



(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)



1-0038313

(51)⁷ A01N 1/02

(13) B

(21) 1-2018-05045

(22) 18/04/2017

(86) PCT/NO2017/050094 18/04/2017

(87) WO 2017/183990 26/10/2017

(30) 20160643 18/04/2016 NO

(45) 25/01/2024 430

(43) 25/01/2019 370A

(73) PLANKTONIC AS (NO)

Bynesveien, N-7018 Trondheim, Norway

(72) TOKLE, Nils Egil (NO); AAKERØY, Håvard Johan (NO).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN CRYO ĐỐI VỚI TRÚNG, ẤU TRÙNG NAUPLIUS VÀ/HOẶC CON NON CỦA CON HÀ, PHƯƠNG PHÁP TÁI SINH CÁC SINH VẬT ĐÃ ĐƯỢC BẢO QUẢN CRYO, VÀ SẢN PHẨM HOẶC THỨC ĂN ĐƯỢC BẢO QUẢN CRYO THU ĐƯỢC BẰNG PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp bảo quản bảo quản cryo đối với trứng, ấu trùng nauplius và con non của con hà (barnacles). Hơn nữa, sáng chế còn đề cập đến phương pháp tái sinh các sinh vật được bảo quản cryo và sản phẩm hoặc thức ăn được bảo quản cryo thu được bằng các phương pháp này. Các sinh vật được bảo quản là hữu dụng làm sinh vật thức ăn sống trong nuôi trồng hải sản thường để thay thế cho các loài trùng bánh xe và Artemia và các sinh vật làm thức ăn sống khác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp bảo quản bảo quản cryo quy mô lớn đối với trứng, ấu trùng nauplius và/hoặc con non của con hà (barnacles) như theo phần mở đầu của điểm 1. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp tái sinh các sinh vật được bảo quản cryo. Thêm nữa, sáng chế còn đề cập đến sản phẩm được bảo quản cryo hoặc thức ăn và việc sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ấu trùng cá biển là sớm phát triển khi chúng bắt đầu được nuôi dưỡng và phần lớn phụ thuộc vào các sinh vật làm thức ăn sống là khẩu phần thức ăn đầu tiên của chúng. Các khẩu phần ăn nhân tạo như các khẩu phần thức ăn khô được phát hiện là dưới mức tối ưu và thường dẫn đến tỷ lệ tử vong lớn và sự sinh trưởng giảm khi được sử dụng trong giai đoạn đầu tiên làm khẩu phần ăn cho ấu trùng cá biển. Có một số lý do cho thiếu sót này của các khẩu phần ăn nhân tạo trong giai đoạn cho ăn đầu tiên. Bên cạnh những lý do khác, lý do chính đối với thiếu sót này nói chung là do tỷ lệ ăn thấp đối với các loại môi không sống và khả năng tiêu hóa giảm, và cả sự mất giá trị dinh dưỡng của các loại thức ăn và tải lượng chất hữu cơ cao hơn trong nước. Do đó, việc cho ăn đầu tiên đối với ấu trùng cá biển phụ thuộc lớn vào nguồn cung môi sống, mà phải được bắt trong tự nhiên hoặc được nuôi trồng nhằm mục đích này. Các sinh vật thông thường nhất được sử dụng trong việc cho ăn đầu tiên đối với ấu trùng cá biển là tôm nước mặn *Artemia franciscana* và các chủng khác nhau của loài trùng bánh xe *Brachionus* sp. Các sinh vật này thường được nuôi cấy ở điểm nuôi trồng thủy sản và được làm thức ăn trực tiếp dưới dạng môi sống. Mặc dù đã được sử dụng rộng rãi nhằm mục đích này, giá trị dinh dưỡng của các sinh vật này vẫn dưới mức tối ưu để hỗ trợ sự sinh trưởng, phát triển và sống sót tối ưu của ấu trùng cá biển. Mặc dù các kỹ thuật làm giàu khác nhau đã được phát triển để cải thiện giá trị dinh dưỡng của chúng, như bằng dầu hàng hải có hàm lượng axit béo omega-3 cao, nhưng giá trị

khẩu phần ăn của chúng vẫn được xem là dưới mức tối ưu, thường dẫn đến tỷ lệ tử vong cao, sự sinh trưởng giảm và trong nhiều trường hợp dẫn đến sự phát triển không bình thường so với các khẩu phần ăn dựa trên môi được đánh bắt tự nhiên. Hơn nữa, sự nuôi trồng và làm giàu chúng là khó nhọc và tốn kém.

Khẩu phần ăn tự nhiên của ấu trùng cá biển nước lạnh thường là ấu trùng nauplius và các sinh vật giáp xác chân chèo nhỏ ở các giai đoạn khác nhau như *Acartia*, *Calanus finnmarchicus* v.v. Sử dụng sinh vật giáp xác chân chèo trong quá trình cho ăn đầu tiên dẫn đến tỷ lệ sinh trưởng cao có thể so sánh được và dẫn đến tỷ lệ sống sót tốt. Vì các sinh vật giáp xác chân chèo được xem như là khẩu phần ăn tối ưu nên các nỗ lực đã được thực hiện để cải thiện tính khả dụng của chúng. Một trong số các thử thách với việc sử dụng các sinh vật giáp xác chân chèo nhằm sử dụng cho việc cho ăn đầu tiên là việc đánh bắt tự nhiên chỉ có thể thực hiện trong các thời kỳ hạn chế nhất định trong năm khi có sự nở rộ các sinh vật này trên biển. Hơn nữa, chúng phải được sử dụng ngay vì rất khó dự trữ môi sống. Gần đây, các kỹ thuật đã được phát triển để nuôi trồng các sinh vật giáp xác chân chèo, nhưng kỹ thuật bảo quản, cụ thể là đối với các sinh vật đang sinh trưởng, vẫn là một thử thách.

Do đó, có nhu cầu lớn về các khẩu phần ăn môi sống khác trong quá trình cho ăn đầu tiên đối với ấu trùng cá biển. Cụ thể là, có nhu cầu đối với các khẩu phần thức ăn sống mà không phụ thuộc vào sự nuôi trồng tại chỗ các sinh vật môi hoặc không phụ thuộc vào sự đánh bắt tự nhiên phụ thuộc vào mùa vụ. Hơn nữa, do tài nguyên cá hạn chế trên biển và nhu cầu gia tăng trên toàn thế giới về nguyên liệu hải sản chất lượng cao, cụ thể là về các loại hải sản, có nhu cầu chung để khai thác các tài nguyên khác trên biển ngoài cá, đặc biệt là các sinh vật có mức độ dinh dưỡng thấp như các loài phù du và các động vật không xương sống ở biển chưa được khai thác. Để khai thác hiệu quả các tài nguyên này, phương pháp và kỹ thuật mới cần được phát triển.

Bảo quản cryo là việc sử dụng nhiệt độ rất thấp để bảo quản các tế bào và các mô và cả các sinh vật sống nguyên vẹn về mặt cấu trúc. Phương pháp này sử dụng hiệu ứng có lợi của nhiệt độ giảm để ngăn chặn chuyển động phân tử và kìm hãm các phản ứng chuyển hóa và sinh hóa. Các quy trình cụ thể là cần thiết để đạt được ưu điểm của các tác dụng bảo vệ ở nhiệt độ thấp và dự trữ thành công các tế bào, các mô hoặc các sinh vật trong thời gian dài dưới dạng được bảo quản cryo.

Phương pháp bảo quản cryo tìm cách đạt đến nhiệt độ thấp mà không gây ra hư hại do sự tạo thành đá trong quá trình làm đông lạnh. Một vấn đề quan trọng là hiệu lực của sự tái sinh sau này đối với các tế bào và các sinh vật được bảo quản.

Hầu hết các nghiên cứu trong lĩnh vực này gắn liền với việc bảo quản cryo đối với các tế bào, các mô, các giao tử (tinh trùng) và các phôi hầu hết là yếu tố quan trọng trong y học và nông nghiệp bao gồm các loài sinh vật có vú và cả từ các động vật có xương sống và các động vật không xương sống không phải là động vật có vú.

Các phương pháp bảo quản cryo thường dựa trên hai kỹ thuật khác nhau, là kỹ thuật làm đông lạnh chậm có kiểm soát và kỹ thuật làm đông lạnh rất nhanh (các kỹ thuật thủy tinh hóa) như trong nitơ lỏng. Việc áp dụng chất bảo quản cryo trong quy trình bảo quản sẽ làm giảm các tác dụng tiêu cực mà có thể diễn ra trong quá trình bảo quản cryo như các tác động hòa tan, sự tạo thành đá ngoại bào, sự dehydrat hóa và sự tạo thành đá nội bào.

Các chất bảo quản cryo thường được chia thành hai nhóm tùy thuộc vào vai trò và ứng dụng của chúng trong quy trình bảo quản. Chất bảo quản cryo nội bào có khối lượng phân tử thấp và thấm vào tế bào. Các chất bảo quản cryo nội bào như glyxerol và dimetyl sulfoxit thường được sử dụng ở nồng độ từ 0,5M đến 3M, nhờ đó chúng tối thiểu hóa các hư hại đối với tế bào trong nhiều hệ sinh học khi các tế bào được làm đông lạnh từ từ. Việc lựa chọn chất bảo quản cryo và nồng độ của nó sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố như thời gian tiếp xúc trước và trong quá trình làm đông lạnh, độc tính sinh học của chúng và khả năng dung nạp riêng của vật liệu sinh học đối với hóa chất. Thông thường, vật liệu mà được bảo quản cryo bằng cách sử dụng các chất bảo quản cryo xuyên thấm sẽ được ủ với chất bảo quản cryo trong thời gian đủ dài sao cho đạt được sự cân bằng thẩm thấu về nồng độ giữa chất bảo quản cryo và sinh vật được bảo quản.

Kỹ thuật làm đông lạnh nhanh thường sử dụng các chất bảo quản cryo ngoại bào với khối lượng phân tử tương đối cao mà không xuyên thấm vào tế bào. Ví dụ như polyvinyl pyrrolidon và hydroxyetyl tinh bột. Các chất này là có hiệu quả trong việc bảo vệ các hệ sinh học mà được làm lạnh ở tốc độ nhanh như trong nitơ lỏng. Một số trong số các chất bảo quản cryo không xuyên thấm ngoại bào này có tác dụng bảo vệ trực tiếp đối với màng tế bào, tuy nhiên cơ chế tác động sơ cấp của chúng là

có liên quan đến việc đưa vào sự thủy tinh hóa mà là quy trình tạo thành thủy tinh ngoại bào.

Từ nhiều nghiên cứu bảo quản cryo đã biết rõ rằng các tế bào khác nhau có yêu cầu khác nhau đối với các phương pháp bảo quản tối ưu được áp dụng. Các điều kiện tối ưu đối với một số đáng kể các tham biến có liên quan với nhau cần phải được xác định. Cụ thể là, việc bảo quản cryo đối với các mô đa bào phức tạp và các sinh vật thường đi kèm với các vấn đề kích thích và kinh khủng ví dụ như đi kèm với sự tạo thành đá ngoại bào. Hơn nữa, kích cỡ của sinh vật được bảo quản sẽ ảnh hưởng đến quy trình bảo quản cryo. Các sinh vật nhỏ hơn nói chung là dễ bảo quản hơn bằng các kỹ thuật làm đông lạnh từ từ vì sự cân bằng dễ đạt được hơn so với các sinh vật lớn hơn.

Một trong số các thử thách chính trong việc bảo quản cryo là sự thiếu các phương pháp thích hợp để bảo quản các mẻ lớn hơn khi cần trong các ứng dụng quy mô công nghiệp như làm thức ăn. Điển hình là, các kỹ thuật bảo quản cryo được áp dụng ở quy mô microlit hoặc mililit, ví dụ, trong các lọ hoặc ống hút nhỏ với thể tích từ 0,5 đến 1,5 ml. Do đó, ứng dụng các kỹ thuật đã biết thường chỉ giới hạn ở các lượng nhỏ và không thích hợp đối với các lượng lớn hơn.

Khin-Maung-Oo et al. 1998 (Khin-Maung-Oo et al. Cryopreservation of Nauplius Larvae of the barnacle, *Balanus amphitrite* Drawin, Fisheries Science, 64(6):857-860) đã bộc lộ phương pháp để bảo quản cryo ấu trùng nauplius của các loài *Balanus amphitrite* ở quy mô nhỏ trong các ống hút bảo quản cryo. Phương pháp được ưu tiên bao gồm việc rút nước của ấu trùng nauplius giai đoạn II và cân bằng chúng trong 20 phút trong dung dịch dimetyl sulfoxit 1,5M làm chất bảo quản cryo trong nước biển 29‰. Nauplius được làm lạnh từ 20°C xuống -12°C với tốc độ giảm nhiệt 5°C/phút, giữ ở -12°C trong 10 phút và sau đó làm đông lạnh xuống -30°C ở tốc độ 0,5°C/phút, giữ trong 20 phút ở -30°C và nhanh chóng làm đông lạnh đến -196°C.

Gakhova et al. 1990 (Gakhova E.N. Freezing of barnacle larvae *Balanus improvises* to minus 196°C. Biologiya Morya (Valdivstock) (4): 62-65) đã bộc lộ phương pháp khác để bảo quản cryo ấu trùng nauplius II của *Balanus improvises* trong quy trình làm đông lạnh hai bước. 200µl huyền phù ấu trùng nauplius/chất bảo quản cryo trong ống nhựa được làm đông lạnh ở tốc độ 6 đến 6,7°C/phút đến nhiệt

độ nằm trong khoảng từ -38 đến -42°C , giữ trong 10 phút ở nhiệt độ này, và sau đó được cho vào nitơ lỏng.

Anil et al. 1997 (Anil A.C., Tulaskar, A.S., Khandeparkar D. C., and Wagh, A.B. Cryopreservation of *Balanus amphitrite* nauplii. Cryobiology 34, 131-140) đã bộc lộ phương pháp bảo quản cryo đối với ấu trùng nauplius của *Balanus amphitrite* sử dụng ba chất bảo quản cryo khác nhau (etylen glycol, dimetyl sulfoxit, và glyxerol), trong đó ấu trùng thể hiện tính nhạy gia tăng đối với nồng độ chất bảo quản cryo được áp dụng. Nồng độ etylen glycol 3 đến 4M không gây ra hư hại sau thời gian cân bằng lên tới 2 giờ. Ấu trùng nauplius đã được bảo quản cryo với thể tích nhỏ (ống hút) trong quy trình làm đông lạnh từ từ hai bước kết hợp với bước gieo ban đầu ở -8°C . Tốc độ làm đông lạnh là $5^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ từ 20 đến 0°C , $1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ từ 0 đến -8°C . Sau khi gieo, tốc độ làm lạnh là $0,3^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ bằng cách làm đông lạnh từ từ cho đến khi đạt đến nhiệt độ ít nhất là -20°C , tại đó nhiệt độ được giữ trong 20 phút. Sau đó các ống hút được đưa vào nitơ lỏng. Các mẫu được chuyển vào nitơ lỏng khi đạt đến -40°C sau thời gian lớn hơn 2 giờ một chút. Anil et al. đã báo cáo mức độ tái sinh là 90% một giờ sau khi rã đông. Tuy nhiên, mức độ tái sinh chỉ là 35% sau 24 giờ.

Vấn đề kỹ thuật mục tiêu của sáng chế

Sáng chế nhằm đề xuất phương pháp để bảo quản và làm tái sinh con hà, cụ thể là tập trung vào các giai đoạn sớm trong đời sống của chúng, tức là các giai đoạn trứng, phôi, ấu trùng và con non của chúng. Cụ thể hơn là, sáng chế nhằm đề xuất phương thức bảo quản cryo để bảo quản cryo một cách hữu hiệu đối với các sinh vật này mà thường sống ở vùng duyên hải. Hơn nữa, sáng chế nhằm cải thiện khả năng khai thác các loài sinh vật biển mới mà thích hợp làm khẩu phần ăn cho quá trình cho ăn đầu tiên, như cho quá trình cho ăn đầu tiên cho ấu trùng cá biển và đề xuất các phương pháp, mà giúp có thể khai thác chúng nhằm vào ứng dụng trong công nghiệp. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp để bảo quản trong thời gian dài các sinh vật làm thức ăn sống mà có thể được sử dụng để thay thế một cách hiệu quả cho các thức ăn sống hiện nay trong quy trình sản xuất nuôi trồng hải sản. Cụ thể là, sáng chế nhằm đề xuất phương pháp bảo quản cryo quy mô (lượng) lớn đối với các sinh vật mà có thể được sử dụng làm các sinh vật làm thức ăn sống trong quy trình

sản xuất nuôi trồng thủy sản như trong quy trình cho ăn đầu tiên ấu trùng cá biển sớm phát triển.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp bảo quản cryo đối với con hà mà nhờ đó đạt được mức độ tái sinh cao trong thời gian dài hơn sau khi rã đông. Đây là yếu tố đặc biệt quan trọng khi sử dụng làm thức ăn đầu tiên vì sự tiêu thụ các sinh vật được tái sinh bởi, ví dụ, ấu trùng cá biển thường không diễn ra ngay lập tức mà cần thời gian sau khi bổ sung các sinh vật được tái sinh vào nơi nuôi trồng ấu trùng cá. Do đó, thời gian sống sót dài của môi trong vài giờ hoặc vài ngày là yếu tố quan trọng.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp hiệu quả để bảo quản cryo đối với thể tích lớn trên mỗi đơn vị thích hợp đối với các loài hà có ấu trùng nauplius lớn.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp để sản xuất thức ăn dạng hạt được bảo quản cryo có tỷ lệ tái sinh cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các phương thức bảo quản cryo để bảo quản và tái sinh các loài hà ở các giai đoạn sớm khác nhau của cuộc đời (trứng, ấu trùng nauplius, và con non). Một mục đích chính của sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm được bảo quản, có thể dự trữ chứa các sinh vật làm thức ăn sống này mà có thể thay thế hoặc bổ sung cho các chế độ thức ăn sống hiện nay trong sản xuất nuôi trồng hải sản.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp bảo quản cryo quy mô lớn đối với trứng, ấu trùng nauplius và/hoặc con non của con hà (barnacles), phương pháp này bao gồm các bước được thực hiện theo thứ tự như sau:

- rút nước từ các sinh vật này,
- bổ sung dung dịch chất bảo quản cryo có nồng độ 5 đến 10 M chứa chất bảo quản cryo được chọn từ nhóm bao gồm etylen glycol, propylen glycol, glyxerol, và dimetyl sulfoxit hoặc hỗn hợp của chúng,
- làm đông lạnh hỗn hợp trong đồ chứa theo các bước tiếp theo dưới đây:
 - (i) làm đông lạnh ở tốc độ làm đông lạnh chậm thứ nhất là không lớn hơn $-1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ cho đến khi tiếp cận nhiệt độ tại đó các sinh vật trong hỗn hợp bắt đầu kết tinh;

(ii) làm đông lạnh ở tốc độ làm đông lạnh chậm thứ hai là không lớn hơn $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ cho đến khi các sinh vật và chất bảo quản cryo trong hỗn hợp được kết tinh hoàn toàn; và

(iii) làm đông lạnh ở tốc độ làm đông lạnh nhanh thứ nhất đến nhiệt độ bảo quản cryo.

Tốt hơn là, tỷ lệ thể tích giữa dung dịch chất bảo quản cryo và các sinh vật được rút nước ít nhất là 1:4, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1:4 đến 2:1, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1:4 đến 1:1. Điều này có nghĩa là ít nhất khoảng 20% thể tích nên là chất bảo quản cryo và 80% là sinh vật trong hỗn hợp.

Theo phương pháp được ưu tiên, tốc độ làm đông lạnh chậm thứ nhất là $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ hoặc nhỏ hơn.

Bước cân bằng có thể tùy ý được thực hiện trước bước làm đông lạnh thứ nhất, tốt hơn là kéo dài từ 5 đến 60 phút, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 15 đến 30 phút, tốt nhất là khoảng 15 phút. Ưu điểm của bước cân bằng này là ở chỗ tốc độ làm đông lạnh chậm thứ nhất có thể thường là cao hơn nếu bước này bị bỏ qua, mà không ảnh hưởng đến sản phẩm cuối cùng. Bước cân bằng có thể được kết hợp với tốc độ làm đông lạnh chậm thứ nhất là từ $-0,5^{\circ}\text{C}$ đến -1°C . Thời gian cân bằng trên 60 phút ít được ưu tiên hơn và thường dẫn đến khả năng sống sót giảm sau khi làm đông lạnh.

Thời gian cân bằng có thể được rút ngắn đến dưới 15 phút hoặc thậm chí được bỏ qua hoàn toàn đặc biệt nếu tốc độ làm đông lạnh là nhỏ hơn $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{phút}$. Mặc dù có thể thấy được rằng các con hà có khả năng dung nạp cao đối với các chất bảo quản cryo, thuận lợi của thời gian cân bằng rút ngắn là sự tiếp xúc của các sinh vật giảm đi và quy trình làm đông lạnh hiệu quả hơn về mặt thời gian. Theo sáng chế, có thể thấy rằng ấu trùng nauplius của hà không bị ảnh hưởng tiêu cực bởi thời gian cân bằng được rút ngắn hoặc được bỏ qua khi sử dụng tốc độ làm đông lạnh chậm thứ nhất theo sáng chế. Ngạc nhiên là, các sinh vật dường như không phụ thuộc vào việc đạt đến sự cân bằng trước khi bắt đầu làm đông lạnh.

Ví dụ, khi sử dụng tốc độ làm đông lạnh nhỏ hơn khoảng $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, sự cân bằng trong suốt quy trình làm đông lạnh chậm nêu trên là đủ trước khi đạt được sự kết tinh. Ưu điểm của việc không cần bước cân bằng là quy trình được đơn giản hóa gồm ít bước riêng rẽ cần phải thực hiện hơn.

Theo phương án được ưu tiên, tốc độ làm đông lạnh chậm thứ hai là nằm trong khoảng từ $-0,015$ đến $-0,1^{\circ}\text{C/phút}$ và tốt hơn là nằm trong khoảng từ $-0,04$ đến $-0,08^{\circ}\text{C/phút}$. Đặc biệt được ưu tiên là tốc độ làm đông lạnh chậm thứ hai là $-0,05^{\circ}\text{C/phút}$ và được ưu tiên nhất là $-0,04^{\circ}\text{C/phút}$. Quy trình này có ưu điểm ở chỗ việc làm đông lạnh là đặc biệt nhẹ nhàng và đạt được sự phân bố nhiệt độ rất đồng đều, điều này có thể đạt được đối với thể tích hoặc khối lượng lớn hơn được xử lý trong một đơn vị như nhau.

Tốt hơn là tốc độ làm đông lạnh chậm thứ hai kéo dài cho đến khi tiếp cận ít nhất là -30°C , tốt hơn là đến ít nhất là -35°C , tốt hơn nữa là đến ít nhất là -36°C , tốt nhất là từ -38°C đến -46°C .

Tốt hơn là, các sinh vật được rút nước có hàm lượng khối lượng khô từ 6 đến 14% sau khi rút nước, tốt hơn nữa là từ 8 đến 12% và tốt nhất là khoảng 10%.

Tốt hơn là, dung dịch chất bảo quản cryo chứa 2,0 đến 4,5% NaCl, tốt hơn nữa là 3,0 đến 3,8% NaCl, tốt nhất là 3,2 đến 3,8% NaCl.

Được ưu tiên hơn nữa là nồng độ của chất bảo quản cryo được bổ sung vào sinh vật là nằm trong khoảng từ 6 đến 8M, được ưu tiên hơn nữa là nằm trong khoảng từ 6,5M đến 7,5M. Đặc biệt ưu tiên là nồng độ của chất bảo quản cryo ít nhất là 6M, tốt hơn nữa là ít nhất 7M, tốt nhất là 7,2M. Tốt hơn là, chất bảo quản cryo là hỗn hợp của etylen glycol và propylen glycol, tốt hơn là dưới dạng hỗn hợp của khoảng 50% mỗi chất, tốt hơn nữa là hỗn hợp của 75% etylen glycol và 25% propylen glycol.

Bước cân bằng tối ưu tốt hơn là được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 10°C , tốt hơn nữa là ở nhiệt độ từ 3 đến 8°C , tốt nhất là ở nhiệt độ khoảng 5°C . Nhiệt độ thấp hơn khoảng 5°C có thể dẫn đến khả năng sống sót giảm.

Phương pháp theo sáng chế đặc biệt được phát triển và thích hợp cho các lượng và thể tích sinh vật lớn hơn. Tốt hơn là, lượng vật liệu được bảo quản cryo trong một đơn vị ít nhất là từ 5 g đến 10 g, tốt hơn là ít nhất 10 đến 50 g, tốt hơn nữa là ít nhất 50 đến 100 g, tốt nhất là từ 200 g đến 2000 g.

Hỗn hợp của chất bảo quản cryo và các sinh vật có thể được cho vào trong đồ chứa thích hợp cho việc bảo quản cryo trước bước cân bằng hoặc trực tiếp sau bước cân bằng. Hỗn hợp này trong đồ chứa có thể có độ dày tối đa trong quy trình làm đông lạnh là không lớn hơn 100 mm, tốt hơn nữa là không lớn hơn 50 mm và tốt nhất là 10 mm hoặc nhỏ hơn.

Tốt hơn là, tốc độ làm đông lạnh chậm thứ nhất được kết thúc khi tiếp cận được nhiệt độ đồng nhất trong vật liệu là khoảng từ -10 đến -13°C , tốt hơn là khoảng từ -12 đến -13°C .

Thời gian làm đông lạnh dài và tốc độ làm đông lạnh chậm là các yếu tố quan trọng đối với chất lượng của sản phẩm cuối cùng khi bảo quản theo sáng chế. Điều này là đặc biệt liên quan khi bảo quản các lượng hoặc thể tích lớn. Tốt hơn là, toàn bộ quy trình làm đông lạnh kéo dài ít nhất 5 giờ, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 6 đến 10 giờ, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 đến 12 giờ và tốt nhất là trên 12 giờ. Nhờ đó đạt được khả năng sống sót cao.

Theo phương án được ưu tiên khác, các sinh vật được bảo quản cryo trong các thể tích từ 5 đến 50 ml, tốt hơn là trong thể tích từ 10 đến 25 ml, trong các khuôn có kích cỡ thích hợp. Tốt hơn là các khuôn này được làm bằng silicon. Các đĩa hoặc các túi lớn hơn với các sinh vật được bảo quản cryo có thể bị nghiền thành các hạt nhỏ hơn trong nitơ lỏng, do đó các hạt thu được tốt hơn là được dự trữ mà không đóng gói trong nitơ lỏng. Ưu điểm của việc sản xuất các hạt hoặc các viên nhỏ hơn là, ví dụ, trong việc sử dụng sau này làm các sinh vật để cho ăn đầu tiên. Điều này sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho sự tái sinh các sinh vật này và cho sự định lượng trong quá trình cho ăn dưới dạng thức ăn sống.

Khía cạnh thứ hai của sáng chế đề cập đến phương pháp tái sinh các sinh vật được bảo quản cryo theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn nêu trên, áp dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được chọn từ

- làm rã đông chúng trong bể nước ấm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C ;
- nghiền vật liệu đông lạnh và rửa nó trong nước biển lạnh chảy ở nhiệt độ 10°C hoặc nhỏ hơn, và sau đó làm tái sinh chúng ở nhiệt độ $<5^{\circ}\text{C}$ trong thời gian lên tới 36 giờ; hoặc
- nghiền vật liệu đông lạnh và ủ nó trong nước biển với sự sục khí ở 10°C hoặc nhỏ hơn, và sau đó làm tái sinh chúng ở nhiệt độ $<5^{\circ}\text{C}$ trong thời gian tới 36 giờ. Các sinh vật đã rã đông có thể tùy ý được làm thích nghi sau khi rã đông với nhiệt độ nước trong môi trường nuôi cá mà chúng sẽ được đưa vào đó.

Khía cạnh thứ ba của sáng chế đề cập đến sản phẩm hoặc thức ăn được bảo quản cryo đặc trưng trong đó nó thu được bằng phương pháp bất kỳ trong số các

phương pháp được bộc lộ trong các đoạn đề cập đến phương pháp bảo quản cryo trên đây.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến sản phẩm hoặc thức ăn được bảo quản cryo chứa con hà ở các giai đoạn sớm của cuộc đời đặc trưng trong đó con hà được bảo quản cryo sử dụng etylen glycol hoặc etylen glycol được trộn với propylen glycol hoặc glyxerol làm chất bảo quản cryo, tốt hơn là được bổ sung vào sinh vật với nồng độ 6 đến 8 M.

Cuối cùng là, sáng chế đề cập đến việc sử dụng con hà ở các giai đoạn sớm của cuộc đời mà được bảo quản cryo và được tái sinh làm thức ăn sống cho ấu trùng cá biển và các động vật không xương sống.

Các phương án ưu tiên cũng được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc.

Cần hiểu rõ rằng các dấu hiệu của sáng chế được mô tả trong phần trên có thể được kết hợp trong kết hợp bất kỳ mà không trệch khỏi phạm vi của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các phương thức cryo để bảo quản và tái sinh các loài hà ở các giai đoạn sớm khác nhau của cuộc đời (trứng, ấu trùng nauplius, và con non). Một mục đích chính của sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm được bảo quản, có thể dự trữ chứa các sinh vật làm thức ăn sống này mà có thể thay thế hoặc bổ sung cho các chế độ thức ăn sống hiện nay trong sản xuất nuôi trồng hải sản.

Phương pháp bảo quản cryo theo sáng chế bao gồm việc bảo quản cryo bằng các kỹ thuật làm đông lạnh rất chậm với một số bước sử dụng nồng độ cao của các chất bảo quản cryo (các chất bảo vệ cryo) được xác định dưới đây. Phương pháp theo sáng chế đã được phát triển cho các mẻ lớn (thường thích hợp đối với vài trăm gam trên mỗi đơn vị được làm đông lạnh trong một đơn vị), điều này từng là không thể đối với phương pháp bảo quản cryo hữu hiệu trước đây. Ưu điểm lớn của sáng chế là ở chỗ phương pháp này là thích hợp đối với việc bảo quản cryo quy mô lớn/quy mô công nghiệp các con hà ở các giai đoạn sớm của cuộc đời và cụ thể là đối với việc sản xuất quy mô lớn tự động để thu được sản phẩm hà mới thích hợp làm thức ăn đầu tiên. Phương pháp này còn thích hợp để sản xuất vật liệu dạng hạt hoặc viên thích hợp cho, ví dụ, việc cho ăn đầu tiên cho cá (làm các sinh vật làm thức ăn sống).

Tốc độ làm đông lạnh đối với mỗi bước trong phương thức được bộc lộ có thể thay đổi tùy thuộc vào lượng và/hoặc kích thước của vật liệu (cụ thể là chiều rộng của chúng) trong mỗi đơn vị được làm đông lạnh. Tuy nhiên, điều kiện nhất định sẽ được đáp ứng để đạt được kết quả tối ưu (tức là các sinh vật có thể tồn tại, không bị thiệt hại sau bước tái sinh sau này). Tùy thuộc vào bước này, đã phát hiện ra rằng sự phân bố về cơ bản là đồng nhất của nhiệt độ trong toàn bộ vật liệu trong quy trình làm đông lạnh là điểm mấu chốt để đạt được kết quả tốt. Điểm mấu chốt đặc biệt là từ khoảng -10 đến -13°C trở đi trong quy trình làm đông lạnh, trong đó các sinh vật, khi được trộn với chất bảo quản cryo, thường bắt đầu kết tinh và cụ thể là trong khoảng từ -20 đến -25°C khi chất bảo quản cryo, ví dụ etylen glycol bao quanh các sinh vật, thường bắt đầu kết tinh hoặc kết tinh. Khoảng nhiệt độ chính xác đối với nhiệt độ kết tinh có thể trệch khỏi khoảng nