



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

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

(11)



1-0031210

(51)⁷ A01H 4/00; C12N 15/00; A01H 1/06

(13) B

(21) 1-2013-02962

(22) 21/02/2012

(86) PCT/US2012/025981 21/02/2012

(87) WO2012/115985 30/08/2012

(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

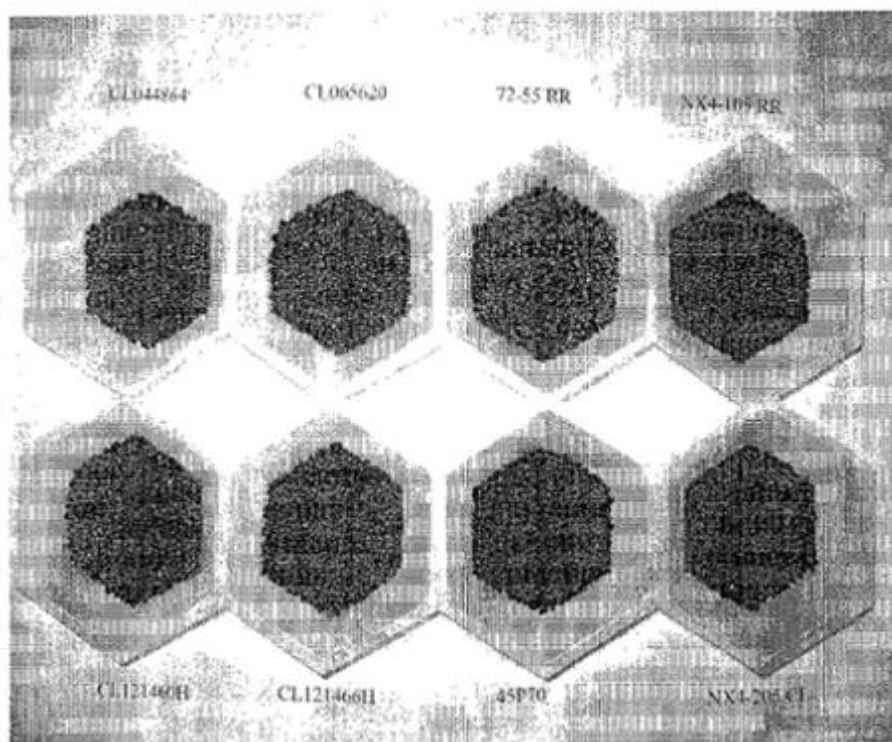
(72) KUBIK, Thomas James (CA); GINGERA, Gregory R. (CA); RIPLEY, Van Leonard (CA); BEAITH, Michelle E. (CA); PATTERSON, Thomas G. (US).

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

(54) CHẤT MẦM NGUYÊN SINH CÂY CẢI DẦU VÀ HẠT 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 lên) 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 màu hạt sẫm màu cùng với, ví dụ, hàm lượng các yếu tố kháng dinh dưỡng giảm (ví dụ như xơ không hoà tan trong axit (ADF: acid detergent fiber) và các hợp chất polyphenolic) và hàm lượng protein và phospho tăng lên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

“Cây cải dầu” dùng để chỉ cây cải (*Brassica* spp.) có hàm lượng axit eruxic (C22:1) nhiều nhất 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 cây 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 energy) 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) Göttingen 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. 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 quản 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 có 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 mô tả ở đây 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 kết 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, kết 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 cho 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 các chất tách và các dạng đậm đặc của protein. 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 thu nhận 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.

Các phương án cụ thể theo sáng chế bao gồm chất mầm nguyên sinh cây cải dầu làm cho hạt cây cải dầu có các tính trạng hàm lượng protein cao và hàm lượng xơ thấp, trong đó tính trung bình, cây cải dầu này cho hạt có hàm lượng axit oleic (C18:1) ít nhất 68% và hàm lượng axit linolenic (C18:3) ít hơn 3%. Theo các phương án khác, cây cải dầu gồm có chất mầm nguyên sinh cây cải dầu. Hạt thu được từ cây cải dầu cũng được đề xuất. Các phương án bổ sung bao gồm cây thế hệ con được trồng từ hạt của cây cải dầu này. Sáng chế cũng đề xuất các 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, hàm lượng xơ thấp, hàm lượng axit oleic (C18:1) ít nhất 68% và hàm lượng axit linolenic (C18:3) ít hơn 3% theo cách độc lập với màu vỏ hạt.

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 cây 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

cây 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; Soxhlet chiết tách, hoặc các phương pháp khác các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này được 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 nghiền 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 cây 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 thế 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 cũng 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 cây 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 cây 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 vân), 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 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, protein 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: protein 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 cây 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 hoặc profin dầu “Omega-9”. Profin dầu “kiểu NATREON,” “kiểu NATREON” hoặc “Omega-9” 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 68%, 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 ít hơn 3%, 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 cây cải dầu (ví dụ, hạt cây cải dầu sẫm màu) chứa phần dầu và phần bột, trong đó phần dầu này có thể có hàm lượng axit α -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 cây cải dầu có thể chiếm 48%-50% hạt trọng lượng.

Thuật ngữ “oleic cao” dùng để chỉ *Brassica juncea* hoặc loài *Brassica* khác trong ngữ cảnh phù hợp, có hàm lượng axit oleic cao hơn hàm lượng của giống cây trồng hoặc dòng kiểu đại hoặc tham khảo khác, phổ biến hơn dùng để chỉ thành phần axit béo chứa axit oleic với lượng ít nhất 68,0% khối lượng.

“Tổng các axit béo bão hoà” dùng để chỉ tổng phần trăm các axit béo palmitic (C16:0), stearic (C18:0), arachidic (C20:0), behenic (C22:0) và tetracosanoic (C24:0). Nồng độ của axit béo được bàn luận trong bản mô tả này được xác định theo các quy trình tiêu chuẩn đã biết với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các quy trình cụ thể được đưa ra trong phần ví dụ. Nồng độ của axit béo được thể hiện là phần trăm khối lượng trên tổng hàm lượng axit béo.

Thuật ngữ “độ ổn định” hoặc “ổn định” như được sử dụng ở bản mô tả này khi nói đến thành phần axit béo nhất định được khống chế bằng di truyền dùng để chỉ rằng thành phần axit béo được duy trì giữa các thế hệ trong ít nhất hai thế hệ và tốt hơn nếu ít nhất ba thế hệ về cơ bản ở cùng một mức, ví dụ, tốt hơn nếu chỉ khác biệt $\pm 5\%$. Các phương pháp theo sáng chế có khả năng tạo ra các dòng *Brassica juncea* có thành phần axit béo được cải thiện với mức ổn định lên đến $\pm 5\%$ từ thế hệ này đến thế hệ khác. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng độ ổn định được nêu trên có thể bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, vị trí, điều kiện khắc nghiệt và thời điểm trồng. Do đó, sự so sánh profin axit béo giữa các dòng cây cải dầu phải được thực hiện bằng cách sử dụng hạt thu được trong điều kiện trồng tương tự nhau.

Thuật ngữ “thực vật *Brassica*” được sử dụng trong ngữ cảnh theo sáng chế, còn bao gồm sự biến đổi một gen bất kỳ của nhóm đó. Thuật ngữ “thực vật có một gen biến đổi” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ các thực vật *Brassica* được phát triển bằng kỹ thuật nhân giống thực vật được gọi là kỹ thuật lai ngược trong đó về cơ bản tất cả các đặc tính hình thái và sinh lý mong muốn của giống cây trồng được thu nhận ngoài ra giống cây trồng có thêm một gen được đưa vào nhờ kỹ thuật lai

ngược. Phương pháp lai ngược có thể được sử dụng theo sáng chế để cải thiện hoặc đưa thêm một đặc tính vào giống cây trồng. Thuật ngữ “lai ngược” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ việc lai được lặp lại của thế hệ con cây lai với cây bố mẹ hồi quy, *tức là* lai ngược một hoặc nhiều lần cây bố mẹ hồi quy (được nhận diện là “BC1,” “BC2,” v.v.). Thực vật bố mẹ *Brassica* đóng góp gen mang lại đặc tính mong muốn được gọi là “cây bố mẹ không hồi quy” hoặc “cây bố mẹ thể cho.” Thuật ngữ này dùng để chỉ rằng cây bố mẹ không hồi quy được sử dụng một lần trong các phương pháp lai ngược và do đó là không hồi quy. Thực vật *Brassica* bố mẹ mà gen hoặc các gen từ cây bố mẹ không hồi quy được chuyển đến được biết đến như là cây bố mẹ hồi quy khi nó được sử dụng cho một số vòng trong phương pháp lai ngược (Poehiman & Sleper, 1994; Fehr, 1987). 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 một 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 *Brassica* trong đó về cơ bản tất cả các đặc tính hình thái và sinh lý mong muốn của cây bố mẹ hồi quy được chuyển vào thực vật đã được chuyển đổi, ngoài một gen được chuyển từ cây bố mẹ không hồi quy như được xác định ở mức ý nghĩa 5% khi được trồng trong cùng điều kiện môi trường. Trong đơn này, thuật ngữ “*Brassica*” có thể bao gồm bất kỳ hoặc tất cả loài được xếp vào trong giống *Brassica* bao gồm *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Brassica carinata*, *Brassica oleracea* và *Brassicarapa*.

