàn hơi) ở nhiệt độ 98°C hoặc trong nước ở nhiệt độ 100°C (vòi phun) hoặc theo phương thức kết hợp (nước + hơi). Thời gian duy trì ở ngăn chần nước sôi nằm trong khoảng từ 1 đến 15 phút, lý tưởng là 5 phút.

Nhiệt độ của ấu trùng sau khi chần nước sôi nằm trong khoảng từ 75°C đến 98°C.

#### • Bước 2: Ép

Ấu trùng, khi đã được chần nước sôi, được vận chuyển tới phễu nạp liệu của hệ ép trục vít đơn liên tục. Trong khi chuyển vào hệ thống ép, ấu trùng được duy trì ở nhiệt độ trên 70°C nhằm để gia tăng hiệu suất khử dầu. Nguyên lý khử dầu đó là ép nguyên

liệu bên trong buồng hình trụ thông qua việc bố trí các trục vít và vành được bố trí ở trục trung tâm. Buồng được lót bên trong bằng các thanh được phân bố ở các phần và được giữ cách nhau bởi các khoảng có độ dày khác nhau tùy thuộc vào vùng thao tác. Các khe hở được sắp xếp theo cách như vậy cho phép dòng phân đoạn dầu/chất béo trong khi hạn chế sự chuyển qua của chất được gọi là "chất khô", phần protein, phần này được gọi là "bánh ép", như vậy được bao gồm trong quá trình điều áp.

Hiệu suất ép thu được nằm trong khoảng từ 48 đến 55%.

$$Y_{\text{bánh}} = (\text{khối lượng}_{\text{bánh}} / \text{khối lượng}_{\text{dịch ép}} + \text{khối lượng}_{\text{bánh}})$$

Bánh ép thu được chứa từ 35 đến 40% chất khô, 67 đến 75% protein và 13 đến 17 % chất béo, các tỷ lệ % khối lượng được xác định so với khối lượng khô của bánh ép.

#### • Bước 3: Sấy khô

Tiếp theo, bánh ép được sắp xếp trên khay theo lớp mỏng (xấp xỉ 2cm) và được sấy khô trong không khí thông gió/không khí khuấy ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 5 giờ để thu được bánh ép có hàm lượng chất khô cao hơn 92%.

Bước này giúp cho có thể đề phòng bất kỳ sự lây nhiễm nào xuất hiện khi giết.

Hoạt độ nước ( $A_w$ ) sau khi sấy khô là 0,35. Các kết quả về vi sinh vật học chứng minh không có mặt *Salmonella spp* (phương pháp: IRIS Salmonella BKR 23/07-10/11) và các giá trị vi khuẩn đường ruột Enterobacteria thấp hơn 10 CFU/g (phương pháp: NF ISO 2128-2, tháng 12 năm 2004, 30°C và 37°C).

#### • Bước 4: Nghiền

Bánh ép sấy khô, chủ yếu bao gồm các protein, sau cùng được nghiền sử dụng máy nghiền kiểu búa đập liên tục (6 bộ phận chuyển động thuận nghịch – độ dày 8mm). Máy nghiền được cấp liệu bằng phễu có van kiểm soát tốc độ dòng (180 kg/giờ). Lưới đục lỗ sử dụng để kiểm soát cấp phối đầu ra là 0,8mm. Tốc độ quay của động cơ là 3000 vòng/phút (động cơ điện, công suất hấp thụ 4 kW (5,5 CV)).

Ví dụ 2: Mô tả đặc tính của chế phẩm theo sáng chế

Chế phẩm điều chế trong ví dụ 1 được mô tả đặc tính.

## 1. Phân tích

### 1.1. Xác định hàm lượng độ ẩm

Hàm lượng độ ẩm được xác định theo phương pháp tuân theo tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009 ngày 27/01/2009 (103°C / 4 giờ).

### 1.2 Xác định lượng protein thô

Các protein thô được xác định theo phương pháp được gọi là Dumas, và tương ứng với tiêu chuẩn NF EN ISO 16634-1 (2008).

### 1.3 Xác định lượng chitin

Chất xơ thực phẩm trong bột côn trùng chủ yếu bao gồm chitin, do đó gần đây được thử nghiệm theo phương pháp AOAC 991.43. Các giá trị thu được theo cách như vậy được đánh giá hơi cao một chút làm kết quả.

### 1.4 Xác định lượng chất béo

Chất béo được xác định theo phương pháp tuân theo tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009.

### 1.5 Xác định lượng tro

Tro thô được xác định theo phương pháp tuân theo tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009 ngày 27-01-2009.

### 1.6 Xác định lượng phospho

Phospho được thử nghiệm bằng phương pháp plasma ghép cặp cảm ứng ICP (“induced coupled plasma”) có nội chuẩn.

### 1.7 Xác định năng lượng

Giá trị năng lượng thu được với các hệ số theo tiêu chuẩn châu Âu EU Regulation 1169/2011.

### 1.8 Xác định các lượng axit amin và axit béo

Việc xác định này được thực hiện bằng phương pháp sắc ký khí sau khi thủy phân và dẫn xuất hóa lần lượt các axit amin và các axit béo.

### 1.9 Xác định khả năng tiêu hóa pepsin



Khả năng tiêu hóa pepsin được đo bằng phương pháp được mô tả trong Hướng dẫn số 72/199/EC.

## 2. Kết quả

Chế phẩm theo sáng chế được mô tả chi tiết trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Thành phần

| <b>Đại dưỡng chất</b> | <b>Đơn vị</b> | <b>Thành phần</b> |
|-----------------------|---------------|-------------------|
| Độ ẩm                 | %*            | 5,32              |
| Protein               | %*            | 67,09             |
| Chitin                | %*            | 8,0               |
| Chất béo              | %*            | 13,6              |
| Tro                   | %*            | 3,21              |
| Tổng lượng phospho    | %*            | 0,75              |
| Năng lượng            | MJ/kg         | 23,74             |

| <b>Các axit amin</b> | <b>Đơn vị</b> | <b>Thành phần</b> |
|----------------------|---------------|-------------------|
| Arginin              | %*            | 2,56              |
| Histidin             | %*            | 1,39              |
| Isoleuxin            | %*            | 2,11              |
| Leuxin               | %*            | 3,99              |
| Lysin                | %*            | 3,32              |
| Threonin             | %*            | 1,87              |
| Valin                | %*            | 2,91              |
| Methionin            | %*            | 1,43              |
| Xystein              | %*            | 0,63              |
| Phenylalanin         | %*            | 1,98              |
| Tyrosin              | %*            | 2,68              |

| <b>Các axit béo</b> | <b>Đơn vị</b> | <b>Thành phần</b> |
|---------------------|---------------|-------------------|
| C12:0               | %*            | 0,03              |
| C14:0               | %*            | 0,22              |
| C15:0               | %*            | 0,01              |
| C16:0               | %*            | 1,33              |
| C16:1               | %*            | 0,05              |
| C16:1n-7            | %*            | 0,16              |
| C17:0               | %*            | 0,02              |
| C17:1               | %*            | 0,01              |
|                     |               |                   |
| C18:0               | %*            | 0,35              |
| C18:1n-9            | %*            | 3,03              |
| C18:1n-7            | %*            | 0,04              |
| C18:2n-6            | %*            | 2,96              |
| C18:2tn-6           | %*            | 0,02              |
| C18:3n-3            | %*            | 0,14              |
| C20:0               | %*            | 0,02              |
| C20:1n-9            | %*            | 0,01              |
| C20:2n-6            | %*            | 0,01              |
| C22:0               | %*            | 0,01              |

|                              |    |      |
|------------------------------|----|------|
| Taurin                       | %* | 0,42 |
| Axit aspartic +<br>asparagin | %* | 4,51 |
| Axit glutamic +<br>glutamin  | %* | 6,36 |
| Alanin                       | %* | 3,83 |
| Glyxin                       | %* | 2,54 |
| Prolin                       | %* | 3,18 |
| Serin                        | %* | 2,94 |

\* các tỷ lệ % khối lượng được biểu diễn so với tổng khối lượng của chế phẩm.

Ngoài ra, đạt được khả năng tiêu hóa pepsin bằng 90+/-2%.

Ví dụ 3: Phương pháp khác để điều chế chế phẩm theo sáng chế

200g ấu trùng *T. molitor* được đưa vào một cốc nhỏ, đặt vào trong một chậu nước ở nhiệt độ 100°C và chứa 200mL nước được đun sôi trước. Sau thời gian 5 phút, cốc nhỏ được lấy ra khỏi bình nước, ấu trùng được xả ra, sau đó được kết hợp với một thể tích nước 200mL. Dịch thu được theo cách như vậy được chuyển vào trong hệ ép kiểu trục vít đôi. Bánh ép thu được theo cách như vậy được sấy khô trong thời gian 24 giờ trong lò sấy ở nhiệt độ 70°C, sau đó được nghiền tới 250µm. Chế phẩm theo sáng chế thu được theo cách như vậy.

Ví dụ 4: Đưa chế phẩm theo sáng chế vào trong thức ăn cho cá

Trong ví dụ này, sự tác động của việc bao gồm chế phẩm theo sáng chế trong thức ăn lên sự sinh trưởng, tiêu thụ thức ăn, sự chuyển đổi thức ăn, thành phần cơ thể và khả năng tiêu hóa biểu kiến của các chất dinh dưỡng ở cá hồi vân được nghiên cứu.

#### 1. Vật liệu và phương pháp

##### 1.1. Chế phẩm theo sáng chế

Chế phẩm sử dụng trong ví dụ này là chế phẩm thu được trong ví dụ 1 và được mô tả đầy đủ hơn trong ví dụ 2.

##### 1.2. Khẩu phần ăn thử nghiệm

Khẩu phần ăn dựa vào bột thức ăn cho cá (CTRL) được phối chế với các thành

phần thích hợp để đáp ứng các nhu cầu dinh dưỡng đã biết của cá hồi vân chưa trưởng thành. Chế độ ăn CTRL này bao gồm 25% bột thức ăn cho cá, 8% các nguồn protein khác nguồn gốc từ biển (bột cá mực ống và bột nhuyễn thể), trong khi các nguồn protein còn lại là protein đậu nành cô đặc, gluten lúa mì và gluten ngô. Trên cơ sở công thức phối chế này, bốn khẩu phần ăn thử nghiệm (Y5, Y7,5, Y15 và Y25) được thiết lập, trong đó bột thức ăn cho cá được thay thế bằng chế phẩm theo sáng chế với hàm lượng lần lượt là 20, 30, 60 và 100% (xem trong bảng 3 dưới đây).

Bảng 3: Công thức phối chế và thành phần của khẩu phần ăn thử nghiệm

| <b>Các thành phần tính<br/>theo %*:</b>                      | <b>CTRL</b> | <b>Y5</b> | <b>Y7,5</b> | <b>Y15</b> | <b>Y25</b> |
|--------------------------------------------------------------|-------------|-----------|-------------|------------|------------|
| Bột thức ăn cho cá<br>LT70 <sup>1</sup>                      | 25,00       | 20,00     | 17,50       | 10,00      | 0,00       |
| Bột nhuyễn thể <sup>2</sup>                                  | 3,00        | 3,00      | 3,00        | 3,00       | 3,00       |
| Bột cá mực ống <sup>3</sup>                                  | 5,00        | 5,00      | 5,00        | 5,00       | 5,00       |
| Chế phẩm theo sáng chế                                       |             | 5,00      | 750         | 15,00      | 25,00      |
| Protein đậu nành cô<br>đặc <sup>4</sup>                      | 14,00       | 14,00     | 14,00       | 14,00      | 14,00      |
| Gluten lúa mì <sup>5</sup>                                   | 9,05        | 9,25      | 9,40        | 9,65       | 10,10      |
| Gluten ngô <sup>6</sup>                                      | 8,20        | 8,20      | 8,20        | 8,20       | 8,20       |
| Bột đậu nành 48                                              | 7,50        | 7,50      | 7,50        | 7,50       | 7,50       |
| Đậu Hà Lan toàn phần                                         | 6,15        | 5,75      | 5,40        | 4,75       | 3,70       |
| Dầu cá                                                       | 11,50       | 11,50     | 11,50       | 11,50      | 11,50      |
| Dầu hạt cải dầu                                              | 6,00        | 5,80      | 5,70        | 5,40       | 5,00       |
| Hỗn hợp sơ bộ của các<br>vitamin và khoáng chất <sup>7</sup> | 1,50        | 1,50      | 1,50        | 1,50       | 1,50       |
| Lecithin đậu nành                                            | 1,00        | 1,00      | 1,00        | 1,00       | 1,00       |
| Gôm guar                                                     | 0,20        | 0,20      | 0,20        | 0,20       | 0,20       |
| Chất chống oxy hóa                                           | 0,20        | 0,20      | 0,20        | 0,20       | 0,20       |
| Natri propionat                                              | 0,10        | 0,10      | 0,10        | 0,10       | 0,10       |
| Monocanxi phosphat                                           | 1,30        | 1,70      | 2,00        | 2,60       | 3,50       |

|                              |            |            |            |            |            |
|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| DL-methionin                 | 0,30       | 0,30       | 0,30       | 0,40       | 0,50       |
| Ytri oxit <sup>8</sup>       | 0,02       | 0,02       | 0,02       | 0,02       | 0,02       |
|                              |            |            |            |            |            |
| Chất khô (DM), %*            | 93,4 ± 0,0 | 93,1 ± 0,0 | 93, ± 0,1  | 95,0 ± 0,0 | 93,2 ± 0,0 |
| Protein thô, % DM**          | 48,5 ± 0,0 | 48,5 ± 0,1 | 48,5 ± 0,0 | 48,5 ± 0,0 | 48,5 ± 0,1 |
| Các chất béo thô, % DM**     | 22,7 ± 0,2 | 22,7 ± 0,1 | 22,6 ± 0,2 | 22,7 ± 0,2 | 22,7 ± 0,2 |
| Tro, % DM**                  | 9,4 ± 0,0  | 8,8 ± 0,0  | 8,7 ± 0,1  | 8,1 ± 0,0  | 7,4 ± 0,0  |
| Chitin, % DM**               | 0,06       | 0,46       | 0,66       | 1,26       | 2,06       |
| Năng lượng thô, MJ/kg của DM | 23,2 ± 0,2 | 23,2 ± 0,0 | 23,2 ± 0,0 | 23,2 ± 0,1 | 23,2 ± 0,1 |

\* % chất khô so với tổng khối lượng của hỗn hợp

\*\* % khối lượng khô so với tổng khối lượng của chất khô

<sup>1</sup> Bột thức ăn cho cá của Pê-ru LT70: 71% các protein thô (CP), 11% các chất béo thô (CF), EXALMAR, Peru; <sup>2</sup>Bột nhuyễn thể: 61% CP, 19% CF, Aker BioMarine Antarctic AS, Norway; <sup>3</sup>Super Prime không có nội tạng: 82% CP, 3,5% CF, Sopropêche, France; <sup>4</sup>Soycomil P: 62% CP, 0,7% CF, ADM, Netherlands; <sup>5</sup>VITEN: 84,7% CP, 1,3% CF, ROQUETTE, France; <sup>6</sup>bột gluten ngô: 61% CP, 6% CF, COPAM, Portugal; <sup>7</sup>PREMIX Lda, Portugal. Các vitamin (khẩu phần ăn theo IU hoặc mg/kg): DL-alpha tocopherol axetat, 100mg; Menadione natri bisulfit, 25mg; Retinyl axetat, 20,000 IU; DL-cholecalciferol, 2000 IU; thiamine, 30mg; riboflavin, 30mg; pyridoxin, 20mg; xyanocobalamin, 0,1mg; axit nicotinic, 200mg; axit folic, 15mg; axit ascorbic, 1000mg; inositol, 500mg; biotin, 3mg; canxi pantothenat, 100mg; cholin clorua, 1000 mg, betaine, 500 mg. các khoáng chất (g hoặc mg/kg): coban cacbonat, 0,65mg; đồng sulphat, 9mg; sắt (III) sulphat, 6mg; kali iodua, 0,5mg; mangan oxit, 9,6mg; natri selenit, 0,01mg; kẽm sulphat, 7,5mg; natri clorua, 400mg; canxi cacbonat, 1,86 g; tá dược bột mì; <sup>8</sup>Ytri oxit được kết hợp chỉ duy nhất trong phần thức ăn sử dụng để xác định khả năng tiêu hóa.

Các mức bột cá mực ống và bột nhuyễn thể được duy trì hằng định trong tất cả các khẩu phần ăn để bảo đảm khả năng dễ chấp nhận cao. Những điều chỉnh nhỏ

được tiến hành đối với công thức phối chế các khẩu phần ăn được thử nghiệm để duy trì các điều kiện khẩu phần ăn có cùng mức nitơ (protein thô, 48,5% DM), các điều kiện khẩu phần ăn có cùng mức lipit (22,7% DM) và các điều kiện khẩu phần ăn có cùng mức năng lượng (năng lượng thô, 23,2 MJ/ kg DM). Các mức bổ sung bằng methionin và monocalxi phosphat trong khẩu phần ăn thử nghiệm được điều chỉnh để tương ứng với các mức có trong thức ăn CTRL.

Khẩu phần ăn được tạo ra bằng cách đùn (kích thước hạt: 1,2 và 2,0mm) sử dụng máy ép đùn kiểu trục vít kép CLEXTRAL BC45 trên phạm vi thí điểm với đường kính trục vít là 55,5mm và phạm vi nhiệt độ nằm trong khoảng từ 119 đến 123°C. Trong khi đùn, tất cả các mẻ thức ăn đùn ra được sấy khô trong máy sấy tầng sôi rung (model DR100, TGC Extrusion, France). Sau khi làm nguội hạt, dầu được bổ sung bằng cách phủ ngoài trong điều kiện chân không (model PG-10VCLAB, Dinnisen, Netherlands). Trong suốt thời gian thử nghiệm, thức ăn thử nghiệm được bảo quản ở nhiệt độ môi trường, nhưng ở nơi mát mẻ, thoáng gió. Các mẫu đại diện cho mỗi một khẩu phần ăn được lấy ra để phân tích (các bảng 4-5).

Bảng 4: Lượng axit amin trong khẩu phần ăn thử nghiệm.

| Các axit amin | CTRL        | Y5          | Y7,5        | Y15         | Y25         |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Arginin       | 4,62 ± 0,23 | 4,53 ± 0,02 | 4,49 ± 0,23 | 4,27 ± 0,09 | 3,89 ± 0,09 |
| Histidin      | 1,47 ± 0,11 | 1,56 ± 0,02 | 1,54 ± 0,09 | 1,46 ± 0,07 | 1,50 ± 0,08 |
| Isoleuxin     | 2,31 ± 0,01 | 2,52 ± 0,01 | 2,53 ± 0,01 | 2,46 ± 0,02 | 2,49 ± 0,00 |
| Leuxin        | 4,51 ± 0,08 | 4,44 ± 0,01 | 4,68 ± 0,05 | 4,46 ± 0,02 | 4,56 ± 0,01 |
| Lysin         | 3,09 ± 0,19 | 3,09 ± 0,01 | 3,02 ± 0,17 | 2,94 ± 0,01 | 2,97 ± 0,03 |
| Threonin      | 2,32 ± 0,03 | 2,37 ± 0,00 | 2,31 ± 0,03 | 2,14 ± 0,05 | 2,15 ± 0,02 |
| Valin         | 2,75 ± 0,00 | 2,87 ± 0,02 | 3,00 ± 0,03 | 3,08 ± 0,01 | 3,18 ± 0,01 |
| Methionin     | 1,71 ± 0,15 | 1,71 ± 0,01 | 1,75 ± 0,06 | 1,74 ± 0,02 | 1,63 ± 0,02 |
| Xystein       | 0,35 ± 0,02 | 0,34 ± 0,00 | 0,31 ± 0,02 | 0,33 ± 0,00 | 0,34 ± 0,00 |
| Phenylalanin  | 3,30 ± 0,00 | 3,06 ± 0,01 | 2,92 ± 0,15 | 2,85 ± 0,01 | 2,56 ± 0,00 |
| Tyrosin       | 2,44 ± 0,11 | 2,48 ± 0,00 | 2,67 ± 0,14 | 2,92 ± 0,04 | 3,14 ± 0,12 |
| Taurin        | 0,20 ± 0,01 | 0,20 ± 0,00 | 0,21 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 |

Các hàm lượng được chỉ rõ bằng tỷ lệ theo khối lượng so với tổng khối lượng của hạt trước khi sấy khô.

Bảng 5: Tổng hợp lượng axit béo trong khẩu phần ăn thử nghiệm

| Các axit béo | CTRL        | Y5          | Y7,5        | Y15         | Y25         |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| C14:0        | 0,40 ± 0,00 | 0,40 ± 0,00 | 0,38 ± 0,00 | 0,43 ± 0,00 | 0,38 ± 0,00 |
| C16:0        | 1,86 ± 0,01 | 1,89 ± 0,01 | 1,82 ± 0,02 | 2,11 ± 0,01 | 1,94 ± 0,02 |
| C16:1n-7     | 0,48 ± 0,00 | 0,48 ± 0,00 | 0,44 ± 0,00 | 0,50 ± 0,00 | 0,42 ± 0,01 |
| C18:0        | 0,49 ± 0,00 | 0,50 ± 0,01 | 0,47 ± 0,01 | 0,54 ± 0,00 | 0,50 ± 0,01 |
| C18:1n-9     | 1,62 ± 0,01 | 1,74 ± 0,01 | 1,69 ± 0,01 | 2,08 ± 0,01 | 2,06 ± 0,02 |
| C18:1n-7     | 0,26 ± 0,00 | 0,25 ± 0,00 | 0,23 ± 0,00 | 0,25 ± 0,00 | 0,21 ± 0,00 |
| C18:2n-6     | 0,79 ± 0,00 | 0,94 ± 0,01 | 1,05 ± 0,01 | 1,36 ± 0,01 | 1,53 ± 0,02 |
| C18:3n-3     | 0,13 ± 0,00 | 0,13 ± 0,00 | 0,13 ± 0,00 | 0,14 ± 0,00 | 0,12 ± 0,00 |
| C18:4n-3     | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 |
| C20:1n-9     | 0,20 ± 0,00 | 0,19 ± 0,00 | 0,17 ± 0,00 | 0,18 ± 0,00 | 0,14 ± 0,00 |
| C20:4n-6     | 0,14 ± 0,00 | 0,13 ± 0,00 | 0,12 ± 0,00 | 0,14 ± 0,00 | 0,12 ± 0,00 |
| C20:5n-3     | 0,72 ± 0,00 | 0,71 ± 0,01 | 0,65 ± 0,00 | 0,70 ± 0,00 | 0,57 ± 0,01 |
| C22:1n-11    | 0,14 ± 0,00 | 0,13 ± 0,00 | 0,11 ± 0,00 | 0,12 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 |
| C22:5n-3     | 0,14 ± 0,00 | 0,13 ± 0,00 | 0,12 ± 0,00 | 0,13 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 |
| C22:6n-3     | 1,45 ± 0,01 | 1,44 ± 0,01 | 1,33 ± 0,01 | 1,46 ± 0,01 | 1,21 ± 0,02 |

Các hàm lượng được chỉ rõ bằng tỷ lệ theo khối lượng so với tổng khối lượng của hạt trước khi sấy.

### 1.3. Thử nghiệm về khả năng sinh trưởng

Các nhóm bộ ba gồm 35 cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*), với khối lượng cơ thể ban đầu (IBW) là  $5,01 \pm 0,1$ g được nuôi bằng 1 trong 5 khẩu phần ăn thử nghiệm trong thời gian 90 ngày. Cá sinh trưởng trong các bể sợi thủy tinh hình tròn (thể tích: 250L) được cung cấp dòng nước ngọt liên tục ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ  $14,1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  và các mức oxy hòa tan vượt trên 7,4mg/L (xem hình vẽ trên Fig. 1). Cá được đặt trong điều kiện mùa hè với chu kỳ sáng tự nhiên thay đổi (tháng 05 - tháng 07). Cá được chia khẩu phần ăn bằng tay đến khi thỏa mãn hoàn toàn, ba lần một ngày (9 giờ 00, 14

giờ 00 và 18 giờ 00) trong tuần và hai lần một ngày vào những ngày cuối tuần (10 giờ 00 và 16 giờ 00), hết sức cẩn thận để tránh lãng phí thức ăn. Thức ăn phân phối được định lượng trong suốt thời gian nghiên cứu. Cá gây mê được cân riêng khi bắt đầu và khi kết thúc nghiên cứu và nhóm được cân vào ngày 28 và vào ngày 60. Khi bắt đầu, 15 cá cùng giống ban đầu được lấy mẫu và được bảo quản ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  để sau đó, phân tích thành phần toàn bộ cơ thể. Sau thời gian nuôi ăn thử nghiệm 90 ngày, 6 cá từ mỗi bể được lấy mẫu cho cùng mục đích.

#### 1.4. Đánh giá khả năng tiêu hóa biểu kiến

Khi kết thúc thử nghiệm sinh trưởng và sau khi toàn bộ các mẫu được kết hợp, 12 cá (khối lượng cơ thể: 45g) từ mỗi một bể mô hình tương tự được sử dụng để xác định khả năng tiêu hóa biểu kiến chất khô, các protein, các lipid, năng lượng và phospho, bằng phương pháp gián tiếp bằng các khẩu phần ăn giống nhau chứa Ytri oxit ( $200\text{mg/kg}$ ) chất đánh dấu tracer. Cá được bảo quản trong các bể hình nón trụ (thể tích: 60L; tốc độ dòng nước: 3,7L/phút; các mức oxy hòa tan cao hơn  $6,4\text{mg/L}$ ), ở nhiệt độ nước hằng định  $14^{\circ}\text{C}$ . Cá được làm cho thích ứng với các điều kiện nuôi dưỡng và với khẩu phần ăn thử nghiệm trong thời gian 10 ngày. Tiếp theo, cá được chia khẩu phần ăn bằng tay mỗi ngày một lần (10 giờ 00) tới mức dư thừa chút ít. Sau khi làm sạch sâu các bể nuôi để loại bỏ tất cả các thức ăn dư thừa, phân cá được tập hợp hàng ngày trong 8 ngày tiếp theo sử dụng hệ lọc nước xả liên tục (Choubert-INRA system). Sau khi tập hợp hàng ngày, phân được làm đông lạnh ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$ . Phân kết hợp xuất phát từ mỗi một nhóm cá được làm khô lạnh trước khi phân tích. Mỗi một khẩu phần ăn được thử nghiệm phân tích ba lần.

Các hệ số khả năng tiêu hóa biểu kiến (ADC) của các chất dinh dưỡng và của năng lượng thức ăn trong khẩu phần ăn thử nghiệm được tính toán theo công thức:

$$\text{ADC (\%)} = 100 - \left[ \frac{\text{thức ăn } \text{Y}_2\text{O}_3 \text{ nồng độ \%}}{\text{phân } \text{Y}_2\text{O}_3 \text{ nồng độ \%}} \times \frac{\% \text{ năng lượng hoặc chất dinh dưỡng trong phân}}{\% \text{ năng lượng hoặc chất dinh dưỡng trong thức ăn}} \right]$$

#### 1.5. Các phương pháp phân tích

Các thành phần thử nghiệm, các khẩu phần ăn và phân đã làm khô lạnh được nghiền trước khi phân tích. Các mẫu toàn thể được băm nhỏ, trộn lẫn, và mẫu đại diện

được làm khô lạnh và được đồng nhất hóa bằng máy nghiền trong phòng thí nghiệm trước khi phân tích. Phân tích về thành phần hóa học của thành phần, khẩu phần ăn, phân và toàn bộ cá được thực hiện sử dụng các phương thức sau: chất khô sau khi sấy khô ở nhiệt độ 105°C trong thời gian 24 giờ; tro khi đốt ở nhiệt độ 550°C trong thời gian 12 giờ; protein thô (N x 6,25) bằng kỹ thuật đốt nhanh sau khi tách bằng phương pháp sắc ký khí và thiết bị phát hiện độ dẫn nhiệt (LECO FP428); chất béo do chiết bằng diclometan (Soxhlet); tổng lượng phospho theo phương pháp ISO/DIS 6491 sử dụng chất phản ứng vanadomolybdic; năng lượng thô trong nhiệt lượng kế bình đoạn nhiệt. Ytri oxit trong thức ăn và trong phân được xác định bằng phương pháp ICP-AES.

Đối với các phân tích về tổng lượng axit amin, các thành phần thử nghiệm và các khẩu phần ăn thử nghiệm được thủy phân (6M của HCL ở nhiệt độ 116°C trong thời gian 22 giờ trong các bình thốt cổ thủy tinh được rửa sạch bằng nito), sau đó được dẫn xuất hóa bằng chất phản ứng AccQ (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuxinimidyl) flo theo phương pháp AccQ-Tag (Waters, USA). Các phân tích được thực hiện bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trong hệ phân tích axit amin pha đảo, sử dụng norvalin làm chất nội chuẩn. Tryptophan không được xác định vì nó bị phá hủy một phần bởi sự thủy phân axit. Các đỉnh pic tạo ra được phân tích bằng phần mềm EMPOWER (Waters, USA). Đối với việc phân tích về các axit béo, các lipid được chiết theo phương pháp của tác giả Folch et al. (1957) và sau đó, thành phần axit béo của khối cá đông lạnh được xác định bằng cách phân tích các metyl este bằng phương pháp sắc ký khí, theo phương thức của tác giả Lepage và Roy (1986).

#### 1.6. Tiêu chuẩn để đánh giá sự sinh trưởng và việc sử dụng các chất dinh dưỡng

IBW (g): Khối lượng cơ thể ban đầu.

FBW (g): Khối lượng cơ thể khi kết thúc thử nghiệm.

Tốc độ sinh trưởng đặc trưng, SGR (% / ngày):  $(\ln \text{FBW} - \ln \text{IBW}) \times 100 / \text{ngày}$ .

Tỷ lệ chuyển đổi thức ăn, FCR: khẩu phần thức ăn thô / khối lượng tăng.

Thức ăn lấy vào tùy ý, VFI (% BW/ngày):  $(\text{khẩu phần thức ăn thô} / (\text{IBW} + \text{FBW}) / 2 / \text{ngày}) \times 100$ .

Tỷ lệ hiệu quả protein PER: tăng khối lượng ẩm / protein thô đưa vào.



Duy trì (% của lượng đưa vào):  $100 \times (\text{FBW} \times \text{hàm lượng các chất dinh dưỡng sau cùng trong xác động vật} - \text{IBW} \times \text{hàm lượng các chất dinh dưỡng ban đầu trong xác động vật}) / \text{dinh dưỡng tiêu thụ}$ .

### 1.7. Phân tích thống kê

Dữ liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình của ba chu kỳ lặp  $\pm$  độ lệch chuẩn. Dữ liệu được cho tiến hành phân tích phương sai một nhân tố. Trước khi tiến hành ANOVA, các giá trị biểu diễn theo % được cho tiến hành chuyển dạng kiểu căn bậc hai arcsin. Ý nghĩa thống kê được thử nghiệm ở mức xác suất 0,05. Tất cả các thử nghiệm phân tích thống kê được thực hiện sử dụng phần mềm IBM SPSS V21.

## 2. Kết quả

### 2.1. Đặc tính sinh trưởng

Dữ liệu về các đặc tính sinh trưởng, sự chuyển đổi thức ăn và hiệu quả protein của cá hồi vân được nuôi bằng khẩu phần ăn thử nghiệm trong thời gian 28, 60 và 90 ngày được thông báo trong các bảng 6-8 và hình vẽ trên Fig. 2. Không có trường hợp tử vong nào xuất hiện trong thử nghiệm.

Bảng 6: Các đặc tính sinh trưởng vào ngày 28

| Khẩu phần ăn        | CTRL                         | Y5                           | Y7,5                         | Y15                           | Y25                          |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| IBW (g)             | 5,0 $\pm$ 0,1                | 4,9 $\pm$ 0,1                | 5,0 $\pm$ 0,1                | 5,1 $\pm$ 0,1                 | 5,1 $\pm$ 0,1                |
| FBW (g)             | 16,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>  | 16,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>  | 16,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>  | 17,9 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>   | 17,6 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>  |
| SGR, %/ngày         | 4,19 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup> | 4,26 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup> | 4,20 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup> | 4,50 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>  | 4,45 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup> |
| FCR                 | 0,87 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> | 0,87 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> | 0,87 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup> | 0,81 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>  | 0,81 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup> |
| Thức ăn tiêu thụ, % |                              |                              |                              |                               |                              |
| BWM/ngày            | 3,27 $\pm$ 0,07              | 3,31 $\pm$ 0,09              | 3,28 $\pm$ 0,09              | 3,25 $\pm$ 0,03               | 3,22 $\pm$ 0,07              |
| PER                 | 2,55 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> | 2,56 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup> | 2,55 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> | 2,66 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup> | 2,72 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup> |

Các giá trị là giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (n=3).

Các giá trị nằm ở dòng với số mũ khác nhau thì khác nhau đáng kể (P < 0,05).

Bảng 6: Các đặc tính sinh trưởng vào ngày 28,

Sau 28 ngày nuôi thực nghiệm (bảng 5), cá đã tăng hơn ba lần khối lượng cơ thể ban đầu của chúng. Thức ăn lấy vào ở mức cao (3,22 – 3,31% BW/ ngày) và không bị ảnh hưởng ( $P > 0,05$ ) bởi các liều lượng gia tăng của chế phẩm theo sáng chế kết hợp. Quan sát này cho thấy rằng, chế phẩm theo sáng chế không có tác động âm lên khả năng dễ chấp nhận, và thậm chí nó còn bù cho việc loại bỏ toàn bộ bột thức ăn cho cá không làm tổn hại đến thức ăn lấy vào. Tốc độ sinh trưởng thay đổi từ 4,19 đến 4,50% / ngày. So sánh với chế độ ăn CTRL, trong khi trong khi các khẩu phần ăn Y5 và Y7,5 không ảnh hưởng đến FBW và SGR, các khẩu phần ăn Y15 và Y25 dẫn đến gia tăng đáng kể ( $P < 0,05$ ) về FBW và SGR. các giá trị về tỷ lệ chuyển đổi thức ăn thay đổi nằm trong khoảng từ 0,81 đến 0,87. So sánh với CTRL, việc bao gồm chế phẩm theo sáng chế ở mức 5 và 7,5% (các khẩu phần ăn Y5 và Y7,5%) không ảnh hưởng đến FCR. Tuy nhiên, các mức bao gồm cao của chế phẩm theo sáng chế (các khẩu phần ăn Y15 và Y25) dẫn đến sự giảm đáng kể về FCR ( $P < 0,05$ ). Tỷ lệ hiệu quả protein (PER) thay đổi nằm trong khoảng từ 2,55 đến 2,72. Cá được nuôi bằng khẩu phần ăn Y25 thể hiện gia tăng đáng kể về PER, so với cá được nuôi bằng các chế độ ăn CTRL, Y5 và Y7,5.

Bảng 7: Các đặc tính sinh trưởng vào ngày 60

| Khẩu phần ăn | CTRL                     | Y5                       | Y7,5                     | Y15                       | Y25                      |
|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| IBW (g)      | 5,0 ± 0,1                | 4,9 ± 0,1                | 5,0 ± 0,1                | 5,1 ± 0,1                 | 5,1 ± 0,1                |
| FBW (g)      | 30,3 ± 0,1 <sup>a</sup>  | 31,6 ± 0,5 <sup>a</sup>  | 34,9 ± 1,5 <sup>b</sup>  | 37,2 ± 0,9 <sup>c</sup>   | 42,9 ± 0,4 <sup>d</sup>  |
| SGR, %/ngày  | 3,00 ± 0,04 <sup>a</sup> | 3,10 ± 0,04 <sup>b</sup> | 3,24 ± 0,04 <sup>c</sup> | 3,31 ± 0,05 <sup>c</sup>  | 3,57 ± 0,04 <sup>d</sup> |
| FCR          | 1,10 ± 0,03 <sup>d</sup> | 1,02 ± 0,03 <sup>c</sup> | 0,92 ± 0,01 <sup>b</sup> | 0,90 ± 0,02 <sup>b</sup>  | 0,85 ± 0,02 <sup>a</sup> |
| PER          | 2,01 ± 0,06 <sup>a</sup> | 2,17 ± 0,06 <sup>b</sup> | 2,40 ± 0,02 <sup>c</sup> | 2,46 ± 0,06 <sup>cd</sup> | 2,56 ± 0,07 <sup>d</sup> |

Các giá trị là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n=3).

Các giá trị nằm ở dòng với số mũ khác nhau thì khác nhau đáng kể ( $P < 0,05$ ).

Sau thời gian 60 ngày nuôi thực nghiệm (bảng 6), cá trải qua chế độ ăn hiệu quả nhất thể hiện tăng 8 lần khối lượng cơ thể ban đầu. Tốc độ sinh trưởng thay đổi từ 3,00 đến 3,57%/ngày. So sánh với chế độ ăn CTRL, tất cả các khẩu phần ăn có chế phẩm

theo sáng chế thể hiện sự gia tăng đáng kể ( $P < 0,05$ ) về SGR. Các giá trị FCR thay đổi nằm trong khoảng từ 0,85 đến 1,10 và so sánh với CTRL, việc bao gồm chế phẩm theo sáng chế ở tất cả các liều lượng thử nghiệm đều dẫn đến sự giảm đáng kể về FCR ( $P < 0,05$ ). Tỷ lệ hiệu quả protein (PER) thay đổi nằm trong khoảng từ 2,01 đến 2,56. Giá trị PER thấp nhất được phát hiện ở cá được nuôi bằng chế độ ăn CTRL, trong khi sự cải thiện về PER có quan hệ chặt chẽ với liều lượng gia tăng của chế phẩm theo sáng chế.

Bảng 8: Các đặc tính sinh trưởng vào ngày 90

| Khẩu phần ăn | CTRL              | Y5                | Y7,5              | Y15               | Y25               |
|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| IBW (g)      | $5,0 \pm 0,1$     | $4,9 \pm 0,1$     | $5,0 \pm 0,1$     | $5,1 \pm 0,1$     | $5,1 \pm 0,1$     |
| FBW (g)      | $42,9 \pm 1,3^a$  | $45,2 \pm 1,0^b$  | $49,0 \pm 0,6^c$  | $51,0 \pm 1,4^c$  | $55,9 \pm 1,0^d$  |
| SGR, %/ngày  | $2,39 \pm 0,06^a$ | $2,47 \pm 0,02^b$ | $2,54 \pm 0,03^b$ | $2,56 \pm 0,05^b$ | $2,67 \pm 0,04^c$ |
| FCR          | $0,93 \pm 0,02^b$ | $0,83 \pm 0,03^a$ | $0,80 \pm 0,02^a$ | $0,79 \pm 0,04^a$ | $0,79 \pm 0,02^a$ |
| PER          | $2,38 \pm 0,06^a$ | $2,68 \pm 0,10^b$ | $2,76 \pm 0,06^b$ | $2,80 \pm 0,15^b$ | $2,74 \pm 0,08^b$ |

Các giá trị là giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn ( $n=3$ ).

Các giá trị nằm ở dòng với số mũ khác nhau thì khác nhau đáng kể ( $P < 0,05$ ).

Khi kết thúc thử nghiệm, 90 ngày nuôi thực nghiệm (bảng 8), cá trải qua chế độ ăn hiệu quả nhất thể hiện tăng 11 lần khối lượng cơ thể ban đầu. So sánh với cá CTRL, cá được nuôi bằng các khẩu phần ăn giàu côn trùng thể hiện gia tăng đáng kể về khối lượng cơ thể khi kết thúc thử nghiệm ( $P < 0,05$ ). Sự gia tăng này có liên quan với liều lượng, với sự gia tăng vừa phải đối với khẩu phần ăn Y5, trung bình đối với khẩu phần ăn Y7,5 và Y15, và cao nhất đối với khẩu phần ăn Y25. Tốc độ sinh trưởng đặc trưng (SGR) thay đổi nằm trong khoảng từ 2,39 đến 2,67%/ngày, với giá trị tối thiểu được phát hiện ở cá được nuôi bằng chế độ ăn CTRL, trong khi cá được nuôi bằng thức ăn chứa chế phẩm theo sáng chế thể hiện các giá trị SGR cao hơn đáng kể ( $p < 0,05$ ). Độc lập với mức độ kết hợp, chế phẩm theo sáng chế dẫn đến sự giảm đáng kể về FCR ( $P < 0,05$ ). So sánh với chế độ ăn CTRL, tất cả các khẩu phần ăn bao gồm bột côn trùng dẫn đến sự gia tăng đáng kể về các giá trị PER ( $P < 0,05$ ).

## 2.2. Thành phần của toàn bộ cơ thể

Dữ liệu về thành phần toàn thể của cá hồi khi kết thúc thử nghiệm được trình bày trong bảng 9. Các chế độ nuôi dưỡng không có ảnh hưởng gì ( $P > 0,05$ ) lên các mức độ ẩm, protein, lipid, tro, phospho và mức năng lượng của toàn bộ cá.

Bảng 9: Thành phần của toàn thân cá hồi được nuôi theo các chế độ thức ăn khác nhau

| Thành phần cơ thể | CTRL       | Y5         | Y7,5       | Y15        | Y25        |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Độ ẩm, %          | 70,1 ± 0,6 | 70,7 ± 0,4 | 71,1 ± 0,4 | 70,5 ± 0,5 | 70,7 ± 1,2 |
| Protein, %        | 14,8 ± 0,6 | 14,8 ± 0,3 | 15,0 ± 0,5 | 15,2 ± 0,3 | 15,2 ± 0,7 |
| Chất béo, %       | 12,2 ± 0,2 | 11,5 ± 0,4 | 11,0 ± 0,3 | 11,6 ± 0,1 | 11,8 ± 0,9 |
| Tro, %            | 1,9 ± 0,0  | 2,2 ± 0,2  | 2,1 ± 0,3  | 2,1 ± 0,0  | 2,2 ± 0,1  |
| phospho, %        | 0,4 ± 0,0  | 0,4 ± 0,0  | 0,4 ± 0,0  | 0,4 ± 0,0  | 0,4 ± 0,0  |
| Năng lượng, kJ/g  | 8,2 ± 0,1  | 8,0 ± 0,0  | 8,0 ± 0,0  | 8,0 ± 0,2  | 8,2 ± 0,4  |

Tỷ lệ % là tỷ lệ % khối lượng so với tổng khối lượng của cá.

Các giá trị là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n=3).

Cá ban đầu: độ ẩm 75,0%; protein 14,1%; chất béo 8,7%; tro 2,2%; phospho 0,4%, năng lượng 6,7kJ/g.

### 2.3. Duy trì dinh dưỡng

Các giá trị duy trì dinh dưỡng và năng lượng (được biểu diễn bằng tỷ lệ % của lượng đưa vào) được trình bày trong bảng 10. So sánh với chế độ ăn CTRL, cá nuôi bằng các khẩu phần ăn giàu chế phẩm theo sáng chế thể hiện gia tăng đáng kể về protein và sự duy trì năng lượng ( $P < 0,05$ ). Tương tự, các khẩu phần ăn Y7,5, Y15 và Y25 thể hiện sự duy trì P cao hơn đáng kể so với CTRL ( $P < 0,05$ ). Sự duy trì chất béo không bị ảnh hưởng bởi các khẩu phần ăn ( $P > 0,05$ ).

Bảng 10: Sự duy trì dinh dưỡng và năng lượng ở cá hồi được nuôi bằng các khẩu phần ăn khác nhau

| Sự duy trì,<br>% đưa vào | CTRL                    | Y5                       | Y7,5                    | Y15                     | Y25                     |
|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Protein                  | 35,5 ± 2,5 <sup>a</sup> | 39,8 ± 0,7 <sup>b</sup>  | 41,6 ± 0,4 <sup>b</sup> | 42,8 ± 2,2 <sup>b</sup> | 41,9 ± 2,2 <sup>b</sup> |
| Chất béo                 | 64,4 ± 2,1              | 68,0 ± 4,9               | 66,8 ± 3,3              | 71,5 ± 3,4              | 70,9 ± 6,7              |
| phospho                  | 30,5 ± 0,7 <sup>a</sup> | 32,7 ± 1,8 <sup>ab</sup> | 34,0 ± 0,7 <sup>b</sup> | 33,9 ± 1,7 <sup>b</sup> | 33,8 ± 1,1 <sup>b</sup> |
| Năng lượng               | 42,0 ± 0,8 <sup>a</sup> | 45,4 ± 1,6 <sup>b</sup>  | 47,1 ± 1,4 <sup>b</sup> | 47,8 ± 1,8 <sup>b</sup> | 48,0 ± 2,9 <sup>b</sup> |

Các giá trị là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n=3).

Các giá trị nằm ở dòng với số mũ khác nhau thì khác nhau đáng kể (P < 0,05).

#### 2.4. Khả năng tiêu hóa biểu kiến

Thành phần của phân tập hợp từ cá hồi được nuôi theo các chế độ thức ăn khác nhau được trình bày trong bảng 11.

Bảng 11: Thành phần của phân cá hồi được nuôi bằng các khẩu phần ăn khác nhau

| Thành phần<br>của phân | CTRL         | Y5           | Y7,5         | Y15          | Y25          |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ytri oxit,<br>(mg/kg)  | 1384 ± 39    | 1395 ± 94    | 1415 ± 61    | 1369 ± 62    | 1411 ± 43    |
| Protein, % DM*         | 19,63 ± 0,06 | 19,67 ± 0,24 | 19,76 ± 0,34 | 19,70 ± 0,38 | 19,20 ± 0,41 |
| Chất béo, %<br>DM*     | 4,37 ± 0,06  | 4,33 ± 0,19  | 4,28 ± 0,24  | 4,30 ± 0,06  | 4,20 ± 0,33  |
| Phospho, %<br>DM*      | 2,64 ± 0,06  | 2,77 ± 0,08  | 2,65 ± 0,10  | 2,54 ± 0,15  | 2,62 ± 0,09  |
| Năng lượng,<br>kJ/g DM | 23,24 ± 0,16 | 23,14 ± 0,40 | 23,47 ± 0,47 | 22,88 ± 0,16 | 23,09 ± 0,16 |

\* Tỷ lệ theo khối lượng so với tổng khối lượng của phân khô.

Các giá trị là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n=3).

Các hệ số khả năng tiêu hóa biểu kiến (% ADC) của các chất dinh dưỡng khác nhau và năng lượng được trình bày trong bảng 12. Sự gia tăng về các liều lượng của chế

phẩm theo sáng chế kết hợp không ảnh hưởng đáng kể ( $P > 0,05$ ) lên khả năng tiêu hóa biểu kiến chất khô, các protein, chất béo, phospho và năng lượng.

Bảng 12: Khả năng tiêu hóa biểu kiến của các chất dinh dưỡng và năng lượng ở cá hồi

| ADC %                           | CTRL           | Y5             | Y7,5           | Y15            | Y25            |
|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Chất khô                        | $84,2 \pm 0,4$ | $84,2 \pm 1,0$ | $84,3 \pm 0,7$ | $84,0 \pm 0,7$ | $84,3 \pm 0,5$ |
| Protein                         | $93,6 \pm 0,2$ | $93,6 \pm 0,4$ | $93,6 \pm 0,2$ | $93,5 \pm 0,4$ | $93,8 \pm 0,1$ |
| Chất béo                        | $97,0 \pm 0,1$ | $97,0 \pm 0,1$ | $97,0 \pm 0,2$ | $97,0 \pm 0,2$ | $97,1 \pm 0,3$ |
| phospho, % của lượng đưa vào    | $69,9 \pm 1,4$ | $68,3 \pm 1,5$ | $70,5 \pm 2,4$ | $71,4 \pm 2,9$ | $70,3 \pm 1,8$ |
| Năng lượng, % của lượng đưa vào | $84,1 \pm 0,4$ | $84,3 \pm 0,8$ | $84,1 \pm 1,0$ | $84,2 \pm 0,6$ | $84,4 \pm 0,6$ |

Các giá trị là giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn ( $n=3$ ).

### 3. Kết luận

Tại thời điểm kết thúc 90 ngày nuôi thực nghiệm, đặc tính sinh trưởng toàn thể có thể được xem là rất thỏa mãn và trong phạm vi cao hơn đối với cá hồi vân còn non, với các giá trị SGR trong toàn bộ thời gian thử nghiệm thay đổi nằm trong khoảng từ 2,4 đến 2,7%/ngày. Trong các chế độ ăn hiệu quả nhất, cá thể hiện gia tăng 11 lần khối lượng cơ thể ban đầu của chúng. Tỷ lệ chuyển đổi thức ăn trong các chế độ ăn thay đổi nằm trong khoảng từ 0,79 đến 0,93, điều này cho thấy khả năng dinh dưỡng đầy đủ thích hợp của thức ăn và thực hành nuôi dưỡng tốt.

Dữ liệu thực nghiệm thu được trong ví dụ này giúp cho có thể khẳng định rằng:

- Sự kết hợp các liều lượng gia tăng của chế phẩm theo sáng chế (5, 7,5, 15 và 25%) với sự giảm đồng thời về bột thức ăn cho cá có liên quan theo kiểu lũy tiến với sự gia tăng đáng kể về khối lượng cơ thể của cá.
- Tất cả các khẩu phần ăn chứa chế phẩm theo sáng chế đều thể hiện sự cải thiện đáng kể về SGR, FCR và PER.
- Liều lượng gia tăng của chế phẩm theo sáng chế kết hợp không có ảnh hưởng gì tới thành phần toàn thể của cá hồi.

- Liều lượng gia tăng của chế phẩm theo sáng chế kết hợp không có ảnh hưởng gì tới khả năng tiêu hóa biểu kiến chất khô, protein, lipit, phospho và năng lượng trong các khẩu phần ăn thử nghiệm khác nhau.
- Các protein, phospho và sự duy trì năng lượng tăng lên ở cá hồi được nuôi bằng thức ăn chứa chế phẩm theo sáng chế.

Nói chung, chế phẩm theo sáng chế sử dụng trong ví dụ này có thể thay thế một cách hiệu quả 100% bột thức ăn cho cá trong khẩu phần ăn của cá hồi vẫn chưa trưởng thành với các tác động tích cực lên FCR và đặc tính sinh trưởng toàn thể.

Ví dụ 5: Các phương pháp có hoặc không có bước nghiền trước khi ép

Phương pháp chỉ có ép

200g ấu trùng *T. molitor* được đưa vào một cốc nhỏ, đặt vào trong một chậu nước ở nhiệt độ 100°C và chứa 200mL nước được đun sôi trước. Sau thời gian 5 phút, cốc nhỏ được lấy ra khỏi bình nước, ấu trùng được xả ra, sau đó được chuyển vào trong hệ ép kiểu trục vít đôi. Thu được bánh ép theo cách như vậy.

Phương pháp có nghiền sau đó ép

200g ấu trùng *T. molitor* được đưa vào một cốc nhỏ, đặt vào trong một chậu nước ở nhiệt độ 100°C và chứa 200mL nước được đun sôi trước. Sau thời gian 5 phút, cốc nhỏ được lấy ra khỏi bình nước, ấu trùng được xả ra, sau đó được kết hợp với một thể tích nước 200mL. Dịch thu được theo cách như vậy được chuyển vào trong hệ ép kiểu trục vít đôi. Thu được bánh ép theo cách như vậy.

Đo hàm lượng lipit

2g mẫu được đặt vào trong một cốc nhỏ mà trong đó, 0,2g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  và 15mL  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (tỷ lệ 2/1 thể tích/thể tích) được bổ sung vào đó. Hỗn hợp được đặt trong điều kiện khuấy từ trong thời gian 20 phút, sau đó dung dịch được lọc, phần cặn lại được đặt vào trong cốc nhỏ chứa 10mL  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (tỷ lệ 2/1 thể tích/thể tích). Hỗn hợp được đặt trong điều kiện khuấy từ trong thời gian 15 phút, sau đó dung dịch được lọc, các pha dung môi được kết hợp và làm bay hơi tới khối lượng ổn định. Hàm lượng lipit được xác định là tỷ lệ % khối lượng sau khi chiết - làm bay hơi so với khối lượng ban đầu của mẫu (2 g).

## Kết luận

Ý nghĩa của việc nghiền ngược dòng với ép được nghiên cứu (hình vẽ trên Fig. 3). Như vậy, rõ ràng là, sự phân bố các lipid giữa bánh ép và dịch ép hiệu quả hơn nhiều, 12,9 so với 87,1 trái ngược với 42,7 so với 57,3, khi bước nghiền được thực hiện trước.

Ví dụ 6: Phân tích về kích thước của các protein hòa tan của chế phẩm theo sáng chế.

Mẫu gồm 100mg của chế phẩm điều chế trong ví dụ 1 được đặt trong 10mL dung dịch đệm phosphat NaCl (pH 7,4, 0,137mM). Mẫu được khuấy trong thời gian 1 phút (xoáy), sau đó, ly tâm ở tốc độ 900 g trong thời gian 1 phút. Sau khi ly tâm, mẫu được lọc qua màng lọc cỡ 0,45µm. Phân tích về kích thước của các protein hòa tan được thực hiện sử dụng hệ thống sắc ký loại trừ không gian bằng cột Nucleogel GFC-300. Dung dịch đệm phosphat NaCl (pH 7,4, 0,137mM) được sử dụng làm dung môi rửa giải. Tốc độ dòng là 1,0mL/phút. Việc phát hiện được thực hiện bằng bộ dò UV tại 280nm.

Kết quả phân tích được trình bày ở hình vẽ trên Fig. 4 và được tóm tắt trong bảng 13 dưới đây.

Bảng 13: Sự phân bố kích thước của các protein hòa tan chứa trong chế phẩm được điều chế trong ví dụ 1

| Kích thước của các protein (kg/mol) | độ phong phú tương đối (%) |
|-------------------------------------|----------------------------|
| từ 6,5 đến 12,4                     | 74,4                       |
| từ 12,4 đến 29                      | 20,5                       |
| từ 29 đến 66                        | 5,1                        |

Kết quả chứng minh rằng, xấp xỉ 74,4% các protein hòa tan có mặt trong chế phẩm theo sáng chế có khối lượng mol thấp hơn 12400g/mol (hoặc Da, Daltons).



**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Chế phẩm dinh dưỡng chứa các protein thô với lượng ít nhất 67% khối lượng, chitin với lượng ít nhất 5% khối lượng, các tỷ lệ % khối lượng được xác định so với tổng khối lượng của chế phẩm, và 85% khối lượng các protein có thể tiêu hóa được so với tổng khối lượng của các protein thô.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa tro với hàm lượng thấp hơn hoặc bằng 4% khối lượng so với tổng khối lượng của chế phẩm.
3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm này chứa chất béo với hàm lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 20% khối lượng so với tổng khối lượng của chế phẩm.
4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm này thu được từ côn trùng.
5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó hàm lượng độ ẩm còn lại của nó nằm trong khoảng từ 2 đến 15%.
6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó chế phẩm này chứa các protein hòa tan với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 60% khối lượng so với tổng khối lượng của các protein thô, trong đó ít nhất 50% các protein hòa tan có kích thước nhỏ hơn hoặc bằng 12400g/mol.
7. Phương pháp điều chế chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:
  - i) giết côn trùng,
  - ii) ép các côn trùng để thu được bánh ép,
  - iii) sấy khô bánh ép, và
  - iv) nghiền bánh ép.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:
  - i) giết côn trùng,
  - ii) ép các côn trùng để thu được bánh ép,

iii) sấy khô bánh ép, và

iv) nghiền bánh ép,

trong đó, bước ép được tiến hành trước bởi bước nghiền các côn trùng.

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

i) giết côn trùng,

ii) ép các côn trùng để thu được bánh ép,

iii) sấy khô bánh ép, và

iv) nghiền bánh ép,

trong đó, bước ép được thực hiện dưới tác dụng của nhiệt.

10. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

i) giết côn trùng,

ii) ép các côn trùng để thu được bánh ép,

iii) sấy khô bánh ép, và

iv) nghiền bánh ép,

trong đó, bước nghiền bánh ép được thực hiện tới kích thước hạt nằm trong khoảng từ 300µm đến 1mm.

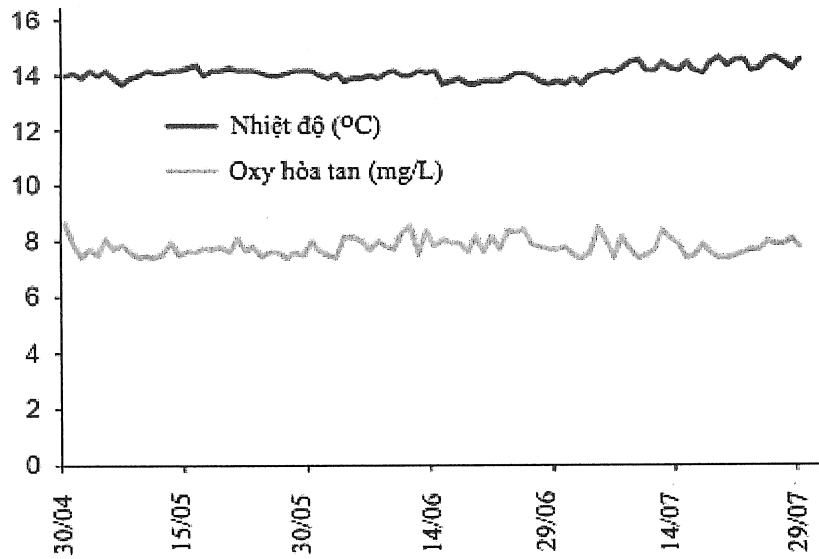


Fig. 1

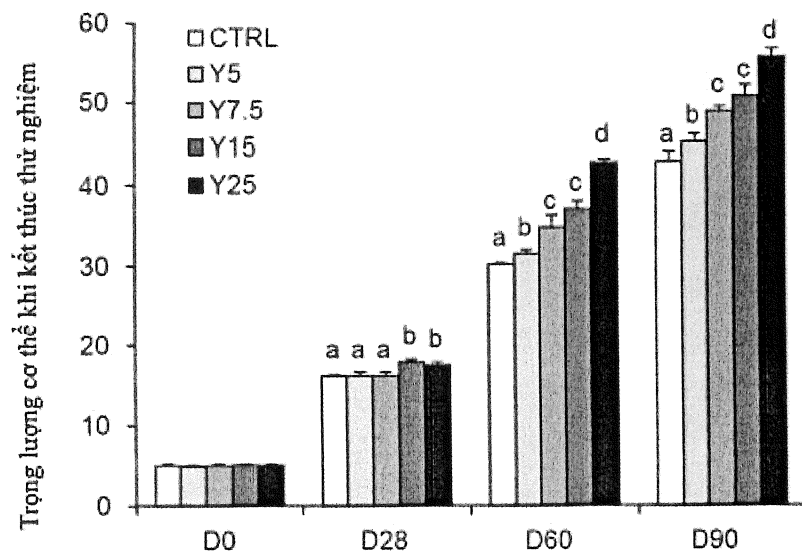


Fig. 2A

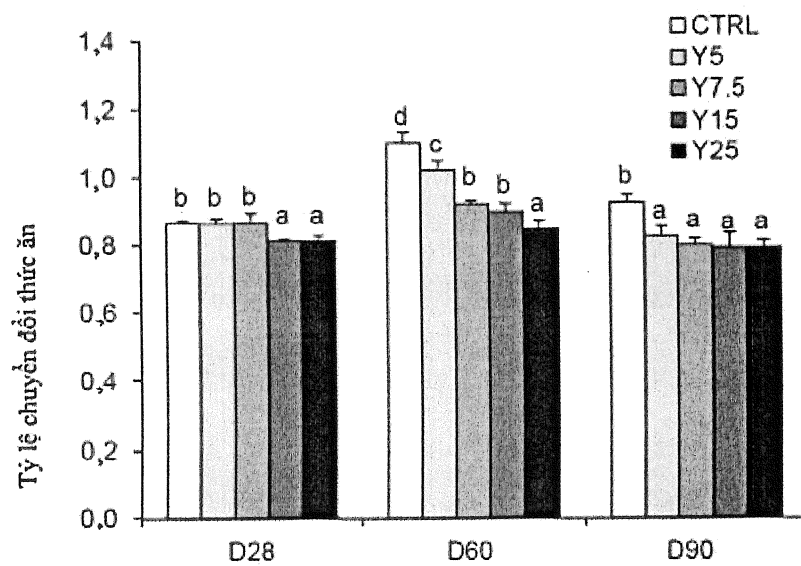


Fig. 2B

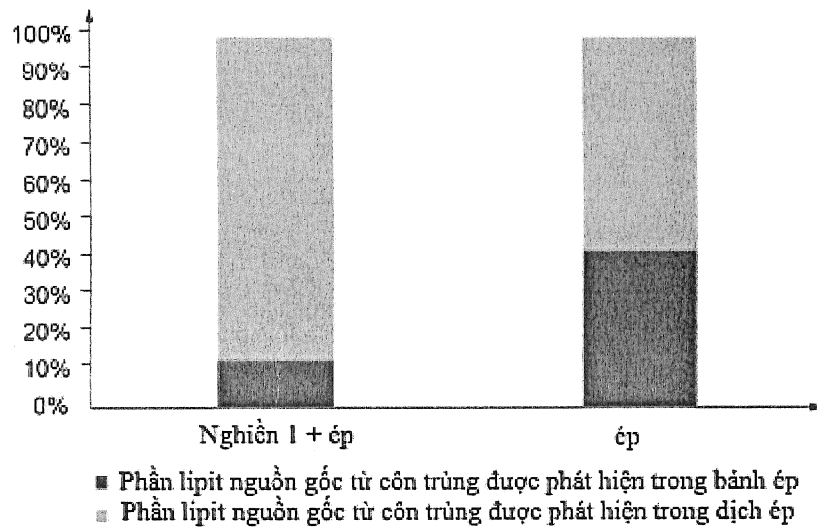


Fig. 3

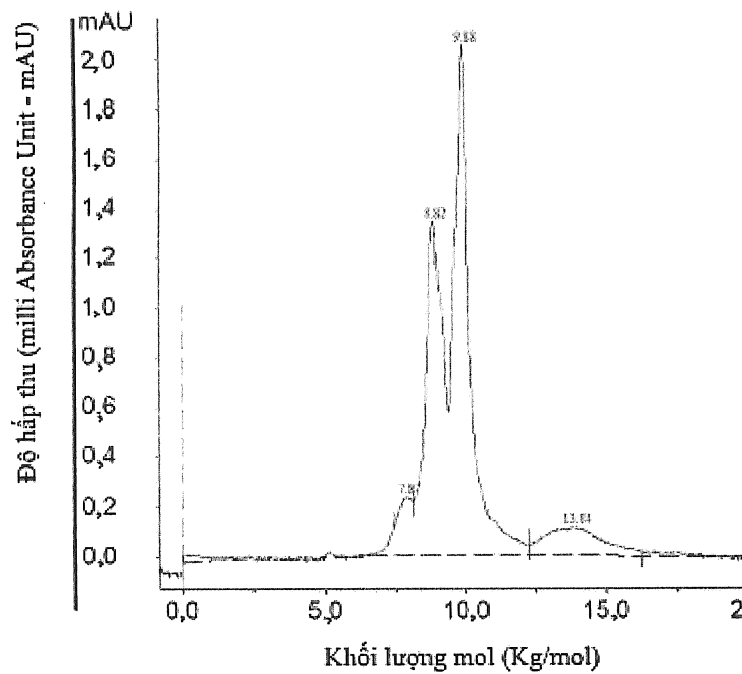


Fig. 4