



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

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

(11)



1-0031185

(51)⁷ A23J 1/14; A23L 1/305; A23J 3/14

(13) B

(21) 1-2013-02961

(22) 21/02/2012

(86) PCT/US2012/025975 21/02/2012

(87) WO2012/145064 26/10/2012

(30) 61/445,426 22/02/2011 US

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/02/2014 311A

(73) AGRIGENETICS, INC. (US)

9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, United States of America

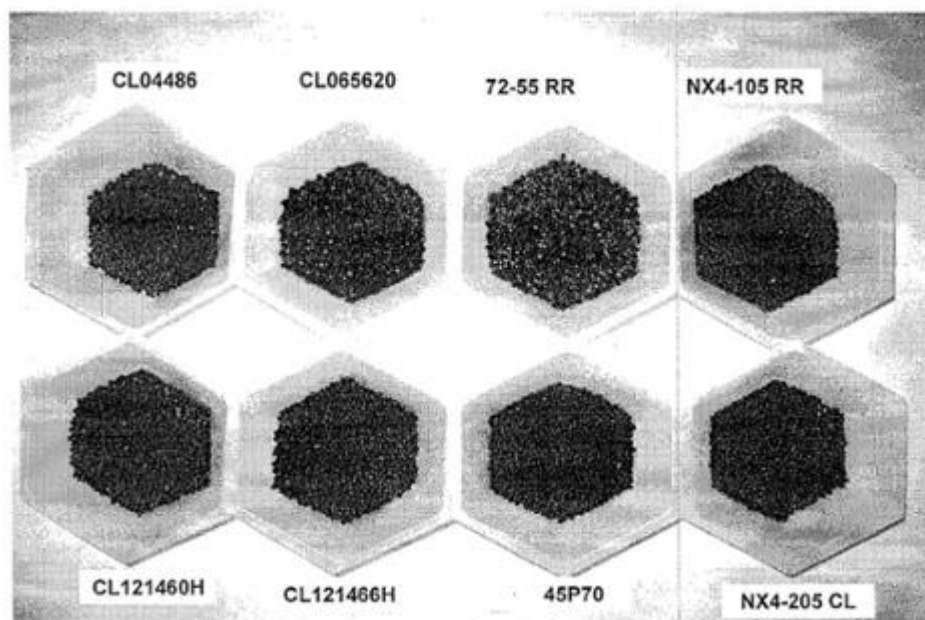
(72) KUBIK, Thomas, James (CA); GINGERA, Gregory R. (CA); RIPLEY, Van Leonard (CA); BEAITH, Michelle E. (CA); PATTERSON, Thomas G. (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) HẠT CẢI DẦU, CÂY CẢI DẦU VÀ BỘT CẢI DẦU CÓ GIÁ TRỊ DINH DƯỠNG NÂNG CAO

(57) Sáng chế đề cập đến chất mầm nguyên sinh cây cải dầu chứa hàm lượng protein thô ít nhất 45% và xơ không hoà tan trong axit không cao hơn 18% trên lượng chất khô không dầu. Một số phương án còn bao hàm một hoặc nhiều tính trạng được chọn từ nhóm bao gồm hàm lượng polyphenolic giảm và hàm lượng phospho tăng lên. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh như vậy và các sản phẩm hàng hoá từ thực vật (ví dụ, hạt) tạo ra từ đó. Cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể thể hiện các đặc tính thành phần hạt thuận lợi làm cho chúng trở nên đặc biệt giá trị làm nguồn tạo ra bột cải dầu. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp đưa ít nhất một tính trạng được chọn từ nhóm bao gồm hàm lượng protein cao, hàm lượng xơ thấp, hàm lượng polyphenolic giảm và hàm lượng phospho tăng lên vào giống cây cải dầu theo cách độc lập với màu vỏ hạt.

Mẫu hạt của các giống cải dầu ví dụ



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất mầm nguyên sinh cây cải dầu và cây cải dầu. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chất mầm nguyên sinh cây cải dầu có đặc điểm tính trạng thành phần bột (ví dụ, lượng các yếu tố kháng dinh dưỡng giảm và lượng protein tăng) được cải biến độc lập với màu vỏ hạt. Các phương án cụ thể đề cập đến chất mầm nguyên sinh cây cải dầu cho hàm lượng các yếu tố kháng dinh dưỡng (ví dụ như xơ không hoà tan trong axit (ADF: acid detergent fiber) giảm và các hợp chất polyphenolic) và hàm lượng protein và phospho tăng lên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

“Cây cải dầu” (canola) là cây cho hạt cải dầu (*Brassica* spp.), hạt này có hàm lượng axit eruxic (C22:1) chiếm tới 2 phần trăm khối lượng (so với tổng hàm lượng axit béo của hạt), và tạo ra (sau khi nghiền) bột được làm khô trong không khí chứa ít hơn 30 micromol (μmol) glucosinolat trong một gam bột đã được khử chất béo (không dầu). Các loại cây cải này có đặc điểm dinh dưỡng khác biệt so với các giống trồng truyền thống hơn thuộc cùng loài. Dầu cây cải dầu được coi là loại dầu ăn tốt do nó có lượng axit béo bão hoà thấp.

Mặc dù bột cây cải có hàm lượng protein tương đối cao, nhưng nó lại có hàm lượng xơ cao nên giảm khả năng tiêu hoá và giá trị dùng làm thức ăn cho động vật. So với bột đậu nành, cây cải dầu và bột từ hạt cải dầu chứa nhiều chất xơ thực phẩm có giá trị và có hàm lượng protein thấp hơn. Vì có hàm lượng chất xơ thực phẩm cao, bột cải dầu có năng lượng chuyển hoá được (ME: metabolizable năng lượng) thấp hơn khoảng 20% so với bột đậu nành. Do đó, giá trị sử dụng bột này vẫn là tương đối thấp so với các bột từ hạt có dầu khác như bột đậu nành, đặc biệt trong khẩu phần thức ăn cố định cho lợn và gia cầm. Rakow (2004a) *Canola meal quality improvement through the breeding of yellow-seeded varieties—an historical perspective*, trong AAFC Sustainable

Production Systems Bulletin. Ngoài ra, sự có mặt của các glucosinolat ở một số bột cải dầu cũng làm giảm giá trị có lợi của nó, do các hợp chất này có tác động có hại đến sự phát triển và sinh sản đàn gia súc.

Các giống cây cải dầu được phân biệt với nhau phần nào ở màu vỏ hạt. Màu vỏ hạt cải dầu thường được chia thành hai nhóm chính: nhóm màu vàng và màu đen (hoặc màu nâu sẫm). Ngoài ra, cũng nhận thấy có sự chuyển màu của các màu này, như chuyển thành màu nâu đỏ và màu nâu vàng. Nhận thấy rằng các giống cây cải dầu có màu vỏ hạt sáng hơn thường có vỏ ngoài mỏng hơn, và do đó có ít chất xơ và nhiều dầu và protein hơn các giống cây trồng có vỏ hạt sẫm màu. Stringam *et al.* (1974) Chemical and morphological đặc tính associated with seed coat color in rapeseed, trong Proceedings of the 4th International Rapeseed Congress, Giessen, Germany, pp. 99-108; Bell and Shires (1982) Can. J. Animal Science 62:557-65; Shirzadegan and Röbbelen (1985) Güttingen Fette Seifen Anstrichmittel 87:235-7; Simbaya *et al.* (1995) J. Agr. Food Chem. 43:2062-6; Rakow (2004b) *Yellow-seeded Brassica napus canola for the Canadian canola Industry*, trong AAFC Sustainable Production Systems Bulletin. Một giải thích có thể có cho hiện tượng này đó là cây cải dầu này có thể dành nhiều năng lượng hơn cho việc sản xuất protein và dầu nếu như nó không cần tiêu tốn năng lượng cho việc sản xuất thành phần xơ của vỏ hạt. Đã có báo cáo cho thấy rằng các dòng cây cải dầu có hạt màu vàng có hàm lượng glucosinolat thấp hơn các dòng cây cải dầu có hạt màu đen. Rakow *et al.* (1999b) Proc. 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra, Australia, Sep. 26-29, 1999, Poster #9. Do đó, trước đây người ta thường tìm cách phát triển các giống cây cải dầu có hạt màu vàng như là cách tiềm năng làm tăng giá trị thức ăn của bột cải dầu. Bell (1995) *Meal and by-product utilization in animal nutrition*, trong Brassica oilseeds, production and utilization. Eds. Kimber and McGregor, Cab International, Wallingford, Oxon, OX108DE, UK, pp. 301-37; Rakow (2004b), *supra*; Rakow & Raney (2003).

Một số dạng loài *Brassica* có hạt màu vàng rất giống *B. napus* (ví dụ, *B. rapa* và *B. juncea*) tỏ ra có lượng xơ ở trong hạt thấp hơn và do đó lượng xơ trong bột cũng thấp. Sự phát triển của chất mầm nguyên sinh của *B. napus* có hạt màu vàng đã cho thấy rằng lượng xơ có thể được giảm đi ở *B. napus* nhờ quá trình hoà nhập gen kiểm soát màu của hạt từ loài tương tự *Brassica*. Tuy nhiên, quá trình hoà nhập gen kiểm soát màu hạt từ loài tương tự *Brassica* vào các giống cây *Brassica* cho hạt có dầu có giá trị, như các

giống cây cải dầu, là phức tạp do có nhiều alen lặn tham gia vào quá trình di truyền vỏ hạt màu vàng ở các dòng có hạt màu vàng hiện có. Hơn nữa, “sự quăn của vỏ quả” cũng là một vấn đề thường gặp phải trong quá trình hoà nhập gen quy định màu vàng vỏ hạt từ các loài *Brassica* khác, như *juncea* và *carinata*.

Hiện có rất ít thông tin về mức độ biến thiên của xơ với trong chất mầm nguyên sinh *B. napus* có hạt màu đen, và chưa có báo cáo nào về các dòng cây cải dầu có hạt màu đen đã được phát triển có lượng các yếu tố kháng dinh dưỡng giảm (ví dụ, xơ và các hợp chất polyphenolic), và lượng protein tăng lên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập tới cây cải dầu (*Brassica napus*) được thụ phấn tự nhiên (CL044864, CL065620) và cây lai (CL166102H, CL121460H và CL121466H) chứa chất mầm nguyên sinh tạo ra tổ hợp mới các thay đổi thành phần bột cải dầu mà đã được chứng tỏ là có ảnh hưởng đến giá trị dinh dưỡng. Theo một số phương án, cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể tạo ra hạt, ví dụ, tổ hợp mới của lượng protein, xơ, và phospho, các hợp phần hạt như vậy không phụ thuộc vào màu vỏ hạt. Theo các phương án cụ thể, thực vật như vậy có thể cho hạt có lượng protein cao hơn và lượng xơ thấp hơn các dạng cây cải dầu tiêu chuẩn, cũng như lượng phospho là tương đương với, hoặc cao hơn, lượng phospho ở cây cải dầu tiêu chuẩn. Theo một số phương án, các dòng lai cận thân và cây lai của cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể làm tăng đặc tính dinh dưỡng của bột khi được dùng trực tiếp làm thành phần của thức ăn gia súc hoặc thực phẩm, và/hoặc khi được dùng làm nguyên vật liệu cho thức ăn gia súc để chế biến protein phân lập và protein đậm đặc. Các hạt như vậy có thể có thể có màu sẫm (ví dụ, màu đen, sẫm màu, và có vết lốm đốm) hoặc sáng màu.

Do đó, trong bản mô tả này, sáng chế đề cập đến chất mầm nguyên sinh *Brassica* mà có thể được sử dụng để tạo ra cây cải dầu có các tính trạng thành phần hạt mong muốn theo cách không phụ thuộc vào màu của hạt. Theo một số phương án, thực vật chứa chất mầm nguyên sinh như vậy có thể được sử dụng để tạo ra bột cải dầu với chất lượng dinh dưỡng mong muốn. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các dòng cây cải dầu cận thân (và thực vật của chúng) chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế. Theo các phương án tiếp theo, sáng chế đề xuất các dòng cây cải dầu lai (và thực vật của

chúng) có cây cải dầu cận thân chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế dùng làm cây bố mẹ. Các giống cây cải dầu theo sáng chế bao gồm, ví dụ, và không chỉ giới hạn ở: CL044864; CL065620; CL166102H; CL121460H; và CL121466H.

Sáng chế cũng đề xuất ở đây các sản phẩm hàng hoá từ thực vật thu được từ cây cải dầu cận thân hoặc cây lai chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế. Các phương án cụ thể bao gồm bột cải dầu hoặc hạt thu được từ như vậy cây cải dầu cận thân hoặc cây lai.

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp cải thiện giá trị dinh dưỡng của bột cải dầu. Ví dụ, sáng chế cũng đề xuất các phương pháp thẩm nhập tổ hợp các đặc tính thành phần bột cải dầu vào chất mầm nguyên sinh *Brassica* theo cách không phụ thuộc vào màu của hạt. Theo các phương án cụ thể, chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể được kết hợp với chất mầm nguyên sinh cây cải dầu được đặc trưng cho vỏ hạt màu vàng để tạo ra chất mầm nguyên sinh có thể truyền cho bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao với các đặc tính mong muốn được truyền bởi mỗi trong số các chất mầm nguyên sinh.

Các dấu hiệu nêu trên và các dấu hiệu khác sẽ trở nên rõ ràng hơn từ phần mô tả chi tiết sau của một số phương án, khi tham khảo các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 bao gồm ảnh của một số giống cây cải dầu có vỏ hạt sẫm màu.

FIG. 2 bao gồm số liệu từ phân tích thành phần hạt của một số dòng lai cận thân *B. napus* và cây lai. Các mẫu hạt này thu được từ các thử nghiệm lặp lại ở miền Tây Canada. Số liệu về thành phần hạt được dự đoán trên cơ sở NIR, và sau đó được kiểm tra bằng cách áp dụng các phương pháp hóa học tham chiếu.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Tổng quan một số phương án

Bột cải dầu là phần hạt cải dầu còn lại sau quá trình chiết dầu. Bột cải dầu là nguồn protein, và do đó được dùng cho một số ứng dụng, bao gồm việc dùng làm chế

phẩm thức ăn cho động vật và phân tách dạng đậm đặc và phân tách protein có giá trị cao. Xơ trong vỏ hạt, lá mầm và phôi cuối cùng có trong bột này có giới hạn tỷ lệ đưa vào bột cải dầu ở loài động vật có một dạ dày, và do đó bột cải dầu thường không có được giá trị dinh dưỡng giống như bột thu được từ các nguồn khác (ví dụ, đậu nành). Dạng có hạt màu vàng ở loài gần với *B. napus* (ví dụ, *B. rapa* và *B. juncea*) tỏ ra có lượng xơ thấp hơn ở hạt và ở bột thu được sau đó. Phát hiện này đã thúc đẩy nỗ lực đưa tính trạng ít xơ trong hạt vào *B. napus* theo cách phụ thuộc vào màu vàng màu của hạt. Sự phát triển của chất mầm nguyên sinh *B. napus* có hạt màu vàng tạo ra đã chứng tỏ rằng lượng xơ có thể được giảm đi ở *B. napus* bằng cách áp dụng phương pháp này.

Trước khi hoàn thành sáng chế, không thể nghĩ rằng các giống cây cải dầu có hạt màu đen có thể cho hàm lượng chất xơ trong hạt thấp như mức nhận thấy ở các giống cây trồng có hạt màu vàng. Ngoài ra, các dòng cây cải dầu có hạt màu đen chứa lượng các yếu tố kháng dinh dưỡng giảm (ví dụ, chất xơ và các hợp chất polyphenolic), và lượng protein và phospho tăng lên sẽ là nguồn thu bột cải dầu cải thiện chưa được được biết đến. Theo một số phương án, chất mầm nguyên sinh cây cải dầu được đề xuất ở đây tạo ra tổ hợp một số đặc điểm tính trạng thành phần bột quan trọng cải thiện mà được biểu hiện độc lập với màu vỏ hạt. Theo các phương án cụ thể, bột cải dầu được chuẩn bị từ hạt cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể đạt được tỷ lệ đưa vào chế độ ăn cao hơn, ví dụ, ở chế độ ăn cho lợn và gia cầm.

Chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể được sử dụng (ví dụ, thông qua phương pháp nhân giống chọn lọc) để phát triển cây cải dầu có các tính trạng thành phần hạt mong muốn cùng với một hoặc nhiều các tính trạng mong muốn khác (ví dụ, thành phần dầu được cải thiện, sản xuất dầu tăng lên, thành phần protein biến đổi, tăng hàm lượng protein, tính kháng bệnh, ký sinh trùng, tính kháng thuốc diệt cỏ, v.v.). Chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất mầm nguyên sinh nguyên liệu mà dựa vào đó có thể đưa vào các thay đổi bổ sung về thành phần hạt, sao cho có thể phát triển các dòng cây cải dầu và cây lai tạo ra bột cải dầu có cải thiện tốt hơn đặc tính được đề xuất ở đây.

II. Các từ viết tắt

ADF xơ không hòa tan trong axit

ADL	lignin không hòa tan trong axit
AID	độ tiêu hoá trong ruột hồi biểu kiến
AME	năng lượng chuyển hoá được biểu kiến
BSC	cây cải dầu có hạt màu đen
CP	phần trăm protein thô
DM	nồng độ chất khô
ECM	bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao theo sáng chế
FAME	axit béo/metyl este của axit béo
GE	tổng năng lượng
HT	Xử lý “nhiệt độ cao”
LT	Xử lý “nhiệt độ thấp”
NDF	xơ không hòa tan trung tính
NMR	cộng hưởng từ hạt nhân
NIR	phổ gần như hồng ngoại
SAE	este của axit sinapic
SBM	bột đậu nành
SER	phần còn lại chiết hào tan
SID	độ tiêu hoá trong ruột hồi chuẩn hóa
TAAA	hệ số tiêu hóa axit amin thực
TDF	tổng chất xơ thực phẩm
TME	năng lượng thuần chuyển hoá được
WF	bông màu trắng

III. Các thuật ngữ

Lai ngược: Có thể sử dụng phương pháp lai ngược để đưa trình tự axit nucleic vào thực vật. Kỹ thuật lai ngược đã được sử dụng rộng rãi cho nhiều thập kỷ để đưa các tính

trạng mới vào thực vật. Jensen, N., Ed. Thực vật Breeding Methodology, John Wiley & Sons, Inc., 1988. Theo các phương pháp lai ngược thông thường, giống cây trồng gốc quan tâm (cây bố mẹ hồi quy) được lai chéo với giống cây trồng thứ hai (cây bố mẹ không hồi quy) mang gen quan tâm cần chuyển. Sau đó, thế hệ con thu được từ phép lai này được lai chéo tiếp với cây bố mẹ hồi quy, và quá trình này được lặp lại cho đến khi thu được thực vật mà trong đó về cơ bản có tất cả các đặc tính hình thái và sinh lý mong muốn của thực vật hồi quy được phục hồi trong thực vật được chuyển đổi, ngoài gen chuyển từ cây bố mẹ không hồi quy.

Dầu cây cải dầu: Dầu cây cải dầu dùng để chỉ dầu chiết từ các giống cây cải thương mại. Để tạo ra dầu cây cải dầu, hạt thường được phân hạng và được trộn ở bộ phận nâng hạt để tạo ra sản phẩm có độ đồng nhất chấp nhận được. Sau đó, hạt đã được trộn này được nghiền, và dầu thường được chiết bằng hexan và sau đó được tinh chế. Khi đó dầu thu được có thể được bán cho người sử dụng. Hàm lượng dầu thường được đo theo phần trăm của toàn bộ hạt khô, và hàm lượng dầu cụ thể là đặc trưng của các giống cây cải dầu khác nhau. Hàm lượng dầu có thể được xác định một cách dễ dàng và thông thường bằng cách sử dụng các kỹ thuật phân tích khác nhau, ví dụ và không chỉ giới hạn ở: NMR; NIR; chiết tách Soxhlet, hoặc các phương pháp khác các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biến đến một cách rộng rãi. Xem Bailey, *Industrial Oil & Fat Products* (1996), 5th Ed. Wiley Interscience Publication, New York, New York. Thành phần phần trăm của tổng lượng axit béo thường được xác định bằng cách chiết mẫu dầu từ hạt, để tạo ra este metyl của các axit béo có mặt trong mẫu dầu, và phân tích tỷ lệ của các axit béo khác nhau trong mẫu bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký khí. Thành phần axit béo cũng có thể là đặc điểm đặc trưng của mỗi giống cây trồng nhất định.

Hữu ích về mặt thương mại: Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “hữu ích về mặt thương mại” dùng để chỉ các dòng thực vật và cây lai có sức sống và có tính hữu thụ thực vật thích hợp, để cây trồng của dòng thực vật hoặc cây lai có thể được người nông dân tạo ra bằng cách áp dụng thiết bị làm ruộng thông thường. Theo các phương án cụ thể, các sản phẩm hàng hoá từ thực vật với hợp phần và/hoặc chất lượng được mô tả có thể được chiết từ thực vật hoặc chất liệu thực vật của giống cây trồng hữu ích về mặt thương mại. Ví dụ, dầu chứa hợp phần dầu mong muốn có thể được chiết từ hạt của dòng thực vật hoặc cây lai hữu ích về mặt thương mại bằng cách sử dụng thiết bị

nghiên và chiết tách thông thường. Theo một số phương án, dòng thực vật hữu ích về mặt thương mại là dòng lai gần hoặc dòng cây lai. Các dòng “cây đầu dòng” và cây lai thường có các đặc tính nông nghiệp mong muốn; ví dụ và không chỉ giới hạn ở: năng suất cải thiện về ít nhất một sản phẩm hàng hoá thực vật; độ chín; tính kháng bệnh; và phát triển mạnh.

Dòng ưu tú: Dòng thực vật bất kỳ được tạo ra từ quá trình nhân giống và chọn lọc có đặc tính nông nghiệp tốt hơn. Thực vật ưu tú (cây đầu dòng) là thực vật bất kỳ từ dòng ưu tú.

Bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao: Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao” dùng để chỉ bột cải dầu có thành phần cải thiện thu được từ quá trình xử lý hạt cải dầu có hàm lượng protein tăng lên và hàm lượng của ít nhất một số thành phần kháng dinh dưỡng giảm đi. Bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao theo sáng chế có thể được nêu trong bản mô tả này theo cách khác nhau là "ECM," "cây cải dầu ECM có hạt màu đen," "BSC ECM," hoặc "DAS BSC ECM." Tuy nhiên, sáng chế không được dự định để chỉ giới hạn ở chất mầm nguyên sinh ECM của cây cải dầu có hạt màu đen.

Về cơ bản có nguồn gốc từ: Theo một số phương án, việc xử lý thực vật, hạt, hoặc bộ phận của chúng có thể tạo ra các giống cây trồng về cơ bản có nguồn gốc từ. Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “về cơ bản có nguồn gốc từ” tuân theo quy ước được nêu trong The International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV):

[A] Một giống cây trồng sẽ được xem là về cơ bản thu được từ một giống cây trồng khác (“giống cây trồng ban đầu”) khi

(i) nó chủ yếu thu được từ giống cây trồng ban đầu, hoặc từ giống cây trồng mà chính là chủ yếu thu được từ giống cây trồng ban đầu, mà giữ được biểu hiện các đặc tính cơ bản thu được từ kiểu gen hoặc kết hợp của các kiểu gen của giống cây trồng ban đầu;

(ii) nó có khả năng phân biệt rõ ràng so với giống cây trồng ban đầu; và

(iii) ngoại trừ các khác biệt phát sinh từ tác động của quá trình chuyển đổi, giống cây trồng này giống như giống cây trồng ban đầu về mặt biểu hiện các

đặc tính cơ bản phát sinh từ kiểu gen hoặc kết hợp của các kiểu gen của giống cây trồng ban đầu.

UPOV, Sixth Meeting with International Organizations, Geneva, Oct. 30, 1992 (tài liệu của văn phòng UPOV).

Sản phẩm hàng hoá thực vật: Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “sản phẩm hàng hoá thực vật” dùng để chỉ hàng hóa tạo ra từ thực vật cụ thể hoặc bộ phận thực vật (ví dụ, thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế, và bộ phận thực vật thu được từ thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế). Sản phẩm hàng hoá có thể, ví dụ và không chỉ giới hạn ở: hạt; bột; thức ăn cho súc vật; protein; protein được phân tách; bột; dầu; hạt được nghiền hoặc nguyên hạt hoặc hạt; sản phẩm thực phẩm bất kỳ chứa bất kỳ bột, dầu, hoặc hạt được nghiền hoặc nguyên hạt; hoặc thức ăn gia súc ủ xilô.

Dòng thực vật: Như được sử dụng ở bản mô tả này, “dòng” dùng để chỉ nhóm thực vật ít biểu hiện biến dị di truyền (ví dụ, không có biến dị di truyền) giữa các cá thể về ít nhất một tính trạng. Các dòng lai cận thân có thể được tạo ra bởi một số thể hệ tự thụ phấn và chọn lọc hoặc, theo cách khác, bằng cách nhân giống sinh dưỡng từ một cây bố mẹ bằng cách áp dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô hoặc tế bào. Như được sử dụng ở bản mô tả này, các thuật ngữ “cây trồng,” “giống cây trồng,” và “loại” là có cùng một nghĩa, và các thuật ngữ này dùng để chỉ dòng được dùng để sản xuất thương mại.

Chất liệu thực vật: Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “chất liệu thực vật” dùng để chỉ bất kỳ chất liệu được xử lý hoặc không được xử lý, mà toàn bộ hoặc một phần, là từ thực vật. Ví dụ và không chỉ giới hạn ở, chất liệu thực vật có thể bộ phận thực vật, hạt, quả, lá cây, rễ, mô thực vật, mô nuôi cấy thực vật, mảnh cây thực vật, hoặc tế bào thực vật.

Độ ổn định: Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “độ ổn định,” hoặc “ổn định,” dùng để chỉ thành phần hoặc tính trạng thực vật nhất định có tính di truyền và được duy trì ở về cơ bản cùng một mức qua nhiều thế hệ hạt. Ví dụ, một thành phần ổn định có thể được duy trì trong ít nhất ba thế hệ về cơ bản ở cùng một mức. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “về cơ bản giống như” có thể dùng để chỉ theo một số phương án thành phần được duy trì trong khoảng khác biệt 25% giữa hai thế hệ khác nhau; trong 20%; trong 15%; trong 10%; trong 5%; trong 3%; trong 2%; và/hoặc trong 1%, cũng như

thành phần được duy trì hoàn hảo giữa hai thể hệ khác nhau. Theo một số phương án, thành phần thực vật ổn định có thể, ví dụ và không chỉ giới hạn ở, thành phần dầu; thành phần protein; thành phần xơ; thành phần chất màu; thành phần glucosinolat; và thành phần lignin. Độ ổn định của thành phần có thể bị ảnh hưởng bởi một hoặc nhiều yếu tố môi trường. Ví dụ, độ ổn định của một thành phần dầu có thể bị ảnh hưởng bởi, ví dụ và không chỉ giới hạn ở: nhiệt độ; vị trí; điều kiện khắc nghiệt; và thời gian trồng. Sau đó các thể hệ của thực vật có thành phần ổn định ở các điều kiện trên cánh đồng sẽ được cho là tạo ra thành phần thực vật theo cách tương tự, ví dụ, như được nêu trên.

Tính trạng hoặc kiểu hình: Các thuật ngữ “tính trạng” và “kiểu hình” được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này.

Giống cây trồng hoặc cây trồng: Các thuật ngữ "giống cây trồng" hoặc "cây trồng" trong bản mô tả này dùng để chỉ dòng thực vật được sử dụng cho sản xuất thương mại có tính phân biệt, ổn định và đồng nhất về các đặc tính của nó khi được nhân lên. Trong trường hợp giống cây trồng hoặc cây trồng lai, các dòng cây bố mẹ có tính phân biệt, ổn định, và đồng nhất về các đặc tính của chúng.

Trừ khi được quy định khác đi, các mạo từ “a” và “an” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ ít nhất một.

IV. Chất mầm nguyên sinh cây cải dầu mang lại các tính trạng thành phần hạt mong muốn theo cách không phụ thuộc vào màu của hạt

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất chất mầm nguyên sinh *Brassica* có thể được sử dụng để thu được cây cải dầu có các tính trạng thành phần hạt mong muốn theo cách không phụ thuộc vào màu của hạt. Sáng chế cùng đề xuất ví dụ cụ thể về các dòng cây cải dầu lai cận thân và cây lai chứa chất mầm nguyên sinh này.

Dầu cây cải dầu thường được coi là dầu rất tốt cho sức khỏe, dùng được cho cả người và động vật. Tuy nhiên, thành phần bột của hạt cải dầu, còn lại sau khi chiết thành phần dầu, không tốt như bột đậu nành, vì nó có hàm lượng xơ cao và giá trị dinh dưỡng giảm. Theo một số phương án, cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế giảm nhẹ hoặc khắc phục được các nhược điểm này, và có thể tạo ra bột cải dầu như là nguồn thức ăn cho động vật có giá trị dinh dưỡng cao và kinh tế. Bột cải dầu là sản phẩm

phụ của quá trình sản xuất dầu cây cải dầu, và do đó bột cải dầu theo sáng chế là nguồn có giá trị vì làm cho sản phẩm phụ này được sử dụng một cách cạnh tranh với các bột khác.

Trước đây, người ta cho rằng chính màu vàng của hạt cải dầu đóng vai trò quan trọng, vì nó được cho là có các đặc tính dinh dưỡng được cải thiện của thành phần bột thu được sau chiết tách dầu. Một số phương án có thể đề xuất, lần đầu tiên, chất mầm nguyên sinh cho cây cải dầu có hạt màu đen (ví dụ, hạt sẫm màu, màu đen, và có vằn), mà vẫn có nhiều dầu oleic và ít dầu linolenic tốt hơn, chất mầm nguyên sinh này còn cho bột cải dầu có các đặc tính dinh dưỡng được cải thiện (ví dụ, hợp phần hạt được cải thiện). Theo một số phương án, thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế, đáng ngạc nhiên là có thể còn có các tính trạng này cùng với các tính trạng có giá trị khác (ví dụ và không chỉ giới hạn ở, cho năng suất cao, hàm lượng protein cao, hàm lượng dầu cao, và chất lượng dầu tốt). Theo các phương án cụ thể, hạt có lớp bao sẫm màu có thể có vỏ hạt mỏng hơn đáng kể hạt thu được từ các giống cây cải dầu có hạt màu đen tiêu chuẩn. Lớp vỏ hạt mỏng hơn này dẫn đến sự giảm hàm lượng xơ trong bột thu được, và tăng hàm lượng dầu và protein trong hạt, so với hàm lượng dầu và protein ở các giống cây trồng có hạt màu đen tiêu chuẩn. Do đó hạt sẫm màu thu được từ thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể có nồng độ dầu và protein trong hạt cao hơn nồng độ nhận thấy ở hạt thu được từ cây cải dầu có hạt màu đen tiêu chuẩn.

Theo các phương án, thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể không có hạn chế nông nghiệp và/hoặc hạt đáng kể. Ví dụ, thực vật như vậy có thể thể hiện chất lượng nông nghiệp và/hoặc hạt (ví dụ, sự nảy mầm; sức sống trong mùa sớm; ảnh hưởng của việc xử lý hạt; thu hoạch hạt và đặc tính bảo quản) ít nhất là thuận lợi như các đặc tính thể hiện ở các giống cây cải dầu tiêu chuẩn. Theo các phương án cụ thể, thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế cũng có thể có một hoặc nhiều tính trạng thuận lợi hơn nữa được thể hiện ở dòng cây cải dầu lai gần, ví dụ và không chỉ giới hạn ở, profin axit béo thuận lợi.

Theo các phương án, thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể cho hạt có ít nhất một trong một số đặc tính dinh dưỡng đặc trưng. Theo các phương án cụ thể, hạt thu được từ cây cải dầu như vậy có thể có ít nhất một đặc tính dinh dưỡng được chọn từ nhóm bao gồm: profin dầu thuận lợi; hàm lượng protein cao; hàm lượng xơ

thấp (ví dụ, ADF và NDF (gồm cả hàm lượng các chất polyphenolic thấp)); (lượng xơ ít và lượng protein cao mang lại năng lượng chuyển hoá được cao hơn); hàm lượng phospho cao; và hàm lượng este của axit sinapic (SAE) thấp;. Theo một số phương án, hàm lượng thành phần “cao” hoặc “thấp” dùng để chỉ so sánh giữa hạt thu được từ thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế đối chiếu và hạt thu được từ các giống cây cải dầu tiêu chuẩn. Do đó, thực vật cho hạt có hàm lượng xơ “thấp” có thể cho hạt có hàm lượng xơ thấp hơn hàm lượng nhận thấy ở hạt thu được từ các giống cây cải dầu tiêu chuẩn. Và, thực vật cho hạt có hàm lượng protein “cao” có thể cho hạt có hàm lượng protein cao hơn hàm lượng nhận thấy ở hạt thu được từ các giống cây cải dầu tiêu chuẩn.

Theo một số phương án, có thể tạo ra tập hợp về cơ bản đồng nhất của cây cải tạo ra từ cây cải dầu có ít nhất một đặc tính dinh dưỡng được chọn từ nhóm nêu trên. Hạt như vậy có thể được sử dụng để tạo ra cánh đồng cây cải dầu về cơ bản đồng nhất. Các phương án cụ thể tạo ra hạt cải dầu chứa tổ hợp nhận diện các đặc tính nêu trên. Ví dụ, hàm lượng dầu và protein tổng cộng kết hợp của hạt có thể là đặc tính đo lường và duy nhất hữu ích của hạt.

Một số phương án đề xuất cây cải dầu (ví dụ, cây cải dầu có hạt màu đen) chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có khả năng tạo ra dầu cây cải dầu có profin dầu kiểu NATREON. Profin dầu “kiểu NATREON,” hoặc “tương tự NATREON” có thể dùng để chỉ rằng hàm lượng axit oleic nằm trong khoảng, ví dụ, 68-80%; 70-78%; 71-77%; và 72-75%, cùng với hàm lượng alpha linolenic thấp hơn, ví dụ, 3%. theo các phương án cụ thể, hạt thu được từ cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể cho năng suất dầu có trên 70%, trên 71%, trên 71,5%, và/hoặc trên 72% (ví dụ, 72,4% hoặc 72,7%) axit oleic, đồng thời có hàm lượng axit linolenic nhỏ hơn 2,4%, nhỏ hơn 2%, nhỏ hơn 1,9%, và/hoặc nhỏ hơn 1,8% (ví dụ, 1,7%). Tuy nhiên, theo các phương án tiếp theo, cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể cho năng suất dầu có, ví dụ, hàm lượng axit oleic cao hơn 80%. Theo một số phương án, dầu cây cải dầu thu được từ cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể có tính ổn định tự nhiên (ví dụ, không được hydro hoá nhân tạo). Hàm lượng axit béo trong dầu cây cải dầu có thể được xác định một cách dễ dàng và bình thường theo các phương pháp đã biết.

Do đó, một số phương án đề xuất hạt cải dầu (ví dụ, hạt cải dầu sẫm màu) chứa phần dầu và phần bột, trong đó phần dầu này có thể có hàm lượng axit ω -linolenic, ví dụ, bằng 3% hoặc ít hơn (so với tổng hàm lượng axit béo trong hạt), và hàm lượng axit oleic, ví dụ, bằng 68% hoặc nhiều hơn (so với tổng hàm lượng axit béo trong hạt). Có thể định nghĩa là, hàm lượng axit eruxic (C22:1) của hạt như vậy cũng có thể nhỏ hơn 2% khối lượng (so với tổng hàm lượng axit béo trong hạt). Trong các ví dụ cụ thể, hàm lượng dầu của hạt cải dầu có thể chiếm 48%-50% trọng lượng hạt.

Xơ là một thành phần của thành tế bào thực vật, và bao gồm polyme hydrat cacbon (ví dụ, xenluloza (mạch polyme glucoza thẳng)); hemixenluloza (mạch nhánh của heteropolyme của, ví dụ, galactoza, xyloza, arabinoza, rhamnoza, có các phân tử phenolic gắn vào); và pectin (polyme hòa tan trong nước của axit galacturonic, xyloza, arabinoza, với mức độ methyl hóa khác nhau). Xơ cũng bao gồm polyme polyphenolic (ví dụ, polyme tương tự lignin và tanin đậm đặc). Về mặt lý thuyết, xơ ADF bao gồm xenluloza và lignin. Tanin đậm đặc thường được bao hàm trong phân đoạn ADF, nhưng hàm lượng tanin đậm đặc thay đổi một cách độc lập với ADF. Ngược lại, TDF là bột mà từ đó protein, các chất hòa tan, và tinh bột đã được loại bỏ, và bao gồm các hợp phần thành tế bào không tan (ví dụ, xenluloza, hemixenluloza, polyphenolic, và lignin).

Theo các phương án cụ thể, hạt của cây cải dầu (ví dụ, cây cải dầu có hạt màu đen) chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể có ADF giảm đi, so với giống cây cải dầu. Trong các ví dụ cụ thể, hàm lượng xơ của bột cải dầu (nguyên hạt, được loại bỏ dầu, tính trên chất khô) có thể chứa, ví dụ và không chỉ giới hạn ở: nhỏ hơn khoảng 18% ADF (ví dụ, khoảng 18% ADF, khoảng 17% ADF, khoảng 16% ADF, khoảng 15% ADF, khoảng 14% ADF, khoảng 13% ADF, khoảng 12% ADF, khoảng 11% ADF, và khoảng 10% ADF và/hoặc nhỏ hơn khoảng 22% NDF (ví dụ, khoảng 22,0% NDF, khoảng 21% NDF, khoảng 20% NDF, khoảng 19% NDF, khoảng 18% NDF, và khoảng 17% NDF).

Theo các phương án cụ thể, hạt của cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể có hàm lượng protein tăng lên, so với giống cây cải dầu có hạt màu đen tiêu chuẩn. Trong các ví dụ cụ thể, hàm lượng protein trong bột cải dầu (nguyên hạt, đã được tách dầu, tính trên chất khô) có thể chứa, ví dụ và không chỉ giới hạn ở, cao hơn khoảng 45% (ví dụ, khoảng 45%, khoảng 46%, khoảng 47%, khoảng 48%, khoảng 49%, khoảng 50%, khoảng 51%, khoảng 52%, khoảng 53%, khoảng 54%, khoảng 55%,

khoảng 56%, khoảng 57%, và khoảng 58%) protein thô. Các giống cây cải dầu khác nhau được đặc trưng ở hàm lượng protein nhất định. Hàm lượng protein (% nguyên tử nitơ x 6,25) có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật phân tích thông thường và đã biết rõ khác nhau, ví dụ, phương pháp NIR và Kjeldahl.

Theo một số phương án, hàm lượng phospho cũng có thể được dùng để xác định hạt, thực vật, và các dòng giống cây cải dầu. Các giống cây cải dầu như vậy có thể tạo ra bột cải dầu (nguyên hạt, đã được tách dầu, tính trên chất khô) có hàm lượng phospho nâng cao so với bột tạo ra từ các giống cây cải dầu tiêu chuẩn. Ví dụ, bột cải dầu theo sáng chế có thể có hàm lượng phospho cao hơn 1,2%; cao hơn 1,3%; cao hơn 1,4%; cao hơn 1,5%; cao hơn 1,6%; cao hơn 1,7%, và/hoặc nhiều hơn than 1,8%.

Các tổ hợp khác nhau của các tính trạng nêu trên cũng có thể được nhận diện trong, và và được nêu ví dụ bởi, các dòng cây cải dầu cận thân và cây lai được đưa ra ở một số ví dụ. Các dòng này chứng tỏ rằng chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra và thu nhận tổ hợp mới khác nhau nhiều giống cây trồng có các đặc tính và/hoặc các tính trạng cây cải dầu có lợi. Ví dụ, dòng cây cải dầu cận thân chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể được lai chéo với dòng cây cải dầu khác có đặc tính và/hoặc tính trạng mong muốn để đưa các đặc tính thành phần hạt mong muốn vào dòng cây cải dầu cận thân chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế. Có thể tính toán thành phần hạt (*ví dụ*, hàm lượng xơ, hàm lượng glucosinolat, hàm lượng dầu, v.v.) và các tính trạng thực vật khác bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã biết trong ngành công nghiệp. Bằng cách chọn lọc và nhân giống cây thế hệ con tạo ra từ phép lai có các đặc tính và/hoặc các tính trạng mong muốn của các giống cây trồng bố mẹ, có thể tạo ra các giống cây trồng mới có tổ hợp các đặc tính và/hoặc tính trạng mong muốn.

V. Bột cải dầu có các đặc tính dinh dưỡng được cải thiện

Một số phương án đề xuất bột chứa hạt cải dầu, trong đó hạt cải dầu có các đặc tính dầu và bột như được bàn luận trên đây. Ví dụ, một số phương án bao gồm bột cải dầu được chiết bằng hexan, làm khô trong không khí (Bông màu trắng, hoặc WF) có tổ hợp mới các đặc tính (*ví dụ*, thành phần của hạt) như được bàn luận trên đây. Các phương án cụ thể bao gồm bột chứa hạt cải dầu tạo ra từ thực vật chứa chất mầm nguyên sinh

theo sáng chế, và bột chứa hạt của thể hệ con của thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế.

Theo một số phương án, các dòng cây cải dầu lai cận thân và cây lai chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể cho các đặc tính cải thiện về mặt dinh dưỡng khi được dùng trực tiếp làm thành phần thức ăn gia súc hoặc thực phẩm, và/hoặc khi được sử dụng làm nguyên liệu làm thức ăn gia súc để chế biến các chất tách protein và các dạng đậm đặc. Ví dụ, các dòng cây cải dầu lai cận thân và cây lai như vậy có thể làm cho đặc tính thức ăn cho động vật tốt hơn so với bột cải dầu tiêu chuẩn. Theo một số phương án, thành phần của bột cải dầu (và thức ăn cho động vật chứa chúng) có thể được sử dụng để tạo ra nguồn dinh dưỡng tốt cho động vật có một dạ dày (ví dụ, lợn và gia cầm).

Theo một số phương án, thành phần của bột cải dầu (và thức ăn cho động vật chứa các thành phần này) có thể được sử dụng tiếp để tạo ra nguồn dinh dưỡng tốt cho động vật nhai lại (ví dụ, bò động vật, cừu, dê, và các động vật khác thuộc bộ phụ *Ruminantia*). Việc dùng làm thức ăn gia súc cho động vật nhai lại là một vấn đề khó khăn đặc biệt và mở ra các cơ hội đặc biệt. Các cơ hội đặc biệt nảy sinh từ khả năng động vật nhai lại sử dụng xơ xenluloza không tan, có thể được phân hủy bởi một số vi sinh vật trong dạ cỏ của các động vật này, nhưng thường lại không tiêu hóa được ở động vật có vú có một dạ dày như lợn. Vấn đề khó khăn đặc biệt nảy sinh từ xu thế của một số thức ăn gia súc gây ức chế sự tiêu hoá xơ ở dạ cỏ, và xu thế dạ cỏ hạn chế việc sử dụng một số hợp phần trong một số thức ăn gia súc, như chất béo và protein.

Hạt *Brassica* đã tách dầu là nguồn tiềm năng có protein chất lượng cao để dùng làm thức ăn cho động vật. Sau khi chiết tách dầu, bột cải dầu hàng hoá chứa khoảng 37% protein, so với khoảng 44 - 48% ở bột đậu nành, là loại hiện nay được ưu tiên dùng rộng rãi làm thức ăn gia súc và thực phẩm. Protein có trong cây cải dầu giàu metionin và có lượng lysin thích hợp, cả hai axit amin này là các axit amin có lượng giới hạn trong phần lớn các protein từ ngũ cốc và hạt có dầu. Tuy nhiên, việc sử dụng bột cải dầu làm nguồn protein có một số hạn chế nào đó trong một số thức ăn cho động vật, vì chứa các thành phần không mong muốn như xơ, glucosinolat, và phenolic.

Một khía cạnh dinh dưỡng của cây cải, là loài nguồn gốc của cây cải dầu, đó là có hàm lượng cao (30-55 $\mu\text{mol/g}$) glucosinolat, một hợp chất trên cơ sở lưu huỳnh. Khi nghiền lá hoặc hạt cải dầu, tạo ra este isothioxyanat do tác động của myrosinaza trên

glucosinolat. Các sản phẩm này ức chế tổng hợp thyroxin tạo ra do tuyến giáp và có các tác động kháng trao đổi chất khác. Paul *et al.* (1986) Theor. Appl. Genet. 72:706-9. Do đó, để dùng làm thực phẩm cho người, hàm lượng glucosinolat trong, ví dụ, protein thu được từ cây cải bột phải được giảm đi hoặc hạn chế để tạo ra sản phẩm an toàn.

Hạt cải dầu được cải thiện với, ví dụ, profin dầu và hàm lượng thuận lợi và hàm lượng glucosinolat thấp trong hạt sẽ làm giảm đáng kể việc phải hydro hóa. Ví dụ, Hàm lượng axit oleic cao hơn và axit α -linolenic thấp hơn trong dầu như vậy có thể góp phần làm tăng độ ổn định oxy hóa, nhờ đó giảm yêu cầu hydro hóa và sản xuất các trans axit béo. Việc khử glucosinolat trong hạt sẽ làm giảm đáng kể hàm lượng lưu huỳnh dư trong dầu. Lưu huỳnh gây hại chất xúc tác niken thường được sử dụng cho hydro hóa. Koseoglu *et al.*, Chapter 8, trong Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition, and Processing Technology, Ed. Shahidi, Van Nostrand Reinhold, N.Y., 1990, pp. 123-48. Ngoài ra, dầu từ giống cây cải dầu có lượng glucosinolat trong hạt thấp sẽ ít tốn kém hơn khi hydro hóa.

Các hợp chất phenolic trong bột cải dầu truyền vị đắng, và được cho là chắc hẳn liên quan đến màu sẫm trong sản phẩm protein cuối. Vỏ ngoài của hạt, có ở lượng lớn trong bột cải dầu tiêu chuẩn, là không tiêu hoá được đối với người và các động vật có một dạ dày khác, và cũng tạo ra sản phẩm khá không đồng nhất.

Thành phần bột của hạt thu được từ cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể gồm có, ví dụ và không chỉ giới hạn ở: lượng protein cao; lượng xơ ít; lượng phospho cao hơn; và/hoặc SAE thấp. Xơ không tan và polyphenolic, là các chất kháng dinh dưỡng và làm giảm khả năng tiêu hoá protein và axit amin. Do đó, bột cải dầu và thức ăn cho động vật chứa bột cải dầu có ít nhất một đặc tính thành phần hạt được chọn từ nhóm bao gồm hàm lượng xơ giảm đi, hàm lượng protein tăng lên, hàm lượng polyphenolic giảm và hàm lượng phospho tăng lên, có thể là điều mong muốn trong một số ứng dụng.

Trong các ví dụ cụ thể, bột cải dầu (trên lượng chất khô không dầu) có thể chứa hàm lượng protein ít nhất khoảng 45% (ví dụ, khoảng 45%, khoảng 46%, khoảng 47%, khoảng 48%, khoảng 49%, khoảng 50%, khoảng 51%, khoảng 52%, khoảng 53%, khoảng 54%, khoảng 55%, khoảng 56%, khoảng 57%, và khoảng 58%).

Các giống cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể cho năng suất cao và cho hạt có có xơ không hoà tan trong axit (ADF) thấp hơn nhiều so với dòng cây cải dầu tham khảo. Các giá trị thực nghiệm bất kỳ được xác định cho mỗi thành phần của hạt thu được từ giống cây trồng thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể được sử dụng theo một số phương án để xác định thực vật, hạt, và dầu của giống cây trồng thực vật. Theo một số ví dụ như vậy, các số liệu cụ thể có thể được sử dụng như là điểm đầu mút để xác định khoảng nằm trên, dưới, hoặc nằm giữa bất kỳ trong các các giá trị được xác định. Các khoảng ví dụ về các đặc tính dầu và các thành phần hạt khác đã được nêu trên đây. Các dòng và hạt của thực vật của chúng cũng có thể được xác định bởi tổ hợp của các khoảng như vậy. Ví dụ, các đặc tính dầu được bàn luận trên đây cùng với đặc tính về lượng xơ, lượng polyphenolic, lượng glucosinolat, lượng protein, và lượng phospho, ví dụ, có thể được sử dụng để xác định các dòng cụ thể và hạt của chúng.

Không phải cần đến tất cả các đặc tính nêu trên (ví dụ, các đặc tính thành phần hạt) để xác định các dòng và hạt của một số phương án, nhưng có thể sử dụng các đặc tính bổ sung để xác định các dòng và hạt như vậy (ví dụ và không chỉ giới hạn ở, năng lượng chuyển hoá được, năng lượng tiêu hoá được, năng lượng sinh học, và năng lượng thuần).

VI. Thực vật chứa chất mầm nguyên sinh mang lại các tính trạng thành phần hạt mong muốn theo cách không phụ thuộc vào màu của hạt

Các tính trạng mong muốn của các dòng cây cải dầu lai cận thân và cây lai nhất định chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể đưa vào các loài *Brassica* khác (thông qua phương pháp nhân giống thông thường và các phương pháp tương tự), ví dụ, *B. rapa*, và *B. juncea*, tạo ra thực vật cho hạt với các đặc tính mong muốn (ví dụ, các đặc tính thành phần hạt) được biểu hiện độc lập với màu hạt. Do đó, một giống cây trồng *Brassica* đã được đưa một hoặc nhiều tính trạng mong muốn của dòng cây cải dầu lai gần hoặc cây lai nhất định chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể cho hạt với các đặc tính mong muốn là hạt màu vàng hoặc hạt màu đen. Bột và hạt của các giống cây trồng *Brassica* mới hoặc cải biến như vậy có thể có lượng chất xơ trong hạt giảm đi, lượng protein tăng lên, lượng phospho tăng lên, và/hoặc lượng polyphenolic giảm đi.

Một số phương án đề xuất không chỉ hạt màu vàng và sẫm màu của cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh như mô tả và được nêu ví dụ trong bản mô tả này, mà còn đề xuất thực vật được trồng hoặc theo cách khác được tạo ra từ các hạt này, và nuôi cấy mô của các tế bào có khả năng tái sinh của cây cải dầu mục tiêu. Các dòng và cây lai được nêu ví dụ được thu nhận mà không dùng kỹ thuật di truyền và không gây đột biến, cho thấy công dụng của chất mầm nguyên sinh trong việc tạo ra các giống cây cải dầu mới và cải biến.

Theo một số phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các dòng cây cải dầu lai cận thân và cây lai ví dụ cụ thể. Để nhằm phục vụ cho nội dung bộc lộ, ít nhất 2500 hạt của mỗi trong số các giống CL065620, CL044864, CL121460H, CL166102H và CL121466H đã được nộp lưu và công chúng có thể tiếp cận, là đối tượng của độc quyền sáng chế, nhưng theo cách khác không bị hạn chế (ngoài trừ các hạn chế được cho phép theo 37 C.F.R. § 1.808(b)), với American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. 20852. Các mẫu nộp lưu này đã có số đơn nộp lưu ATCC số PTA-11697, PTA-11696, PTA-11698, PTA-12570, và PTA-11699, lần lượt, với ngày nộp lưu là 22/02/2011 cho các giống từ PTA11696 đến PTA11699 và 21/2/2012 cho PTA-12570. Mẫu nộp lưu sẽ được duy trì như được nêu trên ở Cơ quan lưu giữ công cộng ATCC, trong thời gian 30 năm, hoặc năm năm sau lần yêu cầu gần nhất, hoặc trong suốt thời gian hiệu lực của bằng sáng chế, tính đến thời gian lâu hơn, và nộp lưu sẽ được thay thế nếu như mẫu lưu bị chết trong thời gian đó.

Một số phương án bao gồm hạt của giống cây *Brassica napus* bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này. Một số phương án còn bao gồm thực vật *Brassica napus* thu được từ các hạt này, cũng như nuôi cấy mô của các tế bào có khả năng tái sinh của thực vật như vậy. Sáng chế cũng đề cập đến thực vật *Brassica napus* được tái sinh từ nuôi cấy mô như vậy. Theo các phương án cụ thể, thực vật như vậy có thể có khả năng biểu hiện tất cả các đặc tính hình thái và sinh lý của giống cây trồng được nêu ví dụ. Thực vật *Brassica napus* theo các phương án cụ thể có thể có các đặc tính sinh lý và/hoặc hình thái nhận diện của thực vật được trồng từ hạt đã được nộp lưu.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình tạo ra cây lai bằng cách sử dụng chất mầm nguyên sinh theo sáng chế (ví dụ, như được tìm thấy trong các dòng cây cải dầu lai cận thân ví dụ và cây lai được tạo ra theo bản mô tả này) ở ít nhất một cây bố mẹ của thế hệ

con của hạt được mô tả trên đây. Ví dụ, một số phương án bao gồm thực vật *B. napus* lai F_1 có như là một hoặc cả hai cây bố mẹ bất kỳ trong số các thực vật này được nêu ví dụ trong bản mô tả này. Các phương án khác nữa bao gồm hạt *B. napus* tạo ra bởi cây lai F_1 như vậy. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra hạt cây lai F_1 *B. napus* bao gồm việc lai thực vật được nêu ví dụ với cây cây cải dầu bố mẹ cận thân khác nhau, và thu hoạch hạt lai thu được. Cây cải dầu theo sáng chế (ví dụ, cây cải dầu bố mẹ, và cây cải dầu tạo ra bằng phương pháp tạo ra cây lai F_1) có thể là cây mẹ hoặc cây bố.

Các đặc tính của cây cải dầu theo một số phương án (ví dụ, lượng dầu và protein và/hoặc protein) có thể được cải biến và/hoặc cải thiện hơn nữa bằng cách lai thực vật theo sáng chế với một dòng khác có đặc tính cải biến (ví dụ, lượng dầu và lượng protein cao). Tương tự, có thể cải thiện các đặc tính khác bằng cách xem xét kỹ thực vật bố mẹ. Các dòng cây cải dầu chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể có lợi để lai các đặc tính thành phần hạt mong muốn của chúng vào dòng cây cải dầu hoặc các dòng cây cải dầu canola khác theo cách không phụ thuộc vào màu của hạt. Chất mầm nguyên sinh theo sáng chế cho phép các tính trạng này được đưa vào thực vật khác trong cùng một loài bằng các kỹ thuật nhân giống thực vật thông thường, bao gồm thụ phấn chéo và chọn lọc thể hệ con. Theo một số phương án, các tính trạng mong muốn có thể được chuyển giữa các loài bằng cách sử dụng thực vật các kỹ thuật nhân giống thông thường gồm có giao phấn và chọn lọc. Xem, ví dụ, *Brassica crops and wild allies biology and breeding*, Eds. Tsunada *et al.*, Japan Scientific Press, Tokyo (1980); *Physiological Potentials for Yield Improvement of Annual Oil and Protein Crops*, Eds. Diepenbrock and Becker, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Vienna (1995); *Canola and Rapeseed*, Ed. Shahidi, Van Nostrand Reinhold, N.Y. (1990); and *Breeding Oilseed Brassicas*, Eds. Labana *et al.*, Narosa Publishing House, New Dehli (1993).

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp chuyển ít nhất một đặc tính thành phần hạt mong muốn theo cách không phụ thuộc vào màu của hạt bao gồm việc tuân theo phép lai giữa các loài khác nhau, các thành viên tự thụ phấn của thể hệ F_1 để tạo ra hạt F_2 . Sau đó, có thể thực hiện phép lai ngược để thu được các dòng thể hiện đặc tính thành phần hạt mong muốn. Ngoài ra, có thể sử dụng phương pháp dùng dung hợp thể nguyên sinh và các phương pháp cấy ghép hạt nhân để truyền tính trạng từ một

loài này sang loài khác. *Xem, ví dụ*, Ruesink, "Fusion of Higher Plant Protoplasts," Methods in Enzymology, Vol. LVIII, Eds. Jakoby and Pastan, Academic Press, Inc., New York, N.Y. (1979), và các tài liệu tham khảo được nêu trong đó; và Carlson *et al.* (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2292.

Sau khi đã thu được và tạo ra các dòng cây cải dầu ví dụ chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế, màu vỏ hạt sẫm màu nay có thể được chuyển một cách dễ dàng cùng với các đặc tính thành phần hạt mong muốn vào loài *Brassica* khác, theo các kỹ thuật nhân giống thực vật thông thường như được nêu trên. Ví dụ, màu vỏ hạt sẫm màu nay có thể được chuyển một cách dễ dàng cùng với các đặc tính thành phần hạt mong muốn vào các giống cây trồng *B. rapa* có trên thị trường, ví dụ và không chỉ giới hạn ở, Tobin, Horizon, và Colt. Cần hiểu rằng màu hạt sẫm màu không cần phải chuyển cùng với các đặc tính khác của hạt.

Khi đã có một trong số các giống cây trồng ví dụ để bắt đầu, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xử lý các lợi ích cụ thể tạo ra bởi giống cây trồng theo một số cách mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Ví dụ, protein dầu của hạt có trong giống cây trồng ví dụ có thể được đưa vào giống cây trồng *B. napus* mong muốn trong nông nghiệp khác theo các kỹ thuật nhân giống thực vật thông thường bao gồm thụ phấn chéo và chọn lọc thế hệ con, ví dụ, trong đó chất mầm nguyên sinh của giống cây trồng ví dụ này được kết hợp vào giống cây trồng mong muốn trong nông nghiệp khác.

Các phương án cụ thể có thể bao gồm các giống cây trồng ví dụ thuộc *B. napus*, cũng như các giống cây trồng về cơ bản có nguồn gốc từ đó về cơ bản thu được từ ít nhất một trong số các giống cây trồng được nêu ví dụ. Ngoài ra, các phương án theo sáng chế có thể bao gồm thực vật thuộc ít nhất một trong số các giống cây trồng được nêu ví dụ, thực vật thuộc giống cây trồng về cơ bản có nguồn gốc từ đó như vậy, và/hoặc cây cải dầu được tái sinh thực vật hoặc mô (bao gồm hạt phấn, hạt, và các tế bào) tạo ra từ đó.

Chất liệu thực vật có thể chọn lọc là có khả năng tái tạo, ví dụ, hạt, tiểu bào tử, noãn, hạt phấn, phần sinh dưỡng, và tiểu bào tử. Nhìn chung, các tế bào thực vật như vậy có thể được chọn từ giống cây trồng *Brassica* bất kỳ, bao gồm các giống có các tính trạng nông nghiệp mong muốn.

Các kỹ thuật tái tạo là đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chuyên gia có thể lựa chọn ban đầu các tế bào có khả năng tái tạo (*ví dụ*, hạt, tiểu bào tử, noãn, hạt

phần, và phần sinh dưỡng) từ thực vật hoặc giống chọn lọc. Tuy ý, các tế bào này có thể được xử lý gây đột biến. Sau đó, có thể phát triển thực vật từ tế bào bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tạo, bón phân, và/hoặc nuôi trồng dựa trên loại tế bào (và phụ thuộc vào liệu chúng có được tạo đột biến hay không). Việc xử lý thực vật hoặc hạt, hoặc bộ phận của chúng, có thể dẫn đến tạo ra các giống cây trồng về cơ bản có nguồn gốc từ đó.

Theo một số phương án, các đặc tính thành phần hạt mong muốn thể hiện bởi thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế có thể được đưa vào thực vật có nhiều tính trạng mong muốn bổ sung theo cách không phụ thuộc vào màu của hạt, để tạo ra thực vật vừa có các đặc tính thành phần hạt mong muốn vừa có nhiều tính trạng mong muốn. Quá trình đưa các đặc tính thành phần hạt mong muốn vào thực vật có một hoặc nhiều tính trạng mong muốn theo cách không phụ thuộc vào màu của hạt được đề cập đến như là việc “chồng chất” các tính trạng này. Trong một số ví dụ, chồng chất các đặc tính thành phần hạt mong muốn với nhiều tính trạng mong muốn có thể dẫn đến cải thiện hơn nữa các đặc tính thành phần hạt. Trong một số ví dụ, việc chồng chất các đặc tính thành phần hạt mong muốn với nhiều tính trạng mong muốn có thể tạo ra cây cải dầu có các đặc tính thành phần hạt mong muốn, ngoài ra còn có một hoặc nhiều (ví dụ, tất cả) trong số nhiều tính trạng mong muốn.

Ví dụ về các tính trạng mà có thể mong muốn để kết hợp với các đặc tính thành phần hạt mong muốn bao gồm, ví dụ và không chỉ giới hạn ở: gen kháng bệnh thực vật (Xem, ví dụ, Jones *et al.* (1994) Science 266:789 (gen *Cf-9* của cây cà chua cho tính kháng với *Cladosporium fulvum*); Martin *et al.* (1993) Science 262:1432 (gen *Pto* của cây cà chua cho tính kháng với *Pseudomonas syringae*); và Mindrinos *et al.* (1994) Cell 78:1089 (gen *RSP2* cho tính kháng với *Pseudomonas syringae*)); gen mang lại tính kháng loài gây hại; protein của *Bacillus thuringiensis*, dẫn xuất của nó, hoặc polypeptit tổng hợp được tạo mô hình trên đó (Xem, ví dụ, Geiser *et al.* (1986) Gene 48:109 (gen Bt δ -nội độc tố; các phân tử ADN mã hoá δ -nội độc tố có thể được mua từ American Type Culture Collection (Manassas, VA), ví dụ, với các số truy cập ATCC số 40098; 67136; 31995; và 31998)); lectin (Xem, ví dụ, Van Damme *et al.* (1994) Plant Molec. Biol. 24:25 (*Clivia miniata* mannose-binding lectin genes)); protein gắn kết với vitamin, ví dụ, avidin (Xem công bố đơn quốc tế US93/06487 (sử dụng avidin và chất tương đồng avidin như là chất diệt ấu trùng chống côn trùng loài gây hại)); chất ức chế enzym; chất ức chế proteaza hoặc

proteinaza (*Xem, ví dụ, Abe et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:16793 (chất ức chế xystein proteinaza cây lúa); Huub et al. (1993) Plant Molec. Biol. 21:985 (chất ức chế I proteinaza cây thuốc lá; và patent Mỹ số 5,494,813); chất ức chế amylaza (Xem Sumitani et al. (1993) Biosci.Biotech.Biochem. 57:1243 (chất ức chế alpha-amylaza của *Streptomyces nitrosporeus*)); hormon hoặc chất dẫn dụ pheromone đặc hiệu côn trùng, ví dụ, ecđysteroit hoặc hormon ở người trẻ tuổi, biến thể của chúng, chất bắt chước dựa trên đó, hoặc chất đối kháng hoặc chất chủ vận của chúng (Xem, ví dụ, Hammock et al. (1990) Nature 344:458 (chất gây bất hoạt hormon ở người trẻ tuổi)); peptit hoặc peptit truyền thần kinh đặc hiệu côn trùng phá vỡ quá trình sinh lý của loài gây hại ảnh hưởng (Xem, ví dụ, Regan (1994) J. Biol. Chem. 269:9 (thụ thể hormon lợi tiểu côn trùng); Pratt et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 163:1243 (allostatin từ *Diploptera punctata*); patent Mỹ số 5,266,317 (các độc tố thần kinh gây tê liệt đặc hiệu côn trùng)); nọc độc đặc hiệu côn trùng tạo ra tron tự nhiên ở rắn, ong bắp cày hoặc sinh vật khác (Xem, ví dụ, Pang et al. (1992) Gene 116:165 (peptit gây độc côn trùng ở con bò cạp)); enzym chịu trách nhiệm cho sự siêu tích tụ monoterpen, sesquiterpen, steroid, axit hydroxami, dẫn xuất phenylpropanoid hoặc phân tử phi protein khác với hoạt tính trừ côn trùng; enzym tham gia vào quá trình cải biến, bao gồm cải biến sau dịch mã, của phân tử có hoạt tính sinh học, ví dụ, enzym phân hủy đường; enzym phân giải protein; enzym lipid; nucleaza; xyclaza; transaminaza; esteraza; hydrolaza; phosphataza; kinaza; phosphorylaza; polymeaza; elastaza; chitinaza; hoặc glucanaza, ở cả dạng tự nhiên hoặc tổng hợp (Xem công bố đơn quốc tế WO 93/02197 (gen callaza); các phân tử ADN chứa trình tự mã hoá chitinaza (ví dụ, từ ATCC, với số truy cập 39637 và 67152); Kramer et al. (1993) Insect Biochem. Molec.Biol. 23:691 (chitinaza của sâu sùng cây thuốc lá); và Kawalleck et al. (1993) Plant Molec.Biol. 21:673 (gen ubi4-2 polyubiquitin cây mùi tây); phân tử kích thích quá trình tải nạp tín hiệu (Xem, ví dụ, Botella et al. (1994) Plant Molec. Biol. 24:757 (calmodulin); và Griess et al. (1994) Plant Physiol. 104:1467 (calmodulin ở ngô); moment peptit kỵ nước (Xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế WO 95/16776 (các dẫn xuất peptit của Tachyplesin ức chế các sinh bệnh thực vật là nấm); và công bố đơn quốc tế WO 95/18855 (peptit kháng vi sinh vật tổng hợp tạo ra tính kháng bệnh)); permeaza màng, chất tạo kênh, hoặc chất phong bế kênh (Xem, ví dụ, Jaynes et al. (1993) Plant Sci 89:43 (chất tương tự peptit gây tan cecropin-õ giúp thực vật chuyển gen kháng *Pseudomonas solanacearum*); protein xâm nhập virus hoặc độc tố phức hợp*

có nguồn gốc từ đó (*Xem, ví dụ, Beachy et al. (1990) Ann. rev. Phytopathol. 28:451 (tính kháng qua trung gian protein vỏ kháng virus khảm cỏ linh lăng, virus khảm cây dưa chuột, virus vạch cây thuốc lá, virus X cây khoai tây, virus Y cây khoai tây, virus ăn mòn cây thuốc lá, virus trên thuốc lá tobacco rattle virus và virus khảm thuốc lá)*); các kháng thể đặc hiệu côn trùng hoặc chất độc tổ miễn dịch có nguồn gốc từ đó (*Xem, ví dụ, Taylor et al., Abstract #497, Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions (Edinburgh, Scotland) (1994) (làm bất hoạt enzym thông quasản xuất mảnh kháng thể mạch đơn)*); các kháng thể đặc hiệu virus (*Xem, ví dụ, Tavladoraki et al. (1993) Nature 366:469 (gen kháng thể tái tổ hợp bảo vệ chống lại virus)*); protein phát triển-bắt giữ tạo ra trong tự nhiên bởi sinh bệnh hoặc ký sinh (*Xem, ví dụ, Lamb et al. (1992) Bio/Technology 10:1436 (endo- α -1,4-D-polygalacturonasa của nấm tạo thuận lợi cho quá trình hình thành khuẩn lạc nấm và giải phóng chất dinh dưỡng thực vật bằng cách hòa tan homo- α -1,4-D-galacturonaza ở thành tế bào thực vật; Toubart et al. (1992) Plant J. 2:367 (protein ức chế endopolygalacturonaza)*); và phát triển-bắt giữ tạo ra trong tự nhiên bởi thực vật (*Xem, ví dụ, Logemann et al. (1992) Bio/Technology 10:305 (gen làm bất hoạt ribosom ở lúa mạch làm tăng lên tính kháng bệnh do nấm)*).

Các ví dụ thêm nữa về các tính trạng mà có thể mong muốn để kết hợp với các đặc tính thành phần hạt mong muốn bao gồm, ví dụ và không chỉ giới hạn ở: gen cung cấp sức đề kháng với thuốc diệt cỏ (*Lee et al. (1988) EMBO J. 7:1241 (enzym ALS đột biến)*); Miki et al. (1990) Theor. Appl. Genet. 80:449 (enzym AHAS đột biến); các patent Mỹ số 4,940,835 và 6,248,876 (gen 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphat synthaza đột biến (EPSP) tạo ra tính kháng glyphosat); patent Mỹ số 4,769,061 và số truy cập ATCC 39256 (aroA gen); gen glyphosat axetyl transferaza (tính kháng glyphosat); các hợp chất phosphono khác từ các loài *Streptomyces*, bao gồm *Streptomyces hygroscopicus* và *Streptomyces viridichromogenes*) như các loại được mô tả trong đơn xin cấp patent châu Âu số 0 242 246 và DeGreef et al. (1989) Bio/Technology 7:61 (gen glufosinat phosphinothricin axetyl transferaza (PAT) tạo ra tính kháng glyphosat); các axit pyridinoxy hoặc phenoxy proprionic và xyclohexon (tính kháng glyphosat); đơn xin cấp patent châu Âu số 0 333 033 và patent Mỹ số 4,975,374 (gen glutamin synthetaza tạo ra tính kháng với các thuốc diệt cỏ như L-phosphinothricin); Marshall et al. (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435 (Acc1-S1, Acc1-S2, và gen Acc1-S3 tạo ra tính kháng với các axit phenoxy proprionic và xyclohexon, như sethoxydim và haloxyfop); WO 2005012515

(gen GAT tạo ra tính kháng glyphosat); WO 2005107437 (Gen mang lại tính kháng 2,4-D, các thuốc diệt cỏ fop và pyridyloxy auxin); và thuốc diệt cỏ ức chế sinh tổng hợp, như triazin (gen psbA và gs+) hoặc benzonitril (gen nitrilaza) (*Xem, ví dụ, Przibila et al. (1991) Plant Cell 3:169*) (gen psbA đột biến); trình tự nucleotit cho gen nitrilaza được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,810,648, và các phân tử ADN chứa các gen này hiện có với các số truy cập ATCC số 53435, 67441, và 67442; và Hayes *et al. (1992) Biochem. J. 285:173* (glutathion S-transferaza)).

Các ví dụ thêm nữa về các tính trạng mà có thể mong muốn dùng kết hợp với các đặc tính thành phần hạt mong muốn bao gồm, ví dụ và không chỉ giới hạn ở, gen tạo ra hoặc đóng góp vào tính trạng làm tăng giá trị, ví dụ, thay đổi quá trình trao đổi chất axit béo (*Xem, ví dụ, Knultzon et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:2624* (gen đổi nghĩa của stearyl-ACP desaturaza làm tăng hàm lượng axit stearic trong thực vật)); làm giảm hàm lượng phytat (*Xem, ví dụ, Van Hartingsveldt et al. (1993) Gene 127:87* (gen phytaza ở *Aspergillus niger* làm tăng sự phân hủy phytat, tăng thêm phosphat tự do vào thực vật được biến nạp); và Raboy *et al. (1990) Maydica 35:383* (nhân dòng vô tính và đưa trở lại ADN liên quan đến alen chịu trách nhiệm cho các đột biến ở cây ngô có hàm lượng của axit phytic thấp)); và biến đổi thành phần hydrat cacbon do, ví dụ, biến nạp thực vật bằng gen mã hoá enzym làm thay đổi kiểu tạo nhánh tinh bột (*Xem, ví dụ, Shiroza et al. (1988) J. Bacteriol. 170:810* (gen fructosyltransferaza đột biến ở *Streptococcus*); Steinmetz *et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 20:220* (gen levansucrase); Pen *et al. (1992) Bio/Technology 10:292* (ổ-amylase); Elliot *et al. (1993) Plant Molec. Biol. 21:515* (gen invertaza cây cà chua); Sogaard *et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:22480* (gen ỏ-amylaza cây lúa mạch); và Fisher *et al. (1993) Plant Physiol. 102:1045* (enzym II tạo mạch nhánh tinh bột ở nội nhũ ngô)).

Tất cả các tài liệu tham khảo, bao gồm các công bố, patent, đơn patent viện dẫn trong bản mô tả này được kết hợp vào bản mô tả này theo cách viện dẫn, nếu như chúng không phải là không phù hợp với chi tiết được nêu cụ thể trong bản mô tả này và được kết hợp là mỗi tài liệu được kết hợp đơn lẻ và cụ thể vào bản mô tả này theo cách viện dẫn một cách toàn bộ.

Các tài liệu tham khảo được bàn luận trong bản mô tả này được đưa ra chỉ nhằm mục đích bộc lộ trước ngày nộp đơn này. Bản mô tả này hoàn toàn không được coi là các tác giả sáng chế không có quyền nêu ra trước bộc lộ như vậy bởi vì sáng chế trước đó.

Các ví dụ sau đây được nêu ra để minh họa một số đặc điểm và/hoặc khía cạnh cụ thể của sáng chế được yêu cầu bảo hộ. Các ví dụ này không được xem là giới hạn bộc lộ ở các dấu hiệu hoặc khía cạnh cụ thể được mô tả.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Hàm lượng dinh dưỡng trung bình và giá trị của bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao (ECM) và bột cải dầu thông thường.

Tiến hành một số nghiên cứu phân tích và chức năng trong các năm từ 2009 đến 2012 để đánh giá thành phần dinh dưỡng và giá trị của các dòng và cây lai ECM theo sáng chế. Các thử nghiệm được thực hiện trên hạt nguyên không được xử lý, bột được xử lý một phần và được xử lý bột hoàn toàn để đánh giá các tác động có thể có của quá trình xử lý lên thành phần và giá trị dinh dưỡng. Các mẫu được phân tích ở Universities of Illinois, Missouri, Georgia và Manitoba. Thông tin về thành phần này được sử dụng để ước tính giá trị năng lượng của bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao so với bột cải dầu thông thường bằng cách sử dụng phương trình dự đoán tiêu chuẩn. Đánh giá sinh học của các mẫu này về năng lượng và mức tiêu hoá axit amin ở gia cầm được thực hiện ở Universities of Illinois và Georgia. Việc đánh giá sinh học các mẫu về năng lượng và mức tiêu hoá axit amin ở lợn được thực hiện ở University of Illinois. Tóm tắt sự khác biệt về thành phần dinh dưỡng giữa các dòng ECM (khoảng hoặc trung bình) và bột cải dầu thông thường được trình bày ở Bảng 1. Chi tiết về các quy trình và các nghiên cứu liên quan được phác thảo ở các ví dụ sau đây.

Bảng 1. Hàm lượng dinh dưỡng trung bình của bột cải dầu ECM và bột cải dầu thông thường

Chất dinh dưỡng được thể hiện là (88% chất khô, 3% dầu)	ECM	Bột cải dầu thông thường
Chất khô, %	88	88
Protein, %	43-44 (44)	37
Chất béo, %	3	3
Tro, %	7,2	6,7
Phospho, %	1,1-1,4 (1,3)	1,0
Phospho tiêu hóa được, %	0,43	0,33
ADF, %	12-15 (14)	19
- Lignin/polyphenol, %	3-5 (4)	6
- Xenluloza, %	4-5	5-6
NDF %	17-22	25
Các đường, %	7	7
Lysin, %	2,46	2,07
Lysin, % protein thô	5,6	5,6
Mức độ sẵn sàng của lysin ở gia cầm, TAAA %	84	82
Mức độ tiêu hoá lysin ở lợn, SID %	76	72
Gia cầm ME**, kcal/kg	2200	2000
Lợn NE**, kcal/kg	1800	1600

* Số ở trong ngoặc là số trung bình

** Số được dự đoán từ thành phần dinh dưỡng

Các dòng ECM này thể hiện một số cải thiện ở mức phân biệt được về thành phần dinh dưỡng có giá trị làm thức ăn cho động vật. Như được mô tả trong Bảng 1, ECM có lượng protein cao hơn khoảng 7% điểm so với bột cải dầu thông thường. Ngoài ra, cân bằng của axit amin thiết yếu (theo phần trăm protein) được duy trì ở lượng protein cao hơn. Độ tiêu hoá axit amin trong ECM bởi gia cầm và lợn ít nhất là

tốt như bột cải dầu thông thường, và axit amin quan trọng là lysin dường như có độ tiêu hoá hơn cao hơn. Các dòng ECM này cho thấy có hàm lượng thành phần xơ trong thành tế bào và vỏ ngoài thấp hơn, cụ thể khoảng 2% điểm thấp hơn hàm lượng của lignin/polyphenol, 1% điểm thấp hơn xenluloza, 3% điểm thấp hơn ADF còn lại (3% điểm), và mức ADF 5% điểm thấp hơn.

Hàm lượng protein cao hơn và hàm lượng thành phần xơ thấp hơn có mối liên hệ với năng lượng sinh học được tăng lên khoảng 10% ở các dòng ECM này. Các dòng này cũng cho thấy hàm lượng phospho cao hơn, là một chất dinh dưỡng đất tiền để bổ sung vào thức ăn cho động vật. Bảng 1.

Ví dụ 2: Các quy trình xử lý bột POS bông màu trắng (WF), LT và HT

hạt ECM và hạt cải dầu thông thường được xử lý ở nhà máy thí nghiệm POS ở Saskatoon, Canada theo các quy trình sau:

NGUYÊN LIỆU

Khoảng 1,5 MT hạt cải dầu dòng ECM thử nghiệm (CL44864) được cung cấp ở POS vào 2/8/2011. Khoảng 3,0 MT hàng hoá hạt cải dầu đối chứng được cung cấp ở POS vào ngày 3/8/2011. Nguồn nguyên liệu cho các chất liệu chính ;à như sau.

Hexan/iso-hexan: Univar, Saskatoon, SK.

Bộ trợ lọc Hyflo Super-cel Filter Aid: Manville Products Corp., Denver, CO.

Khí nitơ: Air Liquide, Saskatoon, SK.

Vải lọc, tờ đơn: Porritts and Spensor, Pointe Claire, PQ.

Giấy lọc, loại màu nâu vàng 55 lb 1138-55: Porritts and Spensor, Pointe Claire, PQ.

Phương pháp xử lý thực vật thí điểm

Giữa các lần xử lý giống cây cải dầu, tất cả thiết bị ở khu xử lý “Primary” được hút chân không hoặc được dọn sạch. Bộ phận chiết không bắt lửa không được tắt đi giữa các thử nghiệm. Tuy nhiên, dây truyền chiết, Schnecken và hệ thống thu hồi dung môi được để cho chạy để làm trống thiết bị giữa các lần nạp các giống cây cải dầu. Bộ phận chân không không được tắt đi nên tất cả hơi được rút về bộ ngưng tụ, được cô

đặc và xả ra vào thùng làm việc dung môi. Quá trình này ngăn không cho nước bị ngưng tụ trong Schnecken và cấm phích băng tải. Các mẫu cây cải dầu được ép/chiết theo trình tự sau:

1. Không chế HT
2. Không chế LT
3. Dòng ECM thí nghiệm (CL44864) LT

Tạo bông tuyết

Quá trình tạo bông tuyết được thực hiện để phá vỡ các tế bào dầu và tạo ra bông tuyết mỏng có diện tích bề mặt lớn để nấu/ép sơ bộ bằng cách chuyển hạt qua dây các ống cuộn trơn. Chiều dày và độ ẩm của bông tuyết được điều chỉnh để làm giảm thiểu lượng chất mịn tạo ra. Lượng chất mịn cao làm cho bã lọc ép có đặc tính thấm dung môi kém.

Hạt cải dầu được tạo bông tuyết bằng cách áp dụng thiết lập khe lăn tối thiểu. Chiều dày bông tuyết thay đổi cho mỗi lô là như sau:

- | | |
|-------------------------------------|----------------|
| 1. Không chế HT | 0,21 – 0,23 mm |
| 2. Không chế LT | 0,19 – 0,23 mm |
| 3. Dòng ECM thí nghiệm (CL44864) LT | 0,21 – 0,23 mm |

Tốc độ cấp liệu được không chế bởi tốc độ ép và vào khoảng 133–150 kg/giờ.

Bông tuyết: Đường kính 14” x chiều rộng 28” với model xay bông tuyết Lauhoff Flakmaster Lauhoff Flakmaster Flaking Mill Model S-28, Serial No. 7801 nhà sản xuất Lauhoff Corporation.

Nấu (xử lý)

Thực hiện quá trình nấu để phá vỡ thêm các tế bào dầu, tạo ra bông tuyết dễ uồn và làm tăng hiệu quả của bộ phận bật ra bằng cách làm giảm độ nhớt của dầu chứa trong đó. Quá trình nấu còn được thực hiện để khử hoạt tính enzym ở trong hạt. Nồi nấu này được gia nhiệt sơ bộ trước khi bắt đầu mỗi lần chạy. Áp suất hơi được điều chỉnh trong quá trình chạy để duy trì nhiệt độ bông tuyết mong muốn.

Nhiệt độ ở khay dùng cho lô không chế HT là như sau:

Khay trên $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$

Khay dưới $97 \pm 3^{\circ}\text{C}$

Nhiệt độ ở các khay cho lô không chế LT cùng với lô LT dòng ECM thử nghiệm (CL44864) là như sau:

Khay trên $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$

Khay dưới $93 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Nồi nấu: Sử dụng nồi nấu hai khay Simon-Rosedown. Mỗi ngăn có chiều cao 36 cm (chiều cao làm việc 21 cm) và đường kính 91 cm, và được trang bị cần quét để khuấy trộn chất liệu. Sử dụng hơi nước trên vỏ bọc để gia nhiệt khô; hơi nước trực tiếp có thể được cho vào các chất trong thùng. Nồi nấu được lắp trên máy ép kiểu vít để cấp thức ăn gia súc trực tiếp.

Ép

Quá trình ép loại bỏ khoảng 2/3 lượng dầu và tạo ra bã lọc ép thích hợp để chiết tách dung môi. Bã lọc ép này đòi hỏi phải chịu được lực ép để được giữ trong bộ phận chiết và có độ xốp để dễ chuyển khối và làm khô. Hạt được tạo bông tuyết và được nấu hạt được ép bằng cách sử dụng bộ ép sơ bộ Simon-Rosedown.

Dầu ép thô được thu gom trong thùng.

Bộ ép sơ bộ: là máy ép kiểu vít Simon-Rosedowns đường kính 9,5 cm chiều dài 94 cm. Tốc độ quay của vít khi vận hành là 17 vòng/phút được sử dụng.

Chiết tách dung môi và tái solvat hoá dung môi

Quá trình chiết tách bằng dung môi là cho bã lọc ép tiếp xúc với hexan để tách loại dầu ra khỏi khối bã lọc ép. Có hai cơ chế xảy ra trong quá trình vận hành: chiết dầu vào dung môi, và rửa cặn bã (chất rắn hexan) bằng mỡ hỗn độn yếu dần (hexan-dầu). Chiết tách thường là quá trình liên tục ngược dòng.

Bã lọc ép không chế HT cây cải dầu được chiết bằng iso-hexan/hexan với tổng thời gian lưu khoảng 90 phút (Vòng trong thành vòng ngoài), tỷ số dung môi so với

chất rắn khoảng 2,5:1 (w:w) và nhiệt độ của khối hỗn độn là $52 \pm 5^{\circ}\text{C}$. (Tốc độ cấp liệu bã lọc ép cây cải dầu là vào khoảng 90 kg/giờ ở thời gian lưu 90 phút và dung môi tốc độ chảy là 220 ± 10 kg/giờ.).

Mẫu bông màu trắng (WF) cây cải dầu hàng hoá được loại ra trước khi loại dung môi và làm khô trong không khí.

Dầu thô này được khử dung môi trong thiết bị bay hơi màng rơi và thiết bị cạo hơn nước.

Quá trình khử solvat hoá cặn bã (chất rắn hexan) được thực hiện trong thiết bị xoáy vít Schnecken có lớp vỏ chứa hơi và bộ phận đun nóng khử dung môi 2 khay. Hơi rây được cho vào khay DT trên cùng. Nhiệt độ mục đích ở các khay là như sau:

Chỗ thoát Schnecken:	$<60^{\circ}\text{C}$
Khay khử dung môi:	$102 \pm 3^{\circ}\text{C}$
Khay nướng:	$102 \pm 3^{\circ}\text{C}$

Lô LT bã lọc ép không chế LT và dòng ECM thử nghiệm (CL44864) cây cải dầu này được chiết bằng iso-hexan/hexan bằng cách sử dụng tổng thời gian lưu khoảng 110 phút (từ vòng trong ra vòng ngoài), tỷ số dung môi so với chất rắn vào khoảng 2,5:1 (w:w) và nhiệt độ khối hỗn độn là $52 \pm 5^{\circ}\text{C}$. (Tốc độ cấp liệu bã lọc ép cải dầu là khoảng 80 kg/giờ ở thời gian lưu 110 phút và tốc độ chảy dung môi là 220 ± 10 kg/giờ).

Mẫu của dòng ECM thử nghiệm bông màu trắng (WF) được loại ra trước khi khử solvat hoá, và làm khô trong không khí.

Dầu thô được khử solvat hoá trong thiết bị bay hơi màng rơi và thiết bị cạo hơn nước.

Quá trình khử solvat hoá cặn bã (chất rắn hexan) được thực hiện trong vít Schnecken có áo bọc hơi nước và bộ phận đun nóng khử dung môi 2 khay. Hơi sục được cho vào khay DT ở trên. Nhiệt độ đích ở các khay này là như sau:

đường ra Schnecken:	$<60^{\circ}\text{C}$
Khay khử dung môi:	$93 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Khay nướng:	$93 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Bộ phận chiết: Tất cả các bộ phận chiết bằng thép không gỉ Crown Iron Works Loop Extractor (Type II). Tấm chiết tách có chiều rộng 20,3 cm x độ sâu 12,7 cm với chiều dài 680 cm. Ngoài ra, thiết bị này bao gồm quá trình khử solvat hỗn hợp bằng cách sử dụng thiết bị bay hơi màng rơi và thiết bị cạo hơn nước và quá trình khử solvat hoá cặn bã (chất rắn cùng với dung môi) bằng cách sử dụng vít Schnecken có áo bọc hơi nước và bộ phận đun nóng khử dung môi 2 khay. Dung môi thu hồi được thu gom và được sử dụng lại.

Làm khô trong chân không

Quá trình làm khô trong chân không được thực hiện để làm khô bột cải dầu xử lý bằng LT đã được khử chất béo đến độ ẩm <12%.

Chỉ có lô bột cải dầu đã được khử chất béo cần đến bước làm khô là lô không chế LT. Khoảng 225 kg bột đã được khử chất béo được nạp vào Thiết bị sấy khô phản ứng Littleford Reactor Dryer. Sau đó, bột này được gia nhiệt đến nhiệt độ $75 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong điều kiện chân không HG 10-15". Quá trình lấy mẫu bột cho phân tích độ ẩm bắt đầu ở nhiệt độ khoảng 60°C và cách nhau 15 phút cho đến khi độ ẩm <12%. Sau đó, bột này được thả vào túi đựng. Quá trình trên được lặp lại cho đến khi tất cả số bột được làm khô.

Thiết bị sấy khô chân không: 600 Lít Model FKM600-D (2Z) Littleford Reactor, serial #5132, Littleford Day, Florence, KY.

Quá trình xay bằng búa

Quá trình xay bằng búa được thực hiện để tạo ra cỡ hạt đồng nhất.

Bột đã được làm khô được xay bằng búa bằng cách sử dụng màn 8/64". Máy nghiền búa này được làm sạch chân không giữa các lô bột. Bột này được bao gói vào trống xơ và được bảo quản ở nhiệt độ môi trường cho đến khi chuyển hàng.

Trật tự mà theo đó bột cải dầu được xay bằng búa là như sau:

1. Không chế HT.
2. Dòng ECM thí nghiệm (CL44864) LT.

3. Không chế LT.

Máy nghiền búa: Prater Industries, Model G5HFSI, serial #5075, Chicago, IL

Ví dụ 3: Quá trình tạo bông màu trắng Indianapolis

Hạt cải dầu theo sáng chế có thể được xử lý để tạo ra cây cải dầu bông màu trắng bằng cách áp dụng quy trình như được mô tả ban đầu trong Bailey's Industrial Oil & Fat Products (1996), 5th Ed., Chapter 2, Wiley Interscience Publication, New York, New York.

Để chiết dầu từ hạt cải dầu, trước hết hạt cải dầu được tạo bông tuyết bằng cách nghiền cafe và xử lý nhiệt trong lò ở nhiệt độ $85^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ trong thời gian ít nhất 20 phút. Sau khi xử lý bằng nhiệt, hạt đã được nghiền này được ép bằng cách sử dụng máy ép Taby Press Type-20A Press (Toby Skeppsta, ệrebro, Sweden). Bã lọc ép thu được từ Taby Press này được chiết bằng dung môi để tách loại dầu dư còn lại bất kỳ.

Sau đó, bã lọc ép từ bước ép hạt có dầu được chiết bằng dung môi để tách loại và thu gom dầu dư còn lại bất kỳ. Bã lọc ép này được cho vào ống lót làm bằng thép không gỉ được đặt trong bộ phận chiết Soxhlet™ được tạo ra theo cách thông thường từ LaSalle Glassware (Guelph, ON). Hexan có thể được sử dụng làm dung môi chiết tách và hệ thống chiết Soxhlet™ được để cho vận hành trong thời gian 9-10 giờ. Sau đó, bã lọc ép đã được chiết bằng dung môi này được bỏ ra khỏi ống lót và được trải lên khay đến chiều dày bã lọc ép nhỏ hơn một in. Bã lọc ép đã được chiết bằng dung môi này được để tách dung môi trong không khí trong thời gian 24 giờ trước khi nghiền. Sau đó, bông màu trắng đã được tách dung môi được nghiền bằng cách sử dụng, ví dụ, Robot Coupe R2N Ultra B (Jackson, MS).

Ví dụ 4: Mẫu phân tích

Phân tích hoá học và chất dinh dưỡng ECM và các mẫu cây cải dầu thông thường có thể được thực hiện theo các cách khác nhau bằng cách sử dụng các phương pháp được phác thảo sau đây. Các mẫu bột cải dầu được phân tích về chất khô (phương pháp 930.15; AOAC International. 2007. Official Methods. Of Analysis of AOAC Int. 18th ed. Rev. 2. W. Hortwitz and G. W. Latimer Jr., eds. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.,

Gaithersburg. MD. (sau đây được gọi là “AOAC Int., 2007”), tro (phương pháp 942.05; AOAC Int.), và GE bằng thiết bị đo màu bom (Model 6300, Parr Instruments, Moline, IL). AOAC International (2007) Official Methods of Analysis of AOAC Int., 18th ed. Rev. 2., Hortwitz and Latimer, eds. Assoc. Off. Anal. Chem. Int., Gaithersburg. MD. Dịch chiết ete được thủy phân bằng axit (AEE) được xác định bằng phương pháp thủy phân bằng axit bằng cách sử dụng 3N HCl (Sanderson) tiếp đó là chiết tách chất béo thô bằng ete dầu mỏ (phương pháp 954.02; AOAC Int.) trên bộ phân tích tự động Soxtec 2050 (FOSS North America, Eden Prairie, MN). Sanderson (1986), "A new method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fats," các trang 77-81, trong Recent Advances in Animal Nutrition, Haresign and Cole, eds. Butterworths, London, U.K. Protein thô được đo bằng phương pháp đốt (phương pháp 990.03; AOAC Int.) trên thiết bị protein/nitơ ống N nhanh nguyên tố (Elementar Americas Inc., Mt. Laurel, NJ); axit amin theo phương pháp 982.30 E (A, B, và C) [AOAC Int.]; xơ thô theo phương pháp 978.10 (AOAC Int.); ADF và lignin theo phương pháp 973.18 (AOAC Int.); và NDF theo Holst (Holst, D. O. 1973. Thiết bị lọc Holst cho phân tích xơ không tan Van Soest. J. AOAC. 56:1352-1356). Profin đường (glucoza, fructoza, sucroza, lactoza, maltoza) theo Churms (Churms, 1982, Carbohydrates in Handbook of Chromatography. Zweig and Sherma, eds. CRC Press, Boca Raton, FL.), và Kakehi và Honda (1989. Silyl ethers of carbohydrates. Page 43-85 in Analysis of Carbohydrates by GLC and MS. C. J. Biermann and G. D. McGinnis, eds. CRC Press, Boca Raton, FL). Các oligosacarit (rafinoza, stachyoza, verbascoza) được phân tích theo Churms; các chất khoáng (Ca, P, Fe, Mg, Mn, Cu, Na, K, S, Mo, Zn, Se, Co, Cr) bằng phương pháp phổ phát xạ quang học huỳnh quang kết hợp cảm ứng [phương pháp 985.01 (A, B, và C); AOAC Int.], và phytat theo Ellis et al (1977. Xác định định lượng phytat với sự có mặt của lượng phosphat vô cơ cao. *Anl.Biochem.* 77:536-539.)

Ví dụ 5: Các kết quả phân tích cơ sở trên các mẫu bột màu trắng Indianapolis bột cải dầu ECM và bột cải dầu thông thường

Thành phần dinh dưỡng của bột cải dầu ECM và bột cải dầu thông thường được nướng được điều chế ở nhà máy thử nghiệm. Một số dòng ECM (44864, 121460,

121466, và 65620) được xử lý ở phòng thí nghiệm của Dow AgroSciences ở Indianapolis bằng cách áp dụng quy trình tương tự với quy trình xử lý bột cải dầu thương mại mà không có bước cuối cùng là khử dung môi/nướng sau khi chiết tách dầu bằng dung môi ra khỏi hạt. Quy trình này và các mẫu thu được được gọi là “bông màu trắng Indianapolis”. Các thông số xử lý được phác thảo ở Ví dụ 3. Các mẫu bông màu trắng Indianapolis ECM này được thử nghiệm ở các trường đại học Universities of Illinois và Missouri và kết quả được trình bày ở các Bảng 2a, 2b, và 2c. Biện pháp xử lý bột cải dầu là bột cải dầu được điều chế công nghiệp được nướng. Các giá trị được thể hiện là tính trên chất khô, nhưng không bao gồm dầu.

Bảng 2a. Thành phần dinh dưỡng của các mẫu bông màu trắng bột cải dầu Indianapolis ECM so sánh với bột cải dầu thông thường

Thành phần, % DM, bao gồm dầu	44864 (2010)	44864 (2011)	121460 (2011)	121466 (2011)	65620 (2011)	Bột cải dầu thông thường	ECM trung bình	ECM - Bột cải dầu
Protein thô	49,4	49,4	50,3	50,1	49,5	43,0	49,7	6,7
Chất béo	3,1	2,6	3,2	3,4	3,1	4,3	3,1	-1,2
Tro	8,4	8,3	7,7	8,3	7,8	7,4	8,1	0,7
Các đường đơn	4,3	0,5	0,6	0,6	1,1	0	1,4	1,4
Sucroza	4,6	8,3	7,6	5,9	7,7	8,1	6,8	-1,3
Các oligosacarit	0,5	3,0	4,0	3,4	2,8	2,8	2,7	-0,1
Tinh bột	0,1	0	0	0	0	0	0	0
NDF	20,7	19,5	20,3	21,2	20,0	33,0	20,3	-12,7
ADF	15,3	14,6	15,6	16,4	14,6	19,0	15,3	-3,7
Lignin & polyphenol	4,5	4,1	5,2	6,2	4,2	7,2	4,9	-2,3

Các kết quả phân tích trên các mẫu bông màu trắng Indianapolis ECM từ các trường đại học Universities of Illinois và Missouri có kết quả tương tự với dạng nguyên hạt từ University of Manitoba. Các oligosacarit là thấp hơn và các đường đơn là cao hơn ở mẫu 44864 (2010) so với các mẫu ECM khác, bao gồm 44864 được trồng vào năm 2011. Đường như là với mẫu 2010, thực vật trồng dị hoá phần nào sucroza và oligosacarit thành các đường đơn ở gần thời gian thu hoạch.

Protein cao hơn, ADF thấp hơn và lignin & polyphenol thấp hơn được nhận thấy ở các dòng ECM này so với bột cải dầu thông thường, bằng cách sử dụng phương pháp của bông màu trắng Indianapolis, là tương tự với các kết quả thu được với dạng nguyên hạt. Giá trị 33% NDF cho bột thương mại là ở đầu mút cao hơn của khoảng thông thường.

Bảng 2b. Thành phần axit amin (% protein thô) của các mẫu so sánh bông màu trắng Indianapolis ECM với bột cải dầu thông thường

Thành phần, % DM, bao gồm dầu, % CP	44864 (2010)	44864 (2011)	12146 0 (2011)	12146 6 (2011)	65620 (2011)	Bột cải dầu thông thường	ECM trung bình	ECM-Bột cải dầu thông thường
Protein thô	49,4	49,4	50,3	50,1	49,5	43,0	49,7	6,7
Axit amin thiết yếu								
Arginin	5,63	5,67	6,04	5,95	6,02	5,78	5,86	0,08
Histidin	2,53	2,60	2,55	2,52	2,64	2,68	2,57	-0,11
Isoloxin	3,56	3,81	3,83	3,70	3,77	4,15	3,73	-0,42
Loxin	6,50	6,50	6,91	6,76	6,84	7,01	6,70	-0,31
Lysin	5,49	5,69	5,54	5,37	5,90	5,37	5,60	0,23*
Metionin	1,80	1,87	1,89	1,81	1,94	1,99	1,86	-0,13*
Phenylalanin	3,76	3,68	3,93	3,87	3,91	3,98	3,83	-0,15
Threonin	3,82	3,82	4,17	4,01	4,20	4,12	4,01	-0,11*
Tryptophan	1,27	1,23	1,29	1,35	1,19	1,23	1,27	0,04*
Valin	4,66	4,78	4,87	4,71	4,80	5,21	4,76	-0,45
Axit amin không thiết yếu								

Thành phần, % DM, bao gồm dầu, % CP	44864 (2010)	44864 (2011)	12146 0 (2011)	12146 6 (2011)	65620 (2011)	Bột cải dầu thông thường	ECM trung bình	ECM-Bột cải dầu thông thường
Alanin	4,07	3,98	4,16	4,05	4,25	4,32	4,10	-0,22
Axit aspartic	6,77	6,24	7,35	7,06	6,82	6,87	6,85	-0,02
Xystin	2,35	2,47	2,26	2,20	2,53	2,30	2,36	0,06
Axit glutamic	16,57	17,19	16,92	16,54	17,54	16,84	16,95	0,11
Glyxin	4,50	4,63	4,85	4,76	4,89	4,98	4,73	-0,25
Prolin	5,41	5,80	5,92	5,78	5,98	6,20	5,78	-0,42
Serin	3,76	3,57	3,75	3,65	4,04	3,54	3,75	0,21
Tyrosin	2,66	2,47	2,73	2,70	2,77	2,83	2,67	-0,16

* Được xem như là axit amin thiết yếu giới hạn chính ở thức ăn gia súc cho gia cầm và lợn

Như được nhận thấy với nguyên hạt, các kết quả trong Bảng 2b cho thấy là thành phần axit amin (theo phần trăm protein thô) là tương tự nhau với cả hai mẫu bông màu trắng Indianapolis ECM và bột thương mại cải dầu. Kết quả này cho thấy là khi lượng protein ở các dòng ECM này được tăng lên, thì các axit amin quan trọng cũng tăng lên theo tỷ lệ.

Bảng 2c. Thành phần khoáng chất của các mẫu so sánh bông màu trắng Indianapolis ECM với bột cải dầu thông thường

Thành phần, cơ sở DM, bao gồm dầu	44864 (2010)	44864 (2011)	121460 (2011)	121466 (2011)	65620 (2011)	Bột cải dầu thông thường	ECM trung bình	ECM – Bột cải dầu thông thường
Canxi, %	0,83	0,84	0,75	0,74	0,76	0,80	0,78	-0,02
Phospho, %	1,50	1,49	1,39	1,50	1,42	1,14	1,46	0,32
Axit phytic, %	4,25	4,16	4,05	4,52	3,81	2,96	4,16	1,20
Natri, %	0,001	0,003	0,003	0,002	0,002	0,13	0,002	-0,13
Kali, %	1,65	1,67	1,36	1,43	1,45	1,32	1,51	0,19
Lưu huỳnh, %	-	0,97	0,87	0,85	0,87	0,83	0,89	0,06
Magie, %	0,67	0,69	0,64	0,62	0,68	0,62	0,66	0,04
Sắt, mg/kg	94	124	93	88	98	150	99	-51
Mangan, mg/kg	56	83	98	85	77	64	80	16
Coban, mg/kg	0,3	0,1	0,1	2,7	3,2	1,3	1,3	0
Đồng, mg/kg	9	5	5	6	5	6	6	0
Selen, mg/kg	0,09	0,65	0,43	0,44	0,87	0,23	0,50	0,27
Kẽm, mg/kg	60	52	58	61	59	59	58	-1

Hàm lượng khoáng chất của các mẫu bông màu trắng Indianapolis ECM là tương tự với bột cải dầu thông thường chỉ khác hai giá trị đối với: phospho và natri. Như nhận thấy với các kết quả được thực hiện ở University of Manitoba cho nguyên hạt, hàm lượng phospho ở các dòng ECM này dường như là thường cao hơn bột cải dầu thông thường. Lượng natri nhiều hơn ở bột cải dầu thông thường chắc chắn là do natri được bổ sung vào trong quá trình xử lý cải dầu thông thường.

Ví dụ 6: Xử lý ECM ở nhà máy thí nghiệm POS ở Saskatoon, Canada để tăng xử lý thương mại

Trong quá trình chuẩn bị đánh giá giá trị thức ăn cho động vật của ECM, đã xác định được rằng các mẫu bột cải dầu phải được điều chế ở điều kiện xử lý thương mại, do có ảnh hưởng của quá trình xử lý đến giá trị dinh dưỡng. Kết quả là, các mẫu được xử lý tại Nhà máy thí nghiệm POS ở Saskatoon. Hai điều kiện xử lý được áp dụng: nhiệt độ thường (HT) trong thiết bị khử dung môi/thiết bị nướng và nhiệt độ thấp hơn (LT), để đảm bảo rằng điều kiện xử lý không có ảnh hưởng quá lớn đến giá trị dinh dưỡng. Điều kiện xử lý được áp dụng ở POS được phác thảo ở Ví dụ 2.

Bảng 3. Thành phần dinh dưỡng của bột cải dầu ECM và bột cải dầu thông thường được điều chế ở điều kiện xử lý thương mại mô hình ở Nhà máy thí nghiệm POS ở Saskatoon, Canada. (Các phép phân tích được thực hiện ở Universities of Illinois và Missouri)

Thành phần, theo %	44864 (2010) LT	Bột cải dầu LT	Bột cải dầu HT
Chất khô	90,2	90,3	88,4
Protein thô	44,7	37,0	36,0
Chất béo	3,3	3,3	3,6
Tro	7,9	6,7	6,5
Các đường & Suroza	6,9	7,1	6,7
Các oligosacarit	0,45	1,57	1,55
NDF	20,8	27,0	28,1
ADF	13,8	19,2	19,0
Lignin & polyphenol	4,2	8,2	8,2
Phospho	1,43	1,11	1,06
Lysin	2,41	2,10	2,01
Metionin	0,83	0,72	0,69
Threonin	1,69	1,47	1,42
Tryptophan	0,61	0,47	0,45

Bột được xử lý thử nghiệm cho thành phần tương tự với các mẫu nguyên hạt và các mẫu bông màu trắng Indianapolis, và sự khác biệt giữa mẫu ECM và cây cải dầu thông thường là phù hợp với phân tích như được mô tả trong Bảng 2a và 2b: 7% điểm protein cao hơn, 5% điểm thấp hơn ADF, 4% điểm thấp hơn lignin & polyphenol và 0,35% điểm cao hơn phospho.

Ví dụ 7: Phân tích đầy đủ hạt cải dầu ECM và thông thường không được xử lý

Thành phần dinh dưỡng của hạt cải dầu không được xử lý 5 mẫu nguyên hạt các dòng ECM được sản xuất năm 2010 và 2011 được phân tích ở University of Manitoba.

Các mẫu này được so sánh với mẫu hạt hỗn hợp của Ủy ban chính thức hạt Canada (Canadian Grain Commission: CGC) cho năm sản xuất 2011, theo định nghĩa là chất lượng trung bình của các giống cây cải dầu thương mại hiện tại được trồng ở miền Tây Canada trong vụ mùa đó. Các kết quả về thành phần dinh dưỡng được thể hiện trên lượng chất khô không dầu và được đưa ra trong Bảng 4a và 4b.

Bảng 4a. Thành phần dinh dưỡng của các mẫu hạt ECM so sánh với hạt cải dầu thông thường

Thành phần, % DM, không chứa dầu	44864 (2010)	44864 (2011)	12146 0 (2011)	12146 6 (2011)	65620 (2011)	Thành phần CGC (2011)	ECM trung bình	ECM – Thành phần CGC
Protein thô	52,2	51,5	50,3	51,4	50,2	43,9	51,1	7,2
Tro	9,1	9,2	8,2	8,3	7,8	7,8	8,5	0,7
Các đường đơn	1,8	0,4	0,1	0,1	0,2	0,5	0,5	0,0
Sucroza	5,7	6,4	5,8	5,2	6,5	7,1	5,9	-1,2
Các oligosacarit	0,6	3,3	3,1	3,3	3,6	3,5	2,8	-0,7
Tinh bột	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0
NDF	23,1	20,7	21,9	23,1	20,7	27,2	21,9	-5,3
ADF	15,4	14,2	15,8	17,8	13,7	21,0	15,4	-5,6
Tổng lượng xơ	30,9	28,6	30,1	29,6	29,4	32,5	29,7	-2,8
NSP	21,7	21,0	21,3	19,2	22,1	21,6	21,1	-0,5
Lignin & polyphenol	4,7	4,1	5,0	6,4	3,7	6,8	4,8	-2,0
Glycoprotein	4,4	3,5	3,8	3,9	3,6	4,2	3,9	-0,3
Xenluloza	6,8	4,8	5,8	4,8	5,6	6,2	5,6	-0,6
ADF còn lại, (ADF – lignin - xenluloza)	3,8	5,3	5,1	6,6	4,4	8,0	5,0	-3,0

Hemi-xenluloza (NDF-ADF)	7,7	6,5	6,2	5,3	7,0	6,2	6,5	0,4
Chất xơ thực phẩm (NSP + lignin)	26,5	25,0	26,3	25,6	25,9	28,4	25,8	-2,5
Phospho	1,6	1,4	1,4	1,5	1,3	1,1	1,4	0,3
Phytat Phospho	0,8	0,7	0,8	0,8	0,6	0,6	0,7	0,1
Phospho phi phytat	0,8	0,7	0,6	0,8	0,7	0,5	0,7	0,2
Protein thô, 3% dầu, 88% DM						37,4	43,5	6,1

Các kết quả này cho thấy là sự khác biệt rõ rệt nhất giữa ECM và cây cải dầu thông thường là hàm lượng protein cao hơn. ECM là 7,2% điểm cao hơn về hàm lượng protein (51,1% so với 43,9%) tính trên chất khô không dầu và 6,1% điểm cao hơn (43,5% so với 37,4%) trên cơ sở 88% chất khô 3% dầu (cơ sở thường được dựa trên cho bột cải dầu thương mại). Xem Bảng 4a, 4b. Lượng protein cao hơn dường như là do lượng lignin và polyphenol 2% thấp hơn ở ECM và ADF còn lại (ADF – lignin/polyphenol – xenluloza) 3% thấp hơn. ADF còn lại có thể là kết hợp của các hợp phần glycoprotein và hemi-xenluloza. Thành phần xơ chủ yếu có mặt trong tế bào và vỏ ngoài. Hàm lượng phospho của ECM là gần 30% cao hơn ở cây cải dầu thông thường, và dường như nó được phân bố đều ở các dạng phytat và phi phytat. Phospho là chất dinh dưỡng có giá trị ở thức ăn cho động vật và cho dù là phospho liên kết với phytat không được gia cầm và lợn tiêu hoá tốt, việc sử dụng phổ biến enzym phytaza trong thức ăn cho động vật sẽ chuyển phospho này thành dạng dùng được cho động vật. Bảng 4b cung cấp so sánh tương tự thành phần axit amin ở các mẫu nguyên hạt.

Bảng 4b. Thành phần axit amin (% protein thô) của các mẫu hạt ECM so sánh với hạt cải dầu thông thường

Thành phần, % DM, không chứa dầu, % CP	44864 (2010)	44864 (2011)	121460 (2011)	121466 (2011)	65620 (2011)	Thành phần CGC (2011)	ECM trung bình	Thành phần ECM – CGC
Protein thô	52,2	51,5	50,3	51,4	50,2	43,9	51,1	7,2
Axit amin thiết yếu								
Arginin	5,30	5,94	6,18	6,14	5,91	5,89	5,89	0,01
Histidin	2,90	3,03	3,02	2,94	3,02	3,12	2,98	-0,14
Isoloxin	2,87	3,26	3,51	3,55	3,20	3,23	3,28	0,05
Loxin	5,82	6,36	6,73	6,68	6,33	6,48	6,38	-0,10
Lysin	5,08	5,74	5,49	5,39	5,62	5,80	5,46	-0,34*
Metionin	1,71	1,91	1,81	1,78	1,75	1,80	1,79	-0,01*
Phenylalanin	3,31	3,63	3,86	3,83	3,66	3,68	3,66	-0,02
Threonin	3,82	4,10	4,33	4,23	4,25	4,41	4,15	-0,27*
Tryptophan	-	-	-	-	-	-	-	-
Valin	3,98	4,51	4,75	4,76	4,32	4,42	4,46	0,05
Axit amin không thiết yếu								

Alanin	3,59	3,68	3,97	3,87	3,83	4,00	3,79	-0,21
Axit aspartic	6,71	6,58	7,51	7,39	6,88	7,12	7,01	-0,10
Xystin	2,21	2,42	2,16	2,14	2,33	2,16	2,25	0,09
Axit glutamic	16,09	18,23	18,02	17,84	17,73	17,64	17,58	-0,06
Glyxin	4,29	4,72	4,97	4,90	4,79	4,93	4,74	-0,19
Prolin	6,01	6,40	6,39	6,28	6,34	6,26	6,28	0,03
Serin	4,06	4,30	4,52	4,39	4,51	4,57	4,36	-0,21
Tyrosin	2,23	2,35	2,56	2,59	2,50	2,60	2,45	-0,15

* Được xem như là các axit amin thiết yếu giới hạn chính ở thức ăn gia súc cho gia cầm và lợn

Các kết quả trong Bảng 4b cho thấy là thành phần axit amin (theo phần trăm protein thô) là tương tự nhau giữa bột cải dầu ECM và thương mại. Kết quả này cho thấy là khi hàm lượng protein được tăng lên ở các dòng ECM này, thì các axit amin quan trọng cũng tăng lên.

Ví dụ 8: Mức tiêu hoá axit amin và TME ở gia cầm

Các thử nghiệm năng lượng thuần chuyển hoá được (TME: True Metabolizable Energy) và axit amin thật có sẵn (TAAA: true available amino acid) được phát triển lần lượt vào năm 1976 và 1981, bởi giáo sư Ian Sibbald nông nghiệp Canada ở Ottawa. Do thử nghiệm có bản chất trực tiếp và không gây phân huỷ, các thử nghiệm này đã trở thành các phương pháp được lựa chọn để xác định mức độ sẵn sàng năng lượng và axit amin trong hợp phần thức ăn gia súc cho gia cầm ở nhiều nơi trên thế giới, bao gồm US.

Gà trống non có mũ màu trắng đơn màu (SCWL: single comb white leghorn) trưởng thành được dùng làm động vật thử nghiệm lựa chọn trong các nghiên cứu riêng biệt được thực hiện ở University of Illinois và University of Georgia. Đã biết rằng loài gà này có thời gian thanh thải nhanh trong đường ruột. Bằng cách không cho dùng thức ăn gia súc trong thời gian 24 giờ, thừa nhận một cách đáng tin cậy rằng dải tiêu hoá của đối tượng thử nghiệm đã không còn thực phẩm còn lại được tiêu thụ trước đó.

Mỗi con gà (loài chim) (thường là 8 cá thể cho mỗi lần xử lý) được cho dùng chính xác 35 gam thức ăn gia súc thử nghiệm, được cho trực tiếp vào điều qua ống thông. Các hợp phần có nhiều chất xơ thường được cấp với lượng 25 gam thay vì 35 gam, lượng thể tích cũng tương tự. Sau khi đưa thức ăn qua ống thông, các con chim được cho uống nước, nhưng không cho thức ăn gia súc bổ sung, trong thời gian 40 giờ, trong thời gian đó chất bài tiết được gom số lượng. Sau khi gom, chất bài tiết được làm khô trong lò khí đối lưu, thông thường ở nhiệt độ 80°C. Sau đó, nó được cân và được nghiền để xác định tổng năng lượng (GE) trong thử nghiệm TME, hoặc để xác định hàm lượng axit amin. GE và thành phần axit amin của các hợp phần được xác định tương tự. Khi đã được cân, các mẫu chất bài tiết thường được gom lại và được làm đồng nhất hoá cho một lần xác định GE hoặc axit amin. Khối lượng chất bài tiết cho mỗi con chim thay đổi cao hơn nhiều GE hoặc thành phần axit amin của chất bài tiết

nhất định. Phát hiện này, và chi phí và sự mất thời gian trong việc xác định GE và axit amin khẳng định sự phù hợp ghi gom chất bài tiết.

Độ tiêu hoá được tính toán bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật về năng lượng hoặc thành phần từng axit amin. Ước tính về thất thoát nội sinh GE và axit amin được sử dụng để hiệu chỉnh các số liệu thử nghiệm sơ bộ.

Ví dụ 9: Năng lượng tiêu hoá được ở lợn (DE), năng lượng chuyển hoá được (ME)

DE và ME. Bốn mươi tám lợn thiếu đang lớn (khối lượng ban đầu: 20 kg) sẽ được phân chia vào nghiên cứu thiết kế khối hoàn toàn ngẫu nhiên ở University of Illinois. Các con lợn sẽ được cho dùng 1 trong 6 chế độ ăn, với 8 con lợn cho cùng một khẩu phần ăn. Lợn sẽ được đưa vào lồng trao đổi chất được trang bị bộ cấp thức ăn gia súc và đồ uống núm vú, sàn được lót gỗ hoàn toàn, sàn ngăn, và khay đựng nước tiểu. Thiết kế này sẽ cho phép gom toàn bộ, nhưng riêng rẽ, nước tiểu và phân từ mỗi con lợn.

Lượng thức ăn gia súc được cung cấp mỗi ngày cho mỗi con lợn sẽ được tính toán là 3 lần nhu cầu duy trì năng lượng ước tính (tức là 106 kcal ME cho một kg^{0,75}; NRC, 1998) cho con lợn cho mỗi bản sao và được chia thành 2 bữa ăn bằng nhau. NRC 1998, Nutrient requirements of swine, Tenth Revised Edition. National Academy Press. Washington, DC. Nước có sẵn ở mọi thời điểm. Thử nghiệm sẽ kéo dài 14 ngày. 5 ngày đầu sẽ được xem như là thời kỳ thích ứng với khẩu phần ăn, nước tiểu và phân được gom trong 5 ngày tiếp theo theo quy trình chuẩn sử dụng phương pháp đánh dấu đến đánh dấu (Adeola, O. 2001, Digestion and balance techniques in pigs, các trang 903-916 trong Swine Nutrition. 2nd ed. A. J. Lewis and L. L. Southern, ed. CRC Press, New York, NY. NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington DC.). Các mẫu nước tiểu sẽ được gom trong thùng nước tiểu trên chất bảo quản là 50 ml axit clohydric. Các mẫu phân và 10% nước tiểu gom được sẽ được bảo quản ở nhiệt độ -20°C ngay sau gom. Ở cuối thử nghiệm, các mẫu nước tiểu sẽ được làm tan băng và được trộn trong nhóm động vật và khẩu phần ăn, và mẫu lấy ra sẽ được đem đi phân tích hoá học.

Các mẫu phân sẽ được làm khô trong lò khí đối lưu và được nghiền mịn trước khi phân tích. Các mẫu phân, nước tiểu, và thức ăn gia súc sẽ được phân tích lặp lại hai lần để xác định DM và tổng năng lượng bằng cách sử dụng bom đo nhiệt lượng (Parr Instruments, Moline, IL). Sau khi phân tích hoá học, tổng các giá trị tiêu hoá trong dải sẽ được tính toán về năng lượng trong mỗi khẩu phần ăn bằng cách sử dụng các quy trình được mô tả trước đây (Widmer, M. R., L. M. McGinnis, and H. H. Stein. 2007. Energy, phosphorus, and amino acid digestibility of high-protein distillers dried grains and corn germ fed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* 85:2994-3003.). Lượng năng lượng tồn thất trong phân và trong nước tiểu, lần lượt, sẽ được tính toán, và mức DE và ME ở mỗi trong số 24 khẩu phần ăn sẽ được tính toán (Widmer et al., 2007). DE và ME ở ngô sẽ được tính toán bằng cách chia các giá trị DE và ME cho khẩu phần ăn ngô cho tỷ lệ đi vào của ngô trong khẩu phần ăn này. Sau đó, các giá trị này sẽ được dùng để tính toán tham gia của ngô vào DE và ME trong khẩu phần ăn ngô-bột cải dầu và trong khẩu phần ăn ngô-bột đậu nành khẩu phần ăn, và sau đó DE và ME ở mỗi nguồn bột cải dầu và mẫu bột đậu nành sẽ được tính toán bằng sự khác nhau như được mô tả trước đây (Widmer et al., 2007).

Số liệu sẽ được phân tích bằng cách sử dụng quy trình Proc Mixed Procedure in SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Số liệu thu được cho mỗi khẩu phần ăn và cho mỗi thành phần sẽ được so sánh bằng cách sử dụng ANOVA. Mức đồng nhất của biên độ sẽ khẳng định bằng cách sử dụng quy trình UNIVARIATE trong Proc Mixed. Chế độ ăn hoặc thành phần sẽ là tác động cố định và lợn và bản sao sẽ là các tác động ngẫu nhiên. Trung bình bình phương nhỏ nhất sẽ được tính toán bằng cách sử dụng kiểm định LSD và các giá trị trung bình sẽ được tách riêng bằng cách sử dụng bản thông báo pdiff trong Proc Mixed. Lợn sẽ là đơn vị thử nghiệm cho tất cả các phép tính toán và mức alpha bằng 0,05 sẽ được dùng để đánh giá mức ý nghĩa trong các giá trị trung bình.

Ví dụ 10: Mức tiêu hoá axit amin ở lợn (AID & SID)

AID và SID ở lợn được phân tích trong nghiên cứu tại University of Illinois. Mười hai con lợn thiến đang lớn (khối lượng ban đầu: $34,0 \pm 1,41$ kg) được lắp ống thông chữ T gần ruột hồi ngoại biên và được chia vào được lặp lại thiết kế bình

phương Latin 6 x 6 lắp lại 6 khẩu phần ăn và 6 thời điểm trong mỗi góc vuông. Lợn được nhốt chuồng riêng rẽ trong chuồng 1,2 x 1,5 m trong phòng có điều khiển môi trường. Các chuồng có lớp ván ngoài chắc, sàn được lót gỗ hoàn toàn, và bộ cấp thức ăn và bộ phận uống bằng núm vú được lắp đặt ở mỗi trong số các chuồng này.

Sáu khẩu phần ăn được chuẩn bị. 5 khẩu phần ăn là dựa trên tinh bột ngô, đường, và SBM hoặc bột cải dầu, và SBM hoặc bột cải dầu là nguồn axit amin duy nhất trong các khẩu phần ăn này. Khẩu phần ăn cuối cùng là khẩu phần ăn không có N được sử dụng để ước tính tổn thất trong ruột hồi nội sinh cơ sở của CP và AA. Các vitamin và các chất khoáng được đưa và trong tất cả các khẩu phần ăn để đáp ứng hoặc lớn hơn yêu cầu hiện tại ước tính cho lợn đang lớn (NRC, 1998). Tất cả khẩu phần ăn còn chứa 0,4% oxit cromic như là chất đánh dấu không tiêu hoá được.

Cân nặng của lợn được ghi lại ở lúc bắt đầu và cuối của mỗi thời kỳ, và lượng thức ăn gia súc được cấp mỗi ngày cũng được ghi lại. Tất cả các con lợn được cấp thức ăn ở mức 2,5 lần nhu cầu năng lượng duy trì mỗi ngày, và nước luôn có sẵn trong suốt thử nghiệm. 5 ngày đầu tiên của mỗi thời kỳ được xem là thời kỳ thích ứng với khẩu phần ăn. Các mẫu tiêu hoá ở ruột hồi được gom trong 8 giờ vào ngày 6 và 7 bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn. Túi bằng chất dẻo được gắn với trống ống thông bằng cách sử dụng dây cáp, và dịch tiêu hoá chảy vào túi này được gom lại. Túi này được bỏ ra bất cứ khi nào nó đầy dịch tiêu hoá, hoặc ít nhất cách 30 phút, và được làm đông lạnh ngay ở nhiệt độ -20 °C để ngăn sự phân huỷ axit amin do vi khuẩn trong dịch tiêu hoá. Sau khi hoàn thành một chu kỳ thử nghiệm, động vật không được cấp thức ăn gia súc qua đêm và sáng hôm sau, và khẩu phần ăn thử nghiệm được cung cấp.

Vào cuối thử nghiệm, các mẫu ruột hồi được làm tan bằng, được thu gom trong động vật và khẩu phần ăn, và mẫu nhỏ được thu gom dùng cho phân tích hoá học. Mẫu của mỗi khẩu phần ăn và của mỗi trong số các mẫu bột cải dầu và SBM cũng được thu gom. Các mẫu tiêu hoá được làm đông khô nhanh và được nghiền mịn trước khi phân tích hoá học. Tất cả các mẫu của khẩu phần ăn và dịch tiêu hoá được phân tích về DM, crom, protein thô, và axit amin và bột cải dầu và SBM được phân tích về protein thô và axit amin.

Các giá trị cho độ tiêu hoá trong ruột hồi biểu kiến (AID) của axit amin trong mỗi khẩu phần ăn được tính toán bằng cách sử dụng phương trình [1]:

$$AID, (\%) = [1 - (AAd/AAf) \times (Crf/Crd)] \times 100, \quad [1]$$

trong đó AID là giá trị độ tiêu hoá trong ruột hồi biểu kiến của một AA (axit amin) (%), AAd là nồng độ của AA đó trong DM dịch tiêu hoá ruột hồi, AAf là nồng độ AA của AA đó trong DM thức ăn gia súc, Crf là nồng độ crom trong DM thức ăn gia súc, và Crd là nồng độ crom trong DM dịch tiêu hoá ruột hồi. AID cho CP cũng sẽ được tính toán bằng cách sử dụng phương trình này.

Dòng nội sinh cơ sở đến ruột hồi ngoại biên của mỗi AA được xác định dựa trên dòng chảy thu được sau cấp thức ăn khẩu phần ăn không có N bằng cách sử dụng phương trình [2]:

$$IAA_{end} = AAd \times (Crf/Crd) \quad [2]$$

trong đó IAA_{end} là tổn thất nội sinh cơ sở của một AA (mg cho một kg DMI). Tổn thất nội sinh cơ sở của CP sẽ được xác định bằng cách sử dụng cùng một phương trình.

Bằng cách hiệu chỉnh AID cho IAA_{end} của mỗi AA, các giá trị độ tiêu hoá của AA ở ruột hồi chuẩn hoá được tính toán bằng cách sử dụng phương trình [3]:

$$SID, (\%) = AID + [(IAA_{end}/AA_f) \times 100] \quad [3]$$

trong đó SID là giá trị độ tiêu hoá trong ruột hồi chuẩn hóa (%).

Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng quy trình Proc GLM của SAS (SAS inst. Inc., Cary, NC). 5 khẩu phần ăn chứa bột cải dầu hoặc SBM được so sánh bằng cách sử dụng ANOVA với nguồn bột cải dầu, lợn, và thời kỳ như là các yếu tố tác động chính. Kiểm định LSD được sử dụng để tách riêng các giá trị trung bình. Mứcalpha 0,05 được sử dụng để đánh giá mức ý nghĩa trong số các giá trị trung bình. Từng con lợn là đơn vị thử nghiệm cho tất cả các phân tích.

Ví dụ 11: Sự phân huỷ của AA trong sản phẩm sữa

Sự phân huỷ của axit amin của ECM sẽ được đánh giá bằng cách ủ in-situ các mẫu bột ECM trong động vật được đặt ống thông ở dạ cỏ, như gia súc cho sữa, để ước

tính hàm lượng protein hoà tan và phân huỷ và xác định mức độ giảm chất lượng (Kd) của phân có thể phân huỷ.

Gia súc sẽ được cho ăn hỗn hợp khẩu phần ăn như là tổng khẩu phần thức ăn cố định hỗn hợp (TMR: total mixed ration) chứa 28,1% thức ăn gia súc ủ xilô từ ngô, 13,0% thức ăn gia súc ủ xilô từ cỏ linh lăng, 7,4% cỏ linh lăng khô, 20,4% bột ngô, 14,8% hạt ủ men ươm, 5,6% hạt bông nguyên, 3,7% vỏ ngoài đậu tương, và 7,0% nguồn cung cấp bổ sung (protein, các chất khoáng, các vitamin). Các túi in situ bằng polyeste tiêu chuẩn (R510, 5 cm x 10 cm, cỡ lỗ 50 micron) chứa khoảng 6 g chất khô (DM) bột đậu nành (SBM), bột cải dầu thông thường (CM), hoặc bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao (ECM) sẽ được ủ trong dạ cỏ trong thời gian 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 40, 48, và 64 giờ. Các túi lặp lại sẽ được loại bỏ ở mỗi thời điểm và rửa trong nước máy cho đến khi dòng chảy ra trong. Các túi sẽ được làm khô ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 3 ngày và sau đó, phần còn lại sẽ được bỏ ra và cân để xác định sự biến mất của chất khô (DM). Phần còn lại sẽ được phân tích về hàm lượng N bằng cách sử dụng phương pháp đốt cháy của Leco. Các mẫu ở thời điểm 0 sẽ không được ủ trong dạ cỏ, nhưng sẽ được rửa và xử lý giống như các mẫu được ủ trong dạ cỏ.

Các mẫu của phần còn lại ở thời điểm 0 và phần còn lại còn lại sau 16 h ủ trong dạ cỏ sẽ được phân tích về các thành phần tương đối (DM, chất béo thô, xơ thô, và tro) và thành phần axit amin (AA) (mà không có tryptophan). Các thông số này có thể được sử dụng để đưa ra ước tính protein có thể phân huỷ trong dạ cỏ (RDP) và protein không thể phân huỷ trong dạ cỏ (RUP), như được sử dụng trong hướng dẫn của National Research Council (2001) về yêu cầu chất dinh dưỡng cho gia súc nuôi lấy sữa.

Phần trăm của N trong mẫu ban đầu còn lại ở mỗi thời điểm có thể được tính toán, và các giá trị bản sao cho mỗi thời điểm trong bò được tính trung bình. Các giá trị từ ba con bò sẽ phù hợp với phương trình phi tuyến tính được mô tả Irskov và McDonald (1979). Theo phương pháp này, sự biến mất của CP ở động vật nhai lại được cho là tuân theo động học bậc 1 như được xác định bằng phương trình, sự biến mất CP = $A + B(1 - e^{-K_d t})$, trong đó A phần CP hoà tan (% của CP), B phần CP có tiềm năng phân huỷ (% của CP), Kd là hằng số tốc độ phân huỷ (h^{-1}), và t thời gian ủ ở động vật nhai lại (h). Phân đoạn C (không phân huỷ trong dạ cỏ) được tính toán là phân đoạn A trừ đi phân đoạn B. Phương trình sẽ được điều chỉnh bằng cách sử dụng

PROC NLIN của SAS (phiên bản 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC), bằng phương pháp tính toán Marquardt.

Phương trình để tính toán các giá trị RDP và RUP (như là phần trăm của CP) là: $RDP = A + B[K_d/(K_d + K_p)]$, và $RUP = B[K_p/(K_d + K_p)] + C$, trong đó K_p là mức độ chuyển từ dạ cỏ. Vì tốc độ chuyển không thể tính toán được trực tiếp từ những số liệu này (trong đó các chất nền được chứa trong dạ cỏ và bị ngăn không cho chuyển đến dải thấp hơn), phải giả sử tốc độ cho K_p . Trong nghiên cứu này, giá trị bằng 0,07 sẽ được sử dụng cho K_p , là tương tự với giá trị được tính toán theo phương trình trong NRC (2001) bò sữa năng suất cao tiêu thụ khẩu phần ăn được lactat hoá điển hình. Vì mục đích của nghiên cứu này là so sánh nguồn protein và đánh giá sự phân huỷ trong dạ cỏ của trong cùng một điều kiện, việc lựa chọn tốc độ chuyển để xác định RDP và RUP là tùy chọn.

Phương trình cuối cho mỗi mẫu sẽ được tạo ra bằng cách sử dụng các mẫu được ủ trong thời gian 0, 2, 4, 8, 16, 24, và 48 h theo khuyến cáo của NRC (2001). Số liệu về thời điểm ủ bổ sung trong nghiên cứu này (tức là 12, 20, 32, 40, và 64 h) có thể được sử dụng để kiểm tra các thông số động học của hệ thống này và để đảm bảo rằng bột cải dầu đã cải biến này tuân theo quy định về tiêu thụ trong mô tả NRC (2001).

Ví dụ 12: TME và TAAA ở gia cầm bao gồm việc so sánh TME thực tế với TME dự đoán dựa trên các kết quả phân tích từ Universities of Illinois, Missouri và Manitoba.

Đánh giá năng lượng thuần chuyển hoá được (TME) ở gia cầm trên các mẫu ECM được thực hiện ở cả University of Illinois và University of Georgia. Các phương pháp này được mô tả ở Ví dụ 8.

Bảng 5. Hàm lượng TME của bột cải dầu ECM và bột cải dầu thông thường trong các nghiên cứu ở University of Illinois và University of Georgia

Mẫu	TME, kcal/kg DM Trường đại học Illinois	TME, kcal/kg DM Trường đại học Georgia
Các mẫu được điều chế ở nhà máy thử nghiệm POS	n = 10	n = 6
44864 (2010) ECM Nhiệt độ thấp (LT)	2524 a* (60)**	2200 a (27)
Bột cải dầu nhiệt độ thấp (LT)	2320 b (59)	1933 b (95)
Bột cải dầu nhiệt độ cao (HT)	2373 a,b (65)	2048 a,b (99)
ECM LT – Bột cải dầu LT	204 (9%)***	267 (14%)
Bông màu trắng ECM (WF)		2199 a (91)
Bông màu trắng bột cải dầu (WF)		1899 b (51)
WF ECM – bột WF cải dầu		300 (16%)
Các mẫu bông màu trắng Indianapolis	n = 5	n = 6
44864 (2011)	2460 f,g (85)	2143 (46)
121460	2353 g (97)	2318 (81)
121466	2635 f (92)	2221 (99)
65620	2611 f (99)	2130 (44)
bột đậu nành	2913 (52)	2790 (32)

* trung bình trong cột và nhóm với chữ khác nhau là khác nhau đáng kể ($p < 0.05$)

** (SE)

*** (phần trăm khác biệt)

Trong trường hợp các mẫu ECM và bột cải dầu được điều chế từ POS, so sánh thích hợp nằm giữa hai bột LT, để hạn chế các tác động của việc xử lý. Các kết quả này là ở mức so sánh được trong cả các nghiên cứu ở University of Illinois và University

of Georgia. TME ở gia cầm là cao hơn đáng kể với ECM (LT) hơn là bột cải dầu thông thường (LT) - cao hơn 9% trong nghiên cứu ở University of Illinois và cao hơn 14% trong nghiên cứu ở University of Georgia. Các kết quả này khẳng định các kết quả phương trình dự đoán sau đây. Bảng 4. Bông màu trắng các mẫu bột cải dầu ECM và bột cải dầu thông thường được lấy ra ở POS ngay sau giai đoạn chiết dung môi và trước khi giai đoạn DT. TME ở gia cầm cho các bột WF được so sánh trong nghiên cứu riêng biệt ở University of Georgia và, như với các mẫu LT, WF ECM có TME cao hơn đáng kể hơn là WF của bột cải dầu thông thường.

Bảng 4.

Bốn giống cây trồng của ECM được xử lý độc lập ở phòng thí nghiệm của Dow AgroSciences ở Indianapolis bằng cách sử dụng các phương pháp theo quy trình bông màu trắng như được mô tả trong Ví dụ 3. Sau đó, các mẫu này được đưa xử lý phân tích TME gia cầm ở hai trường đại học. Không có sự khác biệt đáng kể về TME giữa các dòng ECM được thử nghiệm, chỉ với ngoại trừ là dòng 121460 dường như có TME thấp hơn các dòng 121466 hoặc 65620.

Các giá trị TME theo dõi được từ các nghiên cứu này là phù hợp với hàm lượng năng lượng trao đổi chất được dự đoán sau đây. The National Research Council Nutrient Requirements of Poultry (NRC, 1984, Nutrient requirements of poultry. Ninth Revised Edition. National Academy Press. Washington, DC)) có phương trình dự đoán cho ME trong bột cải dầu (cây cải bột double zero):

$$\text{ME kcal/kg} = (32,76 \times \text{CP}\%) + (64,96 \times \text{EE}\%) + (13,24 \times \text{NFE}\%)$$

Theo tính toán CP cao hơn 7% phải được bù bằng NFE thấp hơn 7%, vì thế hệ số thực cho CP phải là: $32,76 - 13,24 = 19,52$. Kết quả này cho ME ở ECM nhiều hơn 137 kcal/kg hơn là bột cải dầu ($7\% \times 19,52 = 137$). Vấn đề với phương trình này là ở chỗ NFE là ước tính kém giá trị năng lượng của đường và tinh bột.

Một phương trình khác là phương trình EEC dự đoán cho ME ở gia cầm (trường thành). (Fisher, C and J.M. McNab. 1987. Techniques for determining the ME content of poultry feeds. In: Haresign and D.J.A. Cole (Eds), Recent Advances in Animal Nutrition – 1987. Butterworths, London. P. 3-17):

$ME, \text{kcal/kg} = (81,97 \times EE\%) + (37,05 \times CP\%) + (39,87 \times \text{Tinh bột}\%) + (31,08 \times \text{đường}\%)$

Phương trình EEC là phương trình “phân bố dương tính” cho giá trị thành chất dinh dưỡng tiêu hóa được trong bột cải dầu, như protein, chất béo, tinh bột và các đường tự do. Vì sự khác biệt phân tích giữa ECM và bột cải dầu chỉ là protein, ta có thể sử dụng hệ số 37,05 để tính toán năng lượng thêm:

$37,05 \times 7\% = 259 \text{ kcal/kg}$. Phương trình EEC này được thiết kế cho thức ăn gia súc đầy đủ, mà thường có độ tiêu hoá cao hơn bột cải dầu. Do đó, hệ số 37,05 là quá cao.

Một phương pháp khác là sử dụng các nguyên lý đầu tiên về giá trị năng lượng của protein. Một ước tính thô sơ là 4 calo tổng năng lượng cho một gam protein $\times 80\%$ độ tiêu hoá protein $\times 5\%$ tổn thất do bài tiết nitơ = khoảng 75% calo tổng cho một gam (3 calo năng lượng chuyển hoá được cho một gam hoặc $30 \times \%$ protein. Phép tính này cho năng lượng chuyển hoá được: $30 \times 7\% = 210 \text{ kcal/kg ME}$ dư trong ECM.

Tóm lại, ước tính rằng bột ECM có ME ở gia cầm nhiều hơn trong khoảng 140 – 260 kcal/kg so với bột cải dầu thông thường. Giá trị 140 kcal/kg có thể là ước tính thấp thô và 260 kcal/kg có thể là giá trị ở phía cao. Có thể sự tăng thêm 200 – 220 kcal/kg ở ME ở gia cầm là có thể. Biểu hiện kết quả này trên cơ sở “như vậy” (Bảng 1), ECM thương mại có thể có ME ở gia cầm 2200 kcal/kg so với 2000 kcal/kg ở bột cải dầu thông thường. Đây là sự tăng 10% năng lượng.

Mức tiêu hoá axit amin thật (TAAA) ở gia cầm còn được đo ở cả University of Illinois và the University of Georgie. Trong trường hợp này, chỉ các mẫu bột được chuẩn bị ở POS được phân tích vì mức tiêu hoá axit amin cao hơn nhiều của bông màu trắng so với bột cải dầu được nướng không được xem là có ý nghĩa thương mại. Bảng 6.

Bảng 6. Hệ số tiêu hóa axit amin thực (TAAA) ở gia cầm của axit amin quan trọng trong bột cải dầu ECM và bột cải dầu thông thường được điều chế ở POS trong các nghiên cứu

TAAA axit amin, %	Trường đại học Illinois	Trường đại học Illinois	Trường đại học Illinois	Trường đại học Georgia	Trường đại học Georgia	Trường đại học Georgia
	ECM LT	CM LT	CM HT	ECM LT	CM LT	CM HT
Lysin	81,8	79,6	76,6	86,8	83,5	82,9
Metionin	91,4	89,1	88,1	92,1	89,9	90,5
Xystin	80,2	82,8	79,8	79,6	80,7	78,1
Threonin	82,5	86,1	79,3	83,2	82,1	80,7
Arginin	88,9	90,0	89,6	89,8	85,0	89,0
Tryptophan	97,7	97,9	98,9	94,4	95,2	95,4

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hệ số tiêu hóa axit amin thực ở gia cầm giữa các mẫu bột cải dầu khác nhau. Bảng 6.

Ví dụ 13: Mức tiêu hoá axit amin ở lợn (AID và SID) và NE dự đoán

Các nghiên cứu mức tiêu hoá axit amin ở ruột hồi lợn được thực hiện ở Trường đại học Illinois. Bột được điều chế ở Nhà máy thí nghiệm POS được sử dụng để so sánh.

Bảng 7. Mức tiêu hoá axit amin ở ruột hồi biểu kiến (AID) ở lợn và mức tiêu hoá axit amin chuẩn hoá ở Ruột hồi (SID) ở lợn của protein và axit amin quan trọng trong bột cải dầu ECM và bột cải dầu thông thường được điều chế ở POS trong nghiên cứu ở Trường đại học Illinois

Axit amin, tiêu hóa được %	AID	AID	AID		SID	SID	SID
	ECM	CM	CM		ECM	CM	CM
	LT	LT	HT		LT	LT	HT
Protein thô	66,5 a*	61,9 b	63,9 a,b		73,9	71,4	73,5
Lysin	73,0 a	67,8 b	67,9 b		76,1 a	71,6 b	71,8
Metionin	81,2	80,0	79,4		83,0	81,6	82,3
Xystin	72,2 a,b	71,1 b	74,1 a		74,9 b	75,1 a,b	77,8 a
Threonin	63,1	61,0	63,6		69,4	68,6	71,0
Arginin	77,3	78,7	78,7		82,0	84,5	84,8
Tryptophan	81,1 a	75,1 b	78,4 a		84,9 a	80,7 b	84,0 a

* trung bình trong hàng và nhóm có chữ cái khác nhau là khác nhau đáng kể ($p < 0.05$)

Nhận thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê nào đó về mức tiêu hoá protein và axit amin giữa các mẫu ECM và bột cải dầu. ECM có AID protein thô cao hơn bột cải dầu nhưng sự khác biệt về protein SID là không đáng kể. Với cả AID và SID, lysin trong ECM là dễ tiêu hoá hơn trong bột cải dầu thông thường khi được xử lý bằng nhiệt giống nhau. Bảng 7.

Với lợn, phương trình thường được chấp nhận để dự đoán DE, ME, và NE ở lợn là phương trình Noblet như được phác thảo trong EvaPig (2008, Version 1.0. INRA, AFZ, Ajinomoto Eurolysine) và nhu cầu chất dinh dưỡng lợn NRC NRC Nutrient Requirements of Swine (NRC, 1998, Nutrient requirements of swine; Tenth Revised Edition; National Academy Press. Washington, DC):

Phương trình 1-4. DE, kcal/kg = $4151 - (122 \times \text{Tro}\%) + (23 \times \text{CP}\%) + (38 \times \text{EE}\%) - (64 \times \text{CF}\%)$

Phương trình 1-14. NE, kcal/kg = $2790 + (41,22 \times \text{EE}\%) + (8,1 \times \text{Tinh bột}\%) - (66,5 \times \text{Tro}\%) - (47,2 \times \text{ADF}\%)$

Phương trình Noblet là kết hợp của cả yếu tố đóng góp dương tính và âm tính: chất béo, protein và tinh bột hệ số dương tính, trong khi đó tro, CF và ADF có hệ số âm tính. Protein không được sử dụng trong phương trình năng lượng thuần (NE), nhưng sự khác biệt giữa bột ECM và bột cải dầu có thể thu được bởi sự khác biệt về ADF. Vì tinh bột và tro là giống nhau trong bột ECM và bột cải dầu, thì sự khác biệt quan trọng là ADF. ADF 5% điểm thấp hơn cho $47,2 \times 5\% = 236 \text{ kcal/kg}$ NE nhiều hơn trong ECM. Số được dự đoán này là tương tự với số ME ở gia cầm, vì thế sự tăng năng lượng thuần ở lợn 200 kcal/kg đối với ECM trên cơ sở “as is” (Bảng 1) là có thể. Kết quả này dẫn đến sự tăng khoảng 12% năng lượng.

Ví dụ 14: Cây lai ECM bổ sung

Cây cải dầu lai mới CL166102H cũng cho đặc tính (ECM) ở bột tăng lên. Các tính trạng hình thức và chất lượng được đo trên hạt của cây lai này, được thu hoạch trên lô thử nghiệm nhỏ từ 2011, bao gồm dầu, bột protein, ADF, và tổng lượng glucosinolat (Tgluc). Xem Bảng 8.

Các kết quả ở Bảng 8 rõ ràng cho thấy rằng dòng ECM DAS mới này là tốt hơn giống cây trồng thương mại về đặc điểm tính trạng bột.

Bảng 8b: Đặc tính nông nghiệp của các dòng ECM (thử nghiệm C3B03)

Dòng	Dầu (%)	Protein (%)	ADF (%)	Tgluc uM/G
Cây lai CL166102	49,4	49,9	12,8	10,6
Giống thương mại 5440 (129436)	50,2	45,9	16,3	9,7

Yêu cầu bảo hộ

1. Hạt cải dầu màu đen chứa hàm lượng protein thô ít nhất 45% và hàm lượng xơ không hoà tan trong axit không cao hơn 18% như được xác định bằng phương pháp hoá học tham chiếu, tính theo lượng chất khô không dầu, trong đó hạt cải dầu màu đen này được chọn từ nhóm bao gồm CL065620 (ATCC No. PTA-11697), CL044864 (ATCC No. PTA-11696), CL121460H (ATCC No. PTA-11698), CL166102H (ATCC No. PTA-12570), và CL121466H (ATCC No. PTA-11699).
2. Hạt cải dầu màu đen theo điểm 1, trong đó hạt cải dầu màu đen này còn có hàm lượng protein thô ít nhất khoảng 49% trên lượng chất khô không dầu.
3. Hạt cải dầu màu đen theo điểm 1, trong đó hạt cải dầu màu đen này còn có hàm lượng xơ không hoà tan trong axit không cao hơn khoảng 16% trên lượng chất khô không dầu.
4. Hạt cải dầu màu đen theo điểm 1, trong đó hạt cải dầu màu đen này còn chứa hàm lượng lignin và polyphenolic ít hơn 6,8% trên lượng chất khô không dầu.
5. Hạt cải dầu màu đen theo điểm 1, trong đó hạt cải dầu màu đen này còn chứa hàm lượng phospho nhiều hơn 1,1% trên lượng chất khô không dầu.
6. Cây cải dầu được sinh trưởng từ hạt cải dầu màu đen điểm 1.
7. Cây cải dầu theo điểm 6, trong đó cây cải dầu này tạo ra hạt cải dầu màu đen chứa hàm lượng lignin và polyphenolic ít hơn 6,8% trên lượng chất khô không dầu.
8. Cây cải dầu theo điểm 6, trong đó cây cải dầu này tạo ra hạt cải dầu màu đen chứa hàm lượng phospho nhiều hơn 1,1% trên lượng chất khô không dầu.
9. Cây cải dầu theo điểm 6, trong đó cây cải dầu này tạo ra hạt cải dầu màu đen chứa ít nhất 43% dầu.

10. Cây cải dầu theo điểm 6, trong đó cây cải dầu này tạo ra hạt cải dầu màu đen chứa mức ADF nhỏ hơn khoảng 18% hoặc mức polyphenolic nhỏ hơn khoảng 5%.
11. Một nhóm nhiều cây cải dầu theo điểm 6, trong đó nhóm nhiều cây cải dầu này cho năng suất trung bình ít nhất 1700 kilogam hạt trên một hecta.
12. Cây cải dầu theo điểm 6, trong đó cây cải dầu này là CL044864 (ATCC No. PTA-11696).
13. Cây cải dầu theo điểm 6, trong đó cây cải dầu này được tạo ra không dùng kỹ thuật di truyền hoặc gây đột biến.
14. Cây cải dầu theo điểm 6, trong đó cây cải dầu này tạo ra hạt cải dầu màu đen có hàm lượng phospho cao hơn 1,3% trên lượng chất khô không dầu.
15. Hạt cải dầu màu đen thu được từ cây cải dầu theo điểm 6.
16. Cây cải dầu được trồng từ hạt cải dầu màu đen theo điểm 15.
17. Bột cải dầu thu được từ hạt cải dầu màu đen theo điểm 1.
18. Bột cải dầu theo điểm 17, trong đó bột cải dầu này có năng lượng thuần chuyển hoá trung bình được ở gia cầm ít nhất là 2200 kcal/kg.
19. Bột cải dầu theo điểm 17, trong đó bột cải dầu có năng lượng thuần trung bình ở lợn ít nhất 1800 kcal/kg.
20. Bột cải dầu theo điểm 17, trong đó bột cải dầu có profin tiêu hoá axit amin thuận lợi ở lợn, khi được so sánh với bột cải dầu được tạo ra từ cây cải dầu được tạo ra từ hạt màu đen bình thường của cùng loài.

21. Bột cải dầu theo điểm 17, trong đó bột cải dầu có protein tiêu hoá axit amin thuận lợi ở gia cầm, khi được so sánh với bột cải dầu được tạo ra từ cây cải dầu được tạo ra từ hạt màu đen bình thường của cùng loài.
22. Bột cải dầu theo điểm 17, trong đó bột cải dầu nêu trên có mức tiêu hoá axit amin ít nhất khoảng 90% mức tiêu hoá axit amin của bột đậu nành .
23. Bột cải dầu theo điểm 17, trong đó bột cải dầu nêu trên có hàm lượng năng lượng tiêu hoá được hoặc hàm lượng năng lượng trao đổi chất được ít nhất khoảng 80% của hàm lượng tương ứng của bột đậu nành.
24. Hạt cải dầu màu đen mà là ổn định về mặt di truyền tạo ra bột chứa hàm lượng protein thô ít nhất khoảng 45%, và hàm lượng xơ không hoà tan trong axit không cao hơn khoảng 18% được xác định bằng phương pháp hoá học tham chiếu tính trên lượng chất khô không dầu, trong đó hạt cải dầu màu đen thu được từ cây trồng là cây cải dầu ưu tú.
25. Hạt cải dầu màu đen theo điểm 24, trong đó hạt này còn có hàm lượng protein thô ít nhất 49% trên lượng chất khô không dầu.
26. Hạt cải dầu màu đen theo điểm 24, trong đó hạt này còn có hàm lượng xơ không hoà tan trong axit không cao hơn 16%.
27. Hạt cải dầu màu đen theo điểm 24, trong đó hạt cải dầu màu đen là ổn định về mặt di truyền có ít nhất một tính trạng nữa được chọn từ nhóm bao gồm mức ADF nhỏ hơn khoảng 18% hoặc mức polyphenolic nhỏ hơn khoảng 5%.
28. Hạt cải dầu màu đen theo điểm 25, trong đó hạt cải dầu màu đen là ổn định về mặt di truyền có ít nhất một tính trạng nữa được chọn từ nhóm bao gồm mức ADF nhỏ hơn khoảng 18% hoặc mức polyphenolic nhỏ hơn khoảng 5%.
29. Bột cải dầu được tạo ra từ hạt màu đen theo điểm 24.

30. Phương pháp đưa vào cây trồng là cây cải dầu ít nhất một tính trạng mong muốn được chọn từ nhóm bao gồm hàm lượng protein cao hơn khoảng 45%, hàm lượng phospho cao hơn khoảng 1,2%, hàm lượng ADF thấp hơn khoảng 18%, và hàm lượng chất polyphenol cao hơn khoảng 5%, theo cách độc lập với màu vỏ hạt, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

lai thực vật theo điểm 6 với thực vật cây trồng cải dầu thứ hai khác để tạo ra các cây thế hệ con F_1 ;

chọn lọc một hoặc nhiều cây thế hệ con có các tính trạng mong muốn để tạo ra các cây thế hệ con chọn lọc;

lai ngược các cây thế hệ con chọn lọc với thực vật theo điểm 6 để tạo ra các cây thế hệ con lai ngược;

lai ngược các cây thế hệ con chọn lọc có các tính trạng và các đặc điểm sinh lý và hình thái mong muốn của cây trồng cải dầu thứ hai khác để tạo ra các cây thế hệ con lai ngược chọn lọc; và

lặp lại các bước lai ngược và chọn lọc này ba hoặc nhiều lần hơn để tạo ra các cây thế hệ con lai ngược cận thân chọn lọc thế hệ thứ tư hoặc cao hơn mà có các tính trạng mong muốn.

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó các tính trạng mong muốn gồm hàm lượng protein cao hơn khoảng 45%, hàm lượng phospho cao hơn khoảng 1,2%, hàm lượng ADF cao hơn khoảng 18%, và hàm lượng chất polyphenol cao hơn khoảng 5%.

32. Bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao thu được trực tiếp từ hạt cải dầu màu đen, trong đó cải dầu màu đen này chứa, hàm lượng protein thô ít nhất khoảng 45% và hàm lượng xơ không hoà tan trong axit không cao hơn khoảng 18%, như được xác định bằng phương pháp hoá học tham chiếu trên lượng chất khô không dầu, trong đó hạt cải dầu màu đen này được chọn từ nhóm bao gồm CL065620 (ATCC No. PTA-11697), CL044864 (ATCC No. PTA-11696), CL121460H (ATCC No. PTA-11698), CL166102H (ATCC No. PTA-12570), và CL121466H (ATCC No. PTA-11699).

33. Bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao theo điểm 32, trong đó hạt cải dầu màu đen mà là ổn định về mặt di truyền để chứa các tính trạng bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm hàm lượng ADF cao hơn khoảng 18%, và hàm lượng chất polyphenol cao hơn khoảng 5%.

34. Bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao theo điểm 32, trong đó hạt cải dầu màu đen mà là ổn định về mặt di truyền để chứa hàm lượng phospho cao hơn khoảng 1,2%, và hàm lượng chất polyphenol cao hơn khoảng 5%.

35. Bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao theo điểm 32, trong đó bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao nêu trên có thể thay thế bột cải dầu hoặc bột đậu nành thông thường khác nhau khác như là nguồn cung cấp bổ sung protein hoặc năng lượng trong khẩu phần ăn của gia cầm, lợn, hoặc động vật nhai lại.

36. Cây cải dầu theo điểm 6, trong đó thực vật là CL166102H (ATCC No. PTA-12570).

37. Cây cải dầu được chọn từ nhóm bao gồm CL065620 (ATCC No. PTA-11697), CL044864 (ATCC No. PTA-11696), CL121460H (ATCC No. PTA-11698), CL166102H (ATCC No. PTA-12570), và CL121466H (ATCC No. PTA-11699).

Fig. 1 Mẫu hạt của các giống cải dầu ví dụ

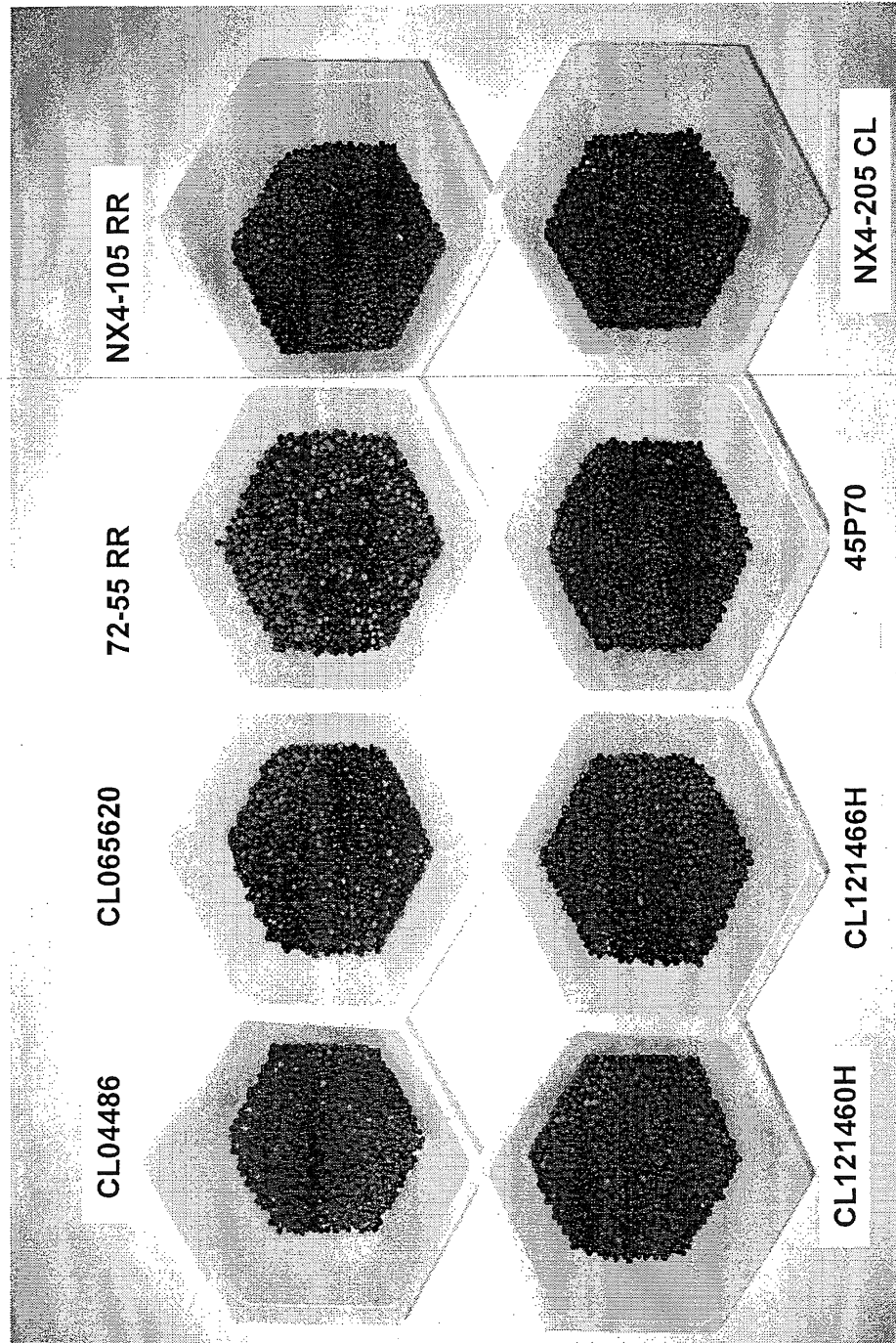


FIG. 2. Phân tích thành phần hạt từ các mẫu trồng trên cánh đồng

Tên	Chất lượng hạt theo phân tích quang phổ NIR				Thành phần hóa học so sánh - 3 vị trí				
	% dầu của chất khô NIR	% protein trong bột NIR 10% H ₂ O	Tổng glucosinolat NIR 10% H ₂ O	% ADF NIR 10% H ₂ O	% dầu của chất khô NMR	% Protein 10% H ₂ O	% ADF 10% H ₂ O	Tanin ngưng tụ OD 520 /g ADF	Tanin ngưng tụ OD 550 /g ADF
NX4-105 RR	48,3	41,3	9,7	14,8	48,9	38,4	18,4	4,1	5,4
72-55 RR	50,9	41,9	12,5	11,2	50,2	40,6	12,6	0,2	0,2
NX4-205 CL	47,7	41,7	10,2	16,2	49,8	38,4	19,9	6,7	9,1
45P70	47,1	41,1	10,5	14,2	47,6	38,5	15,6	1,6	2,1
CL044864	48,5	44,1	10,2	12,2	48,1	42,0	12,8	0,2	0,2
CL065620	50,0	44,2	10,8	11,2	49,8	42,1	12,5	0,4	0,4
CL121460H	49,2	43,2	9,4	12,2	49,3	42,1	13,5	0,3	0,3
CL121466H	48,1	43,2	9,5	13,5	47,7	42,0	15,0	0,8	1,0

72-5 5RR và 45P70 là các giống cải dầu lai trên thị trường được bán lần lượt bởi Monsanto Company và Pioneer Hi-Bred. NX4-105 RR và NX4-205 RR là các dòng cải dầu hạt màu đen trên thị trường được bán lần lượt bởi Dow AgroSciences, LLC.