Cây cải dầu *Brassica juncea* được sử dụng trong đơn này dùng để chỉ *Brassica juncea* cho hạt với chất lượng dầu và bột đáp ứng yêu cầu quy định thương mại như là dầu hoặc bột “cây cải dầu”, một cách tương ứng, (*tức là* thực vật thuộc loài *Brassica juncea* có axit eruxic với lượng nhỏ hơn 2% (Ä13-22:1) khối lượng trong dầu từ hạt và glucosinolat với lượng nhỏ hơn 30 micromol cho một gam bột không chứa dầu).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thực vật *Brassica*, như thực vật *Brassica juncea*, có khả năng cho hạt có có hàm lượng axit béo nội sinh chứa hàm lượng cao axit oleic và hàm lượng thấp axit linolenic tính theo khối lượng. Theo các phương án cụ thể, axit oleic có thể chiếm 68,0%, 69,0%, 70,0%, 71,0%, 72,0%, 73,0%, 74,0%, 75,0%, 76,0%, 77,0%, 78,0%, 79,0%, 80,0%, 81,0%, 82,0%, 83,0%, 84,0% hoặc

85,0%, bao gồm tất cả số nguyên và phân số của chúng hoặc số nguyên bất kỳ có giá trị cao hơn 85% axit oleic. Theo các phương án cụ thể, hàm lượng axit linolenic trong axit béo có thể nhỏ hơn khoảng 5%, 4%, 3%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,0%, 0,5% hoặc 0%, và bao gồm tất cả số nguyên và phân số của chúng. Theo một phương án ví dụ, thực vật là *Brassica juncea*, có hạt có hàm lượng axit béo nội sinh chứa ít nhất 68% axit oleic theo khối lượng và ít hơn 3% axit linolenic theo khối lượng. Theo một phương án bổ sung, thực vật là thực vật *Brassica juncea* cho hạt có hàm lượng axit béo nội sinh chứa axit oleic ít nhất 68,0% khối lượng và axit linolenic không nhiều hơn khoảng 5% khối lượng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thực vật *Brassica*, như thực vật *Brassica juncea*, có khả năng cho hạt có hàm lượng axit béo nội sinh chứa axit oleic với phần trăm cao và axit linolenic với phần trăm thấp theo khối lượng và tổng lượng axit béo bão hoà thấp hoặc tổng lượng axit béo bão hoà cao mà có thể chứa tổng lượng axit béo bão hoà nhỏ hơn khoảng 5,5% hoặc tổng lượng axit béo bão hoà >10%, lần lượt.

Đã biết rằng chế phẩm dầu từ hạt *Brassica juncea* khác với chế phẩm từ *Brassica napus* cả về hai hợp phần axit béo (ví dụ, hàm lượng axit eruxic cao hơn), tinh dầu (ví dụ, alyl isothioxyanat), và các thành phần chiếm lượng nhỏ (ví dụ, tocopherol, kim loại, tanin, phenolic, phospholipit, các thể màu, và các chất tương tự). Dầu trong hạt (bao gồm dầu được chiết) từ *Brassica juncea* được nhận thấy là có độ ổn định oxy hóa cao hơn so với dầu từ *Brassica napus*, cho dù là dầu từ *Brassica juncea* thường có hàm lượng C18:3 cao hơn. (C. Wijesundera et al., “Canola Quality Indian Mustard oil (*Brassica juncea*) is More Stable to Oxidation than Conventional Canola oil (*Brassica napus*),” *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2008) 85:693–699).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp làm tăng hàm lượng axit oleic và giảm hàm lượng axit linolenic của thực vật *Brassica*. Các phương pháp này có thể bao gồm việc: (a) gây đột biến ở ít nhất một số tế bào từ dòng *Brassica* có hàm lượng axit oleic cao hơn 55% và hàm lượng axit linolenic thấp hơn 14%; (b) tái sinh thực vật từ ít nhất một trong các tế bào được tạo đột biến nêu trên và chọn lọc thực vật được tái sinh có hàm lượng axit béo chứa ít nhất 68% axit oleic (hoặc nồng độ ngưỡng khác của axit oleic, như được nêu trên) và ít hơn 3% axit

linolenic (hoặc nồng độ ngưỡng khác của axit linolenic, như được nêu trên); và (c) tạo ra các thế hệ thực vật tiếp theo từ thực vật được tái sinh nêu trên, cá thể thực vật từ các thế hệ tiếp theo nêu trên của thực vật có hàm lượng axit béo chứa ít nhất 68% axit oleic (hoặc nồng độ ngưỡng khác) và ít hơn 3% axit linolenic (hoặc nồng độ ngưỡng khác). Theo một số phương án, *Brassica* này có thể là *Brassica juncea*. Thuật ngữ “hàm lượng axit oleic cao” và “hàm lượng axit linolenic thấp” bao gồm toàn bộ khoảng các giá trị có thể có đã nêu trên. Theo các phương án thay thế, các phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm việc chọn lọc một hoặc nhiều dòng, thực vật được tái sinh và các thế hệ tiếp theo của thực vật có hàm lượng axit linoleic giảm đi, như khonagr các giá trị có thể có đã nêu trên. Theo các phương án tiếp theo bước (c) có thể liên quan đến chọn lọc và trồng hạt từ thực vật được tái sinh của bước (b). Theo các phương án tiếp theo, các phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm việc lặp lại các bước nêu ra cho đến khi đạt được hàm lượng axit oleic, hàm lượng axit linoleic, hoặc cả hai hàm lượng mong muốn.

Theo các phương án thay thế, sáng chế đề xuất các phương pháp sàng lọc cá thể hạt về hàm lượng axit oleic tăng lên và hàm lượng axit linoleic giảm đi, bao gồm bước: xác định một hoặc nhiều hàm lượng axit oleic; hoặc hàm lượng axit linoleic; hoặc hàm lượng axit oleic và hàm lượng axit linoleic trong axit béo của một phần của phần mầm hạt; so sánh một hoặc nhiều hàm lượng này với giá trị tham khảo; và suy luận hàm lượng axit oleic, axit linoleic, hoặc axit oleic và axit linoleic của hạt tương đối có thể có. Theo các phương án cụ thể phần thực vật được sử dụng cho phân tích có thể một phần hoặc toàn bộ lá cây, lá mầm, thân, cuống lá, cuống hoặc mô hoặc phần của mô bất kỳ khác, như các mô có thành phần thể hiện mối liên hệ đáng tin cậy với thành phần của hạt. Theo một loạt phương án, phần của này mầm có thể là một phần của lá cây. Theo một số phương án, bước suy luận thành phần axit béo trong hạt có thể bao gồm việc giả sử rằng có mức thay đổi đáng kể axit nêu ra trong lá cây nêu trên phản ánh thay đổi tương ứng tương tự về lượng của axit đó trong hạt. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, phương pháp sàng lọc thực vật *Brassica* cho cá thể dòng thực vật cho hạt có hàm lượng axit béo nội sinh chứa ít nhất 68% axit oleic và ít hơn 3% axit linolenic theo khối lượng là bằng cách phân tích mô ở lá cây. Ngoài ra, mô ở lá cây có thể được phân tích về thành phần axit béo bằng phương pháp sắc ký khí

lông, trong đó việc chiết tách axit béo có thể được thực hiện theo các phương pháp như phân tích hạt theo khối hoặc phân tích một nửa số hạt.

Theo các phương án thay thế, sáng chế đề xuất thực vật *Brassica*, có thể là thực vật *Brassica juncea*, chứa các alen của gen được mô tả trước đây từ các dòng *Brassica juncea*. Theo một số phương án, thực vật có thể là đồng hợp tử ở các locus *fad2-a* và *fad3-a* được thể hiện bằng các alen đột biến. Theo một phương án bổ sung, thực vật *Brassica juncea*, tế bào thực vật, hoặc phần của chúng, chứa alen của gen có trình tự axit nucleic từ trình tự được mô tả từ trước được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, sáng chế có thể liên quan đến việc phân biệt HOLL, chất lượng dầu *Brassica juncea* theo sáng chế ($\geq 68\%$ axit oleic và $\leq 5\%$ axit linolenic) so với hàm lượng axit oleic thấp/axit linolenic cao của *Brassica juncea* (khoảng 45% axit oleic và khoảng 14% axit linolenic) bằng cách kiểm tra sự có mặt hoặc vắng mặt của gen *BJfad2b* (tham khảo xem đơn Mỹ số 20030221217, Yao et al.). Việc phân biệt này có thể liên quan đến việc khẳng định là gen *BJfad2a* là gen desaturaza axit béo oleat chức năng duy nhất ở dòng *Brassica juncea* cây cải dầu chất lượng, như đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án, dòng *Brassica juncea* chứa các gen *fad2* và *fad3* gen, như được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số US 2006/0248611 A1, đã được nêu ví dụ ở các FIG. 1 và 3 trong đó. Các gen *fad2* và *fad3* được nêu ví dụ trong bản mô tả này là các SEQ ID NO:1-4. Các alen thu được mã hoá protein desaturaza axit béo delta-12, được nêu ví dụ ở FIG. 2 của công bố đơn quốc tế số US 2006/0248611 A1. Theo các phương án khác, dòng *Brassica juncea* có thể chứa đột biến ở locus gen *fad2-a* và *fad3-a* và alen đột biến thu được có thể mã hoá một hoặc nhiều đột biến trong trình tự của của các protein BJFAD2-a và BJFAD3-a dự đoán. Ví dụ đại diện về gen đột biến *fad2-a* và *fad3-a* và protein thích hợp để sử dụng theo sáng chế còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số các gen được bộc lộ trong: công bố đơn quốc tế số WO 2006/079567 A2 (ví dụ, FIG. 1 và 2), như SEQ ID NO:8 và 9; công bố đơn quốc tế số WO 2007/107590 A2, như SEQ ID NO:10-21; patent Mỹ No. 6,967,243 B2 (ví dụ, FIG. 2 và 3), như SEQ ID NO:22-27; và công bố đơn châu Âu số 1 862 551 A1 (ví dụ, FIG. từ 1 đến 10), như SEQ ID NO:28-39.

Theo các phương án chọn lọc, sáng chế đề xuất trình tự ADN được phân tách chứa khung đọc mở đầy đủ (ORF) và/hoặc vùng phía trước đầu 5' của các gen *fad2* và *fad3* đột biến được bộc lộ trước đây. Sáng chế theo đó còn đề xuất trình tự polypeptit của protein đột biến được dự đoán, chứa đột biến từ alen đột biến được mô tả trước đây. Đã biết rằng các desaturaza liên kết với màng, như FAD2, có các hộp histidin bảo toàn. Các thay đổi gốc axit amin nằm ngoài các hộp histidin này cũng có thể ảnh hưởng đến hoạt tính enzym FAD2 (Tanhuanpoo et al., *Molecular Breeding* 4:543-550, 1998).

Theo một khía cạnh của sáng chế, các alen đột biến được đề xuất ở đây có thể được sử dụng trong phương pháp nhân giống thực vật. Cụ thể, các alen theo sáng chế có thể được sử dụng để nhân giống loài *Brassica* cho axit oleic hàm lượng cao, như *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Brassicarapa*, *Brassicanigra* và *Brassica carinata*. Sáng chế đề xuất gen đánh dấu phân tử để phân biệt các alen đột biến với các trình tự thay thế. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích phân ly và chọn lọc các cây lai di truyền của thực vật có alen theo sáng chế. Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp phân tích phân ly và chọn lọc các thế hệ con thu được từ các cây lai di truyền liên quan đến thực vật có alen theo sáng chế.

Theo các phương án thay thế, sáng chế đề xuất các phương pháp nhận diện thực vật *Brassica*, như thực vật *Brassica juncea*, với thành phần axit béo mong muốn hoặc đặc tính hệ gen mong muốn. Ví dụ, các phương pháp theo sáng chế có thể liên quan đến xác định sự có mặt trong hệ gen của alen FAD2 và/hoặc FAD3 cụ thể, như alen theo sáng chế hoặc alen J96D-4830/BJ*fad2a* kiểu dại. Theo các phương án cụ thể, các phương pháp này có thể bao gồm việc nhận diện sự có mặt của hiện tượng đa hình axit nucleic liên quan đến một trong số các alen được nhận diện hoặc phần quyết định tính kháng nguyên liên quan đến một trong số các alen theo sáng chế. Ví dụ, việc xác định như vậy có thể đạt được nhờ hàng loạt các kỹ thuật, như khuếch đại PCR mảnh AND liên quan, kỹ thuật dấu vân tay ADN, kỹ thuật dấu vân tay ARN, kỹ thuật thẩm tách gen và phân tích RFLP, thử nghiệm bảo vệ nucleaza, tạo trình tự đoạn axit nucleic liên quan, tái tạo kháng thể (đơn dòng hoặc đa dòng), hoặc các phương pháp thay thế thích hợp để phân biệt protein tạo ra bởi alen liên quan với các biến thể hoặc các dạng kiểu dại khác của protein đó. Sáng chế còn đề xuất phương pháp nhận diện thực vật *B.*

juncea, mà hạt của nó có hàm lượng axit béo nội sinh chứa ít nhất 68% axit oleic theo khối lượng, bằng cách xác định sự có mặt của các alen đột biến theo sáng chế.

Theo các phương án thay thế, sáng chế đề xuất thực vật *Brassica* chứa các trình tự mã hoá *fad2* và *fad3* mã hoá các protein FAD2 và FAD3 đột biến. Các protein FAD2 và FAD3 đột biến này có thể chứa chỉ một thay đổi axit amin so với protein FAD2 kiểu dại. Theo các phương án đại diện, các dòng *Brassica juncea* khác nhau chứa protein FAD2 đột biến được mô tả trước đây, được mã hoá bởi các alen được mô tả trước đây. Có thể chọn lọc các alen như vậy để là hữu hiệu mang lại hàm lượng axit oleic tăng lên và hàm lượng axit linolenic giảm đi cho thực vật theo sáng chế. Theo các phương án cụ thể, alen mong muốn có thể được đưa vào thực vật theo các kỹ thuật nhân giống. Theo các phương án thay thế, các alen theo sáng chế có thể được đưa vào theo các kỹ thuật sinh học phân tử, bao gồm biến nạp thực vật. Theo các phương án như vậy, các thực vật theo sáng chế có thể cho hạt có hàm lượng axit béo nội sinh chứa: ít nhất khoảng 68% axit oleic khối lượng và ít hơn khoảng 3% axit linolenic theo khối lượng, hoặc ngưỡng hàm lượng axit oleic và axit linolenic bất kỳ khác như được nêu trên. Thực vật theo sáng chế có thể còn chứa trong khoảng từ 68% đến khoảng 85% khối lượng axit oleic, trong khoảng từ 70% đến khoảng 78% axit oleic, và trong khoảng từ 0,1% đến khoảng 3% axit linoleic, trong đó thành phần dầu có nguồn gốc di truyền từ dòng cây bố mẹ. Thực vật theo sáng chế cũng có thể có tổng lượng hàm lượng axit béo từ nhỏ hơn 7,1% đến nhỏ hơn khoảng 6,2% khối lượng. Theo một phương án, thực vật này tạo ra hạt có hàm lượng axit béo nội sinh chứa ít nhất khoảng 68% axit oleic và ít hơn 3% axit linoleic, trong đó thành phần dầu có nguồn gốc di truyền từ dòng cây bố mẹ.

Theo các phương án chọn lọc, sáng chế đề xuất hạt *Brassica*, mà có thể là hạt cây *Brassica juncea*, có hàm lượng dầu nội sinh có thành phần axit béo được nêu trong một hoặc nhiều các phương án nêu trên và trong đó yếu tố quyết định di truyền cho hàm lượng dầu nội sinh là thu được từ các alen đột biến theo sáng chế. Các hạt như vậy có thể, ví dụ, được thu nhận bằng cách tự thụ phấn mỗi trong số các dòng alen đột biến theo sáng chế. Theo cách khác, hạt như vậy có thể ví dụ được thu nhận bằng cách lai các dòng alen đột biến với cây bố mẹ thứ hai, tiếp theo là chọn lọc, trong đó cây bố mẹ thứ hai này có thể là các dòng *Brassica* bất kỳ khác như dòng *Brassica juncea*, là

một *Brassica juncea* có bản chất cây cải dầu hoặc *Brassica juncea* không có bản chất cây cải dầu, hoặc các *Brassica* bất kỳ khác như *Brassica napus*, *Brassicarapa*, *Brassicanigra*, và *Brassicacarinata*. Các kỹ thuật nhân giống này là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo các phương án thay thế, sáng chế đề xuất thực vật ổn định về mặt di truyền thuộc giống *Brassica*, như thực vật *Brassica juncea* mà phát triển cho hạt trưởng thành có thành phần được bộc lộ trong một hoặc nhiều phương án nêu trên. Thực vật như vậy có thể thu được từ các dòng *Brassica juncea* có các alen đột biến theo sáng chế. Thành phần dầu của thực vật như vậy có thể thu được bằng cách di truyền từ các dòng cây bố mẹ.

Theo các phương án thay thế, sáng chế đề xuất quy trình tạo ra thực vật *Brassica* ổn định về mặt di truyền, như thực vật *Brassica juncea*, tạo ra hạt trưởng thành có hàm lượng axit béo nội sinh có thành phần được quy định cho một hoặc nhiều phương án nêu trên. Các quy trình theo sáng chế có thể bao gồm các bước sau: lai gen Omega 9 (ví dụ, *fad2a* và *fad3a*) từ *Brassica napus* với thực vật *Brassica* khác, như *Brassica juncea*, để tạo ra thế hệ con F₁. Thế hệ con F₁ này có thể được nhân lên, ví dụ bằng cách có thể bao gồm tự thụ phấn hoặc phát triển của thực vật đơn bội kép. Bằng cách kết hợp các alen FAD2 đột biến và alen FAD3 đột biến, thực vật có alen gen đột biến kép (*fad2* và *fad3*) có thể có profin axit béo trong dầu tốt hơn thực vật có một đột biến bất kỳ. Thế hệ con thu được có thể được chọn lọc tìm ra thực vật ổn định về mặt di truyền tạo ra hạt có thành phần được bộc lộ trong một hoặc nhiều phương án nêu trên. Các hạt như vậy ví dụ, có thể có profin axit béo ổn định bao gồm hàm lượng của tổng các axit béo bão hoà nằm trong khoảng từ 7,1% đến khoảng 6,5% trong tổng lượng dầu chiết được. Ở một số biến thể, chính thế hệ con có thể tạo ra hạt hoặc dầu có thành phần như được nêu trên cho các phương án thay thế có hàm lượng axit oleic cao hơn khoảng 68% khối lượng và hàm lượng axit linolenic nhỏ hơn khoảng 3% khối lượng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thực vật có kiểu hình ổn định, có tính di truyền về hàm lượng axit oleic cao và hàm lượng axit linolenic thấp. Ví dụ, kiểu hình

hàm lượng axit oleic cao và hàm lượng axit linolenic thấp tạo ra từ các alen đột biến theo sáng chế là có tính di truyền gen qua các thế hệ M2, M3, và M4.

Theo các phương án thay thế, sáng chế đề xuất thực vật *Brassica juncea* trong đó hoạt tính desaturaza axit béo được biến đổi, hàm lượng axit oleic được biến đổi, hoặc hàm lượng axit linolenic được biến đổi so với *B. juncea* kiểu dại được sử dụng trong thử nghiệm đột biến. Thuật ngữ desaturaza axit béo (“FAD”), dùng để chỉ rằng protein thể hiện hoạt tính đưa một liên kết đôi vào quá trình sinh tổng hợp axit béo. Ví dụ, enzyme FAD2/FAD3 có thể đặc trưng ở hoạt tính đưa liên kết đôi thứ hai vào quá trình sinh tổng hợp axit linoleic từ axit oleic. Hoạt tính desaturaza được biến đổi này có thể bao gồm sự tăng, sự giảm hoặc hạn chế hoạt tính desaturaza so với thực vật, tế bào hoặc mẫu tham chiếu.

Theo các khía cạnh khác, sự khử hoạt tính desaturaza có thể bao gồm hạn chế biểu hiện của trình tự axit nucleic mã hoá desaturaza, như trình tự axit nucleic theo sáng chế. Cụm từ hạn chế biểu hiện dùng để chỉ trong bản mô tả này là trình tự axit amin chức năng được mã hoá bởi trình tự axit nucleic không được sinh ra ở mức có thể phát hiện được. Việc khử hoạt tính desaturaza có thể bao gồm việc hạn chế sự phiên mã của trình tự axit nucleic mã hoá desaturaza, như trình tự theo sáng chế mã hoá enzyme FAD2 hoặc enzyme FAD3. Cụm từ hạn chế sự phiên mã trong bản mô tả này dùng để chỉ rằng trình tự ARN thông tin được mã hoá bởi trình tự axit nucleic này không được phiên mã ở mức có thể phát hiện được. Việc khử hoạt tính desaturaza cũng có thể bao gồm việc tạo ra trình tự axit amin bị cắt ngắn từ trình tự axit nucleic mã hoá desaturaza. Sự sản xuất trình tự axit amin bị cắt ngắn trong bản mô tả này dùng để chỉ rằng trình tự axit amin được mã hoá bởi trình tự axit nucleic mất một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin chức năng được mã hoá bởi trình tự axit nucleic kiểu dại. Ngoài ra, sự khử hoạt tính desaturaza có thể bao gồm việc sản xuất trình tự axit amin desaturaza biến thể. Sản xuất trình tự axit amin biến thể trong bản mô tả này dùng để chỉ rằng trình tự axit amin này có một hoặc nhiều axit amin khác với trình tự axit amin được mã hoá bởi trình tự axit nucleic kiểu dại. Như được bàn luận chi tiết hơn trong bản mô tả này, sáng chế bộc lộ rằng các dòng đột biến theo sáng chế tạo ra enzyme FAD2 và FAD3 với các axit amin biến thể so với dòng kiểu dại J96D-4830.

Nhiều dạng đột biến có thể được đưa vào trình tự axit nucleic để làm giảm hoạt tính desaturaza, như đột biến xô dịch khung, thay thế và làm khuyết đoạn.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất trình tự polypeptit FAD2/FAD3 mới, mà có thể được cải biến theo các phương án khác theo sáng chế. Trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rằng có thể thực hiện một số cải biến và thay đổi về cấu trúc polypeptit mà về cơ bản không làm biến đổi chức năng sinh học của peptit để thu được polypeptit tương đương về mặt sinh học. Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “thay thế axit amin bảo toàn” dùng để chỉ việc thay thế một axit amin bằng một axit amin khác ở một vị trí nhất định trong peptit, trong đó việc thay thế có thể được thực hiện mà không làm mất hoặc thu được chức năng bất kỳ ở mức đánh giá được, để thu được polypeptit tương đương về mặt sinh học. Để thu được các thay đổi như vậy, việc thay thế các gốc axit amin tương tự có thể được thực hiện dựa trên mức tương tự tương đối của các phân tử thể ở mạch bên, ví dụ, kích thước, điện tích, mức độ kỵ nước, mức độ ưa nước của chúng, và các yếu tố tương tự, và có thể đánh giá các thay thế như vậy về tác động của chúng đến chức năng của peptit bằng thử nghiệm thông thường. Ngược lại, như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “thay thế axit amin không bảo toàn” dùng để chỉ việc thay thế một axit amin bằng axit amin khác ở một vị trí nhất định trong peptit, trong đó việc thay thế này làm mất hoặc thu được chức năng bất kỳ ở mức đánh giá được của peptit, để thu được polypeptit mà không tương đương về mặt sinh học.

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 metyl 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 dòng 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 dòng 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 cây cải dầu, trong đó hạt cây 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 cây cải dầu tạo ra từ thực vật chứa chất mầm nguyên sinh theo sáng chế, và bột chứa hạt của thế 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 này 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 curo sở lưu huỳnh. Khi nghiền lá hoặc hạt cây 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 cây 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 ω -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 tổn 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, a 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 thực).

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 chứng 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. Đ 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* 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 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 profin) 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 F₁ để tạo ra hạt F₂. Sau đó, có thể thực hiện phép lai ngược để thu được các dòng thể hiện đặc tính thành phần hạt mong muốn(s). 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 thể 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 phấn, 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* 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, ecdysteroid 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 sừng 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 alfalfa, 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 tố 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 ò-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

ngĩa 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 ổ-amylaza cây lúa mạch); và Fisher et al. (1993) Plant Physiol. 102:1045 (enzym II tạo mạch nhánh tinh bột ở nội nhũ ngô))*).*

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 hoạ 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 và giá trị dinh dưỡng của các dòng và cây lai ECM theo sáng chế. Các thử nghiệm được thực hiện trên hạt nguyên chưa xử lý, bột được xử lý một phần và bột được xử lý 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 các trường đại học 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 các trường đại học 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 trường University of Illinois.Tóm tắt sự khác biệt về thành phần dinh dưỡng giữa các dòng ECM (khoảng hoặc giá trị 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
Đường, %	7	7
Lysin, %	2,46	2,07
Lysin, % protein thô	5,6	5,6
Độ khả dụng 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 cho 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 thể hiện 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 mức protein cao hơn. Độ tiêu hoá axit amin ở 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 mức hàm lượng của lignin/polyphenol thấp hơn khoảng 2% điểm, xenluloza thấp hơn 1% điểm, ADF còn lại thấp hơn 3% điểm (3% điểm), và ADF thấp hơn 5% điểm.

Hàm lượng protein cao hơn và hàm lượng thành phần xơ thấp hơn tương ứng với mức năng lượng sinh học tăng lên khoảng 10% ở các dòng ECM này. Các dòng này cũng cho hàm lượng phospho cao hơn, là một chất dinh dưỡng đất liền để bổ sung vào thức ăn cho động vật. Hàm lượng protein (axit amin), năng lượng và phospho cao hơn tương ứng với sự tăng khoảng 20-32% về giá trị (\$/t) của bột cải dầu dùng làm thức ăn gia súc cho lợn và gia cầm, như được phản ánh ở cơ hội tăng giá cho thức ăn tăng trọng gia súc cho gà giò và lợn thiếu. Bảng 1.

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

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

Chất liệu

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

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

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

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 thử nghiệm

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 để 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. LT dòng ECM thử nghiệm (CL44864)

Tạo vảy

Quá trình tạo vảy được thực hiện để phá vỡ các tế bào dầu và tạo ra vảy mỏng có diện tích bề mặt lớn để nấu/ép sơ bộ bằng cách chuyển hạt qua dãy các ống cuộn tròn. Chiều dày và độ ẩm của vảy 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 vảy bằng cách áp dụng thiết lập khe lăn tối thiểu. Chiều dày vảy 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. LT dòng ECM thử nghiệm (CL44864) | 0,21 – 0,23 mm |

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

Vảy: Đường kính 14” x chiều rộng 28” với model xay vảy 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 vảy mềm dẻo và làm tăng hiệu quả của bộ phận giải phóng bằng cách làm giảm độ nhớt của dầu chứa trong đó. Ngoài ra, còn thực hiện quá trình nấu để khử hoạt tính enzym ở trong hạt. Nồi nấu này được gia nhiệt sơ bộ trước khi bắt đầu mỗi lần vận hành. Áp suất hơi được điều chỉnh trong quá trình vận hành để duy trì nhiệt độ vảy 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; có thể tác động hơi nước trực tiếp vào các chất trong thùng. Nồi nấu được lắp trên máy ép kiểu trục vít để cấp liệu 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 vận chuyển và làm khô khối vật liệu. Hạt được tạo vảy 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. Điều chỉnh tốc độ quay của vít khi vận hành là 17 vòng/phút.

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 hỗn hợp mỡ 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 ra vòng ngoài), tỷ số dung môi so với chất rắn khoảng 2,5:1 (khối lượng/khối lượng) 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 tốc độ chảy dung môi là 220 ± 10 kg/giờ).

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

Dầu thô này được khử dung môi trong thiết bị bay hơi dạng màng thẳng đứng và thiết bị bơm phun hơi nước.

Quá trình khử dung môi bã ép (chất rắn hexan) được thực hiện trong thiết bị sấy nhẹ - khử dung môi có 2 khay và xoắn vít Schnecken có lớp vỏ chứa hơi nước. Hơi phun được cho vào khay DT ở trên. Nhiệt độ đích ở các khay là như sau:

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

Bã lọc ép cây cải dầu lô không chế LT và dòng ECM thử nghiệm (CL44864) được chiết bằng iso-hexan/hexan trong 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 (khối lượng/khối lượng) 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 với thời gian lưu 110 phút và tốc độ chảy dung môi là 220 ± 10 kg/giờ).

Mẫu của vảy trắng (WF) dòng ECM thử nghiệm được tách ra trước khi khử dung môi, và làm khô trong không khí.

Dầu thô được khử dung môi trong thiết bị bay hơi dạng màng thẳng đứng và thiết bị bơm phun hơi nước.

Quá trình khử dung môi bã ép (chất rắn hexan) được thực hiện trong thiết bị sấy nhẹ - khử dung môi có 2 khay và xoắn vít Schnecken có lớp vỏ bọc hơi nước. Hơi nước được chuyển 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 sấy:	$93 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Bộ phận chiết: Tất cả các bộ phận chiết dạng vòng 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 dạng màng thẳng đứng (rising film evaporator) và thiết bị bơm phun hơi nước và quá trình khử dung môi bã ép (chất rắn cùng với dung môi) bằng cách sử dụng thiết bị sấy nhẹ - khử dung môi 2 khay và xoắn vít Schnecken có lớp vỏ bọc hơi nước. Dung môi thu hồi được thu gom và tuần hoàn.

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 $<12\%$.

Lô bột cải dầu chỉ 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 để 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: Thiết bị 600 lít Model FKM600-D (2Z) Littleford Reactor, serial #5132, Littleford Day, Florence, KY.

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. LT dòng ECM thử nghiệm (CL44864).
3. Không chế LT.

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

Ví dụ 3: Quá trình tạo vảy trắng Indianapolis

Hạt cải dầu theo sáng chế có thể được xử lý để tạo ra vảy trắng cây cải dầu 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 vảy bằng máy nghiền cà phê 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, Örebro, Sweden). Bã lọc ép thu được từ máy ép 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 lọc 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 lọc 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 khử dung môi trong không khí trong thời gian 24 giờ trước khi nghiền. Sau đó, vảy trắng đã được khử dung môi được nghiền bằng cách sử dụng, ví dụ, Robot Coupe R2N Ultra B (Jackson, MS).

Ví dụ 4: Phân tích mẫu

Phân tích hoá học và 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 hoạt động theo cơ chế cao áp (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 đã thuỷ phân bằng axit (AEE) được xác định bằng phương pháp thuỷ phân bằng axit 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 Elementar Rapid N-cube protein/nitrogen apparatus (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. Holst filtration apparatus for Van Soest detergent fiber analysis. 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. trang 43-85 trong 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 plasma kết hợp cảm ứng Inductive Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) [phương pháp 985.01 (A, B, và C);

AOAC Int.], và phytat theo Ellis et al (1977. Quantitative determination of phytate in the presence of high inorganic phosphate. Anal.Biochem. 77:536-539.)

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

Thành phần dinh dưỡng của bột cải dầu ECM được sấy khô nhẹ được tạo ra ở nhà máy thử nghiệm và bột cải dầu thông thường. 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/sấy khô nhẹ sau khi chiết tách dầu bằng dung môi ra khỏi hạt. Quy trình này và các mẫu thu được được gọi là “vảy trắng Indianapolis”. Các thông số xử lý được phác thảo ở Ví dụ 3. Các mẫu vảy trắng Indianapolis ECM này được thử nghiệm ở các trường đại học Illinois và Missouri và kết quả được trình bày ở các Bảng 2a, 2b, và 2c. Bột cải dầu đối chứng là bột cải dầu được điều chế công nghiệp đã qua sấy khô nhẹ. Các giá trị được thể hiện là tính trên chất khô, nhưng bao gồm dầu.

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

Thành phần, % DM, bao gồm đầu	44864 (2010)	44864 (2011)	121460 (2011)	121466 (2011)	65620 (2011)	Bột cải đầu thông thường	Trung bình ECM	Bột cải đầu ECM
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
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
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 vảy trắng Indianapolis ECM từ các trường đại học Illinois và Missouri có kết quả tương tự với dạng nguyên hạt từ trường đại học University of Manitoba. Hàm lượng oligosacarit là thấp hơn và hàm lượng 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 điểm thu hoạch.

Hàm lượng 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, khi sử dụng phương pháp xử lý vảy trắng Indianapolis, là tương tự với các kết quả thu được với dạng nguyên hạt. Giá trị NDF 33% của bột thương mại là ở đầu mút cao hơn của phạm vi thông thường.

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

Thành phần, % DM, bao gồm dầu, % CP	44864 (2010)	44864 (2011)	121460 (2011)	121466 (2011)	65620 (2011)	Bột cải dầu thông thường	Trung bình ECM	Bột cải dầu thông thường ECM
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								
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

Thành phần, % DM, bao gồm dầu, % CP	44864 (2010)	44864 (2011)	121460 (2011)	121466 (2011)	65620 (2011)	Bột cải dầu thông thường	Trung bình ECM	Bột cải dầu thông thường ECM
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 coi 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 ở Bảng 2b cho thấy là thành phần axit amin (theo phần trăm protein thô) là tương tự nhau với cả mẫu vảy trắng Indianapolis ECM và bột thương mại cải dầu. Kết quả này cho thấy là vì lượng protein ở các dòng ECM 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 vảy 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	Trung bình ECM	Bột cải dầu thông thường ECM
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 vảy 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 thử nghiệm POS ở Saskatoon, Canada để mô phỏng quá trình chế biến thương mại

Trong quá trình chuẩn bị đánh giá giá trị làm thức ăn cho động vật của ECM, đã xác định được rằng các mẫu bột cải dầu phải được chế biến ở điều kiện xử lý thương mại, vì quá trình chế biến có ảnh hưởng đến giá trị dinh dưỡng. Theo đó, các mẫu được chế biến tại Nhà máy thử nghiệm POS ở Saskatoon. Hai điều kiện chế biến được áp dụng: nhiệt độ thường (HT) trong thiết bị khử dung môi/thiết bị sấy khô nhẹ và nhiệt độ thấp hơn (LT), để đảm bảo rằng điều kiện chế biến không có ảnh hưởng quá lớn đến giá trị dinh dưỡng. Điều kiện chế biến 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 chế biến ở điều kiện chế biến thương mại mô phỏng ở Nhà máy thử nghiệm POS ở Saskatoon, Canada. (Các phép phân tích được thực hiện ở các trường đại học 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
Đường & Sucroza	6,9	7,1	6,7
Oligosacarit	0,45	1,57	1,55
NDF	20,8	27,0	28,1

Thành phần, theo %	44864 (2010) LT	Bột cải dầu LT	Bột cải dầu HT
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 chế biến thử nghiệm cho thành phần tương tự với các mẫu nguyên hạt và các mẫu vảy trắng Indianapolis, và sự khác biệt giữa mẫu ECM và mẫu cải dầu thông thường là phù hợp với phân tích như được thể hiện trong Bảng 2a và 2b: protein 7% điểm cao hơn, ADF thấp hơn 5% điểm, lignin & polyphenol thấp hơn 4% điểm và phospho cao hơn 0,35% điểm.

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 từ vụ 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 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 thể hiện trong các 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)	121460 (2011)	121466 (2011)	65620 (2011)	Thành phần CGC (2011)	Trung bình ECM	Thành phần CGC của ECM
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
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
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

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 đặc điểm thông thường của bột cải dầu thương mại). Xem Bảng 4a, 4b. Lượng protein cao hơn dường như có thể được giải thích là do lượng lignin và polyphenol thấp hơn 2% ở ECM và ADF còn lại (ADF – lignin/polyphenol – xenluloza) thấp hơn 3%. ADF còn lại có thể là kết hợp của các hợp phần glycoprotein và hemi-xenluloza. Thành phần xơ chủ yếu có mặt trong trong tế bào và vỏ ngoài. Hàm lượng phospho của ECM là cao hơn gần 30% so với 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 enzyme phytaza trong thức ăn cho động vật sẽ chuyển phospho này thành dạng dùng được cho động vật. Bảng 4b đưa ra 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)	12146 0 (2011)	12146 6 (2011)	65620 (2011)	Thành phần CGC (2011)	Trung bình ECM	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 độ khả dụng năng lượng và axit amin trong hợp phần thức ăn gia súc cho gia cầm ở nhiều nơi trên thế giới, bao gồm ở Mỹ.

Gà Leghorn SCWL (SCWL: single comb white leghorn) trưởng thành được dùng làm động vật thử nghiệm lựa chọn trong các nghiên cứu biệt lập 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 gà 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 để định lượng. Sau khi gom, chất bài tiết được làm khô trong lò không khí đối lưu, thông thường ở nhiệt độ 80°C. Sau đó, cân và nghiền chất bài tiết này 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 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 của việc 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 thiên 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 chế độ ăn. Lợn sẽ được đưa vào lồng trao đổi chất được trang bị bộ cấp thức ăn gia súc và đồ uống kiểu 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 năng lượng duy trì ước tính (tức là ME 106 kcal cho một kg^{0,75}; NRC, 1998) cho con lợn nhỏ nhất cho mỗi thiết kế thử nghiệm 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 chế độ ăn, nước tiểu và phân được gom trong 5 ngày tiếp theo theo quy trình chuẩn sử dụng phương pháp từng điểm đánh dấu “marker to marker approach” (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 chế độ ăn, và phần nhỏ mẫu lấy ra sẽ được đem đi phân tích hoá học.

Các mẫu phân sẽ được làm khô trong lò không 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 phép đo nhiệt lượng cao áp (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 chế độ 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 tổn thất trong phân và trong nước tiểu, lần lượt, sẽ được tính toán, và mức DE và ME ở mỗi trong số 24 chế độ 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 chế độ ăn ngô cho tỷ lệ cho dùng ngô trong chế độ ăn này. Sau đó, các giá trị này sẽ được dùng để tính toán đóng góp của ngô vào DE và ME trong chế độ ăn ngô-bột cải dầu và trong chế độ ăn ngô-bột đậu nành, và sau đó DE và ME ở mỗi nguồn bột cải dầu và mẫu bột đậu nành sẽ được tính toán bằng sự khác biệt như được mô tả trên đây (Widmer et al., 2007).

Số liệu sẽ được phân tích bằng cách sử dụng quy trình Proc Mixed Procedure ở SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Số liệu thu được cho mỗi chế độ ăn và cho mỗi thành phần sẽ được so sánh bằng cách sử dụng ANOVA. Tính thuần nhất của phương sai sẽ khẳng định bằng cách quy trình UNIVARIATE trong Proc Mixed. Chế độ ăn hoặc thành phần sẽ là tác động cố định và lợn và mẫu lặp 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 câu lệnh 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 hoạch định vuông Latin 6 x 6 lặp lại 6 chế độ 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 kiểu núm vú được lắp đặt ở mỗi trong số các chuồng này.

Sáu chế độ ăn được chuẩn bị. 5 chế độ 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 chế độ ăn này. Chế độ ăn cuối cùng là chế độ 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 vào trong tất cả các chế độ ăn để đáp ứng hoặc lớn hơn nhu cầu hiện tại ước tính cho lợn đang lớn (NRC, 1998). Tất cả chế độ ăn còn chứa 0,4% crom oxit 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 cung 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 nghi với chế độ ăn. Các mẫu tiêu hoá ở ruột hồi được gom trong 8 giờ vào ngày 6 và 7 theo quy trình chuẩn. Túi làm bằng chất dẻo được gắn với đường nối ống thông bằng cách sử dụng dây buộc treo, 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 qua đêm và sáng hôm sau, và chế độ ăn thử nghiệm mới được cung cấp.

Vào cuối thử nghiệm, các mẫu ruột hồi được làm tan băng, thu gom trong động vật và chế độ ăn, và mẫu nhỏ được thu gom cho phân tích hoá học. Mẫu của mỗi chế độ ăn và của mỗi trong số các mẫu bột cải dầu và SBM cũng được thugom.

Các mẫu tiêu hoá được làm đông khô nhanh và được nghiền mịn trước khi phân tích hoá học. Tất cả các mẫu của chế độ 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: apparent ileal digestibility) của axit amin trong mỗi chế độ ăn được tính toán bằng cách sử dụng phương trình [1]:

$$\text{AID, (\%)} = [1 - (\text{AAd}/\text{AAf}) \times (\text{CrF}/\text{CrD})] \times 100, \quad [1]$$

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, Crf là nồng độ crom trong DM thức ăn, 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 là chế độ ăn không có N bằng cách sử dụng phương trình [2]:

$$\text{IAA}_{\text{end}} = \text{AAd} \times (\text{CrF}/\text{CrD}) \quad [2]$$

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]:

$$\text{SID, (\%)} = \text{AID} + [(\text{IAA}_{\text{end}}/\text{AA}_f) \times 100] \quad [3]$$

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 chế độ 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 tại chỗ 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 có thể hoà tan và phân huỷ và xác định mức độ giảm chất lượng (Kd) của phần có thể phân huỷ.

Gia súc sẽ được cho ăn hỗn hợp chế độ 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 ướt, 5,6% hạt vảy nguyên, 3,7% vỏ ngoài đậu tương, và 7,0% nguồn cung cấp bổ sung (protein, chất khoáng, 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 bản sao sẽ được bỏ ra 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 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) (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 phân huỷ được 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 được điều chỉnh phù hợp với phương trình phi tuyến tính được mô tả bởi 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 là phần CP hoà tan (% của CP), B phần CP có tiềm năng phân huỷ (% của CP), K_d 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 được 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) cho bò sữa năng suất cao tiêu thụ chế độ ăn lactat hoá điển hình. Vì mục đích của nghiên cứu này là so sánh nguồn protein và đánh giá khả năng 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 các trường đại học 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 and University of Georgia.

Mẫu	TME, kcal/kg DM U của Illinois	TME, kcal/kg DM U của 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%)
Vảy trắng (WF) ECM		2199 a (91)
Vảy trắng (WF) bột cải dầu		1899 b (51)
WF ECM – WF bột cải dầu		300 (16%)
Các mẫu vảy 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 các 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. Vảy 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 giai đoạn DT. TME ở gia cầm cho các bột WF này 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 xử lý vảy 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 có thể 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 (bột hạt nhỏ có hai mức không):

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

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 so với 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 (trưởng 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):

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

Phương trình EEC là phương trình “phân bố dương tính” cho giá trị thành phần dinh dưỡng tiêu hóa được trong bột cải dầu, như protein, chất béo, tinh bột và 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 hóa 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 là tổng năng lượng 4 calo cho một gam protein $\times 80\%$ độ tiêu hóa protein $\times 5\%$ tổn thất do bài tiết nitơ = khoảng 75% calo tổng cho một gam (3 calo năng lượng chuyển hóa được cho một gam hoặc $30 \times \%$ protein. Phép tính này cho năng lượng chuyển hóa 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 hóa 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 chế biến ở POS được phân tích vì mức tiêu hoá axit amin cao hơn nhiều của vảy trắng so với bột cải dầu được sấy khô nhẹ 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 các axit amin quan trọng ở bột cải dầu ECM và bột cải dầu thông thường được điều chế ở POS trong các nghiên cứu

Axit amin, % TAAA	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 University of Illinois. Bột điều chế ở Nhà máy thử 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 ở bột cải dầu ECM và bột cải dầu thông thường được chế biến ở POS trong nghiên cứu ở University of Illinois

Axit amin, % tiêu hóa được	AID	AID	AID		SID	SID	SID
	ECM LT	CM LT	CM HT		ECM LT	CM LT	CM 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 ký hiệu khác nhau là khác nhau đáng kể ($p < 0,05$)

Nhận thấy có một số 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 SID protein 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 = $4151 - (122 \times \%Tro) + (23 \times \%CP) + (38 \times \%EE) - (64 \times \%CF)$

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

Phương trình Noblet là kết hợp của cả yếu tố đóng góp dương tính và âm tính: chất béo, protein và tinh bột có 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 thực (NE), nhưng có thể nhận thấy sự khác biệt giữa bột ECM và bột cải dầu bởi sự khác biệt về ADF. Vì tinh bột và tro là giống nhau trong bột ECM và bột cải dầu, nên sự khác biệt quan trọng là ADF. ADF thấp hơn 5% điểm 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 có thể là có sự tăng năng lượng thực ở lợn 200 kcal/kg đối với ECM trên cơ sở “as is” (thực tế) (Bảng 1). Kết quả này dẫn đến sự tăng năng lượng khoảng 12%.

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 đo được 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. Chất mầm nguyên sinh cây cải dầu hạt đen mà mang đến cho hạt của cây cải dầu các tính trạng:

hàm lượng protein ít nhất 45% ;

hàm lượng xơ không hoà tan trong axit (ADF) không cao hơn khoảng 18% trên lượng chất khô không dầu;

dầu hạt này chứa ít nhất 68% hàm lượng axit oleic (C18:1) và hàm lượng axit linolenic (C18:3) ít hơn 3%; và

ít nhất một tính trạng bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm hàm lượng polyphenolic giảm và hàm lượng phospho tăng, khi được so sánh với cây cải dầu hạt màu đen của cùng loài.

2. Cây cải dầu hạt đen chứa chất mầm nguyên sinh theo điểm 1, trong đó các hạt được tạo ra từ cây này có hàm lượng protein thô ít nhất khoảng 45%, và hàm lượng xơ không hoà tan trong axit (ADF) không cao hơn khoảng 18% tính trên lượng chất khô không dầu.

3. Cây cải dầu hạt đen theo điểm 2, trong đó tính trung bình, cây cải dầu này cho hạt có hàm lượng axit eruxic nhỏ hơn 2%.

4. Cây cải dầu hạt đen theo điểm 2, tạo ra hạt chứa hàm lượng xơ không hoà tan trong axit thấp hơn 11% tính theo lượng chất khô không dầu.

5. Cây cải dầu hạt đen theo điểm 2, trong đó hạt nêu trên chứa ít nhất 43% dầu.

6. Cây cải dầu hạt đen theo điểm 2, trong đó hạt nêu trên chứa ít nhất 43% dầu và ít nhất 45% protein trên lượng chất khô không dầu.

7. Một nhóm nhiều cây cải dầu theo điểm 2, trong đó nhóm nhiều cây cải dầu này cho năng suất trung bình ít nhất 1700 kilogam hạt trên một hecta.

8. Cây cải dầu hạt đen theo điểm 2, trong cây này được chọn từ nhóm bao gồm CL065620, CL044864, CL121460H, CL166102H, và CL121466H.

9. Cây cải dầu hạt đen theo điểm 2, trong đó hạt có các thành phần kháng dinh dưỡng giảm được chọn từ nhóm bao gồm glucosinolat và phenolic, khi được so sánh với cây cải dầu hạt màu đen của cùng loài.

10. Cây cải dầu hạt đen theo điểm 2, trong đó cây cải dầu này cho hạt có hàm lượng phospho cao hơn 1,3% trên lượng chất khô không dầu.

11. Hạt cải dầu màu đen thu được từ cây cải dầu theo điểm 2.

12. Cây cải dầu hạt đen con cháu được trồng từ hạt theo điểm 11, trong đó các hạt được tạo ra từ cây này có hàm lượng protein thô ít nhất khoảng 45%, và hàm lượng xơ không hoà tan trong axit (ADF) không cao hơn khoảng 18% tính trên lượng chất khô không dầu.

13. Cây cải dầu hạt đen con cháu theo điểm 12, trong đó cây con cháu này tạo nên các hạt có, chứa ít nhất 68% hàm lượng axit oleic (C18:1) và hàm lượng axit linolenic (C18:3) ít hơn 3%, và các tính trạng có hàm lượng protein cao và hàm lượng xơ không hoà tan trong axit (ADF) thấp.

14. Bột cải dầu thu được từ một hoặc nhiều hạt theo điểm 11

15. Bột cải dầu theo điểm 14, trong đó bột này có năng lượng thuần chuyển hoá được trung bình là ít nhất 2400 kcal/kg.

16. Bột cải dầu theo điểm 15, trong đó bột này có profin tiêu hoá axit amin thuận lợi.

17. Bột cải dầu theo điểm 14, 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 .

18. Bột cải dầu theo điểm 14, 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..

19. Hạt cải dầu màu đen mà là ổn định về mặt di truyền chứa:

hàm lượng protein ít nhất 45% ;

hàm lượng xơ không hoà tan trong axit (ADF) không cao hơn khoảng 18% trên lượng chất khô không dầu;

dầu hạt này chứa ít nhất 68% hàm lượng axit oleic (C18:1) và hàm lượng axit linolenic (C18:3) ít hơn 3%; và

ít nhất một tính trạng bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm hàm lượng polyphenolic giảm và hàm lượng phospho tăng, khi được so sánh với cây cải dầu hạt màu đen của cùng loài, và là ổn định về mặt di truyền.

20. Bột cải dầu được tạo ra từ hạt cải dầu màu đen theo điểm 19.

21. Phương pháp đưa vào giống cây cải dầu ít nhất một tính trạng mong muốn được chọn từ nhóm bao gồm hàm lượng protein cao, hàm lượng ADF thấp, hàm lượng axit oleic (C18:1) ít nhất 68% và hàm lượng axit linolenic (C18:3) ít hơn 3% theo cách độc lập với màu vỏ hạt, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

lai cây cải dầu hạt đen theo điểm 3 với cây thuộc giống cây cải dầu khác thứ hai để tạo ra các cây thế hệ con F₁;

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 thể hệ con chọn lọc với cây cải dầu hạt đen theo điểm 2 để tạo ra các cây thể hệ con lai ngược;
 chọn lọc các cây thể hệ con lai ngược có các tính trạng và các đặc điểm sinh lý và hình thái mong muốn của giống cây cải dầu khác thứ hai để tạo ra các cây thể 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 thể hệ con lai ngược cận thân chọn lọc thể hệ thứ tư hoặc cao hơn mà có các tính trạng mong muốn.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó các tính trạng mong muốn gồm hạt có hàm lượng protein thô ít nhất khoảng 45% và hàm lượng xơ không hoà tan trong axit không cao hơn khoảng 18% tính theo lượng chất khô không dầu, và, tính trung bình, hàm lượng axit oleic (C18:1) ít nhất 68% và hàm lượng axit linolenic (C18:3) ít hơn 3%.

23. Bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao thu được trực tiếp từ hạt cây cải dầu chứa hàm lượng protein thô ít nhất khoảng 45% và hàm lượng xơ không hoà tan trong axit không cao hơn khoảng 18% tính theo lượng chất khô không dầu; dầu hạt này chứa, trung bình, hàm lượng axit oleic (C18:1) ít nhất 68% và hàm lượng axit linolenic (C18:3) ít hơn 3%, và ít nhất một loại được chọn trong số hàm lượng polyphenolic giảm và hàm lượng phospho tăng, khi được so sánh với cây cải dầu hạt màu đen của cùng loài.

24. Bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao theo điểm 23, trong đó tính trung bình, bột cải dầu này còn có hàm lượng protein thô ít nhất khoảng 49%.

25. Bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao theo điểm 23, trong đó hạt cây cải dầu màu đen là ổn định về mặt di truyền có ít nhất một tính trạng nữa được chọn từ nhóm bao gồm hàm lượng polyphenolic giảm và hàm lượng phospho tăng lên, khi được so sánh với cây cải dầu hạt màu đen của cùng loài.

26. Bột cải dầu có giá trị dinh dưỡng nâng cao theo điểm 23, trong đó hạt cây cải dầu màu đen còn chứa mức giảm của các thành phần kháng dinh dưỡng giảm được chọn từ nhóm bao gồm glucosinolat và phenolic, khi được so sánh với cây cải dầu hạt màu đen của cùng loài.

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

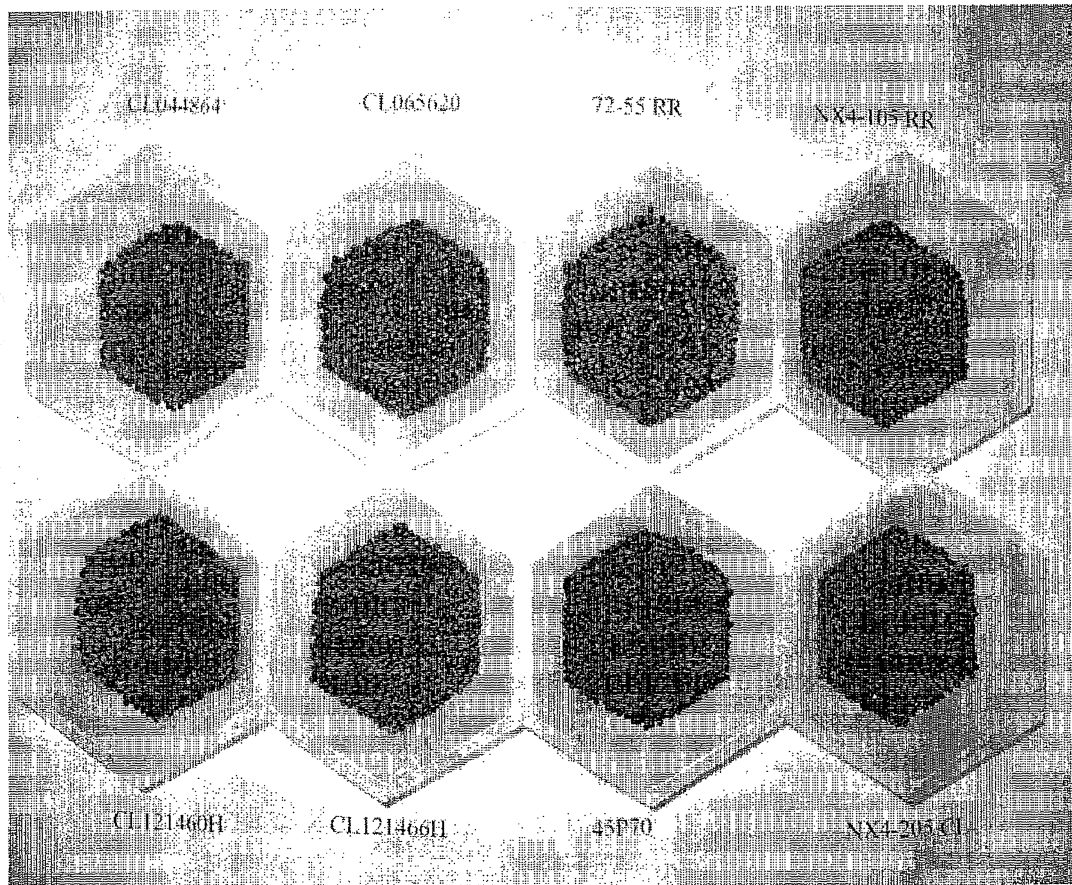


FIG. 2. Phân tích thành phần hạt từ các mẫu trồng trên cánh đồng

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% H₂O	Tổng glucosinolat NIR 10% H₂O	% ADF NIR 10% H₂O	% dầu của chất khô NMR	% Protein 10% H₂O	% ADF 10% H₂O	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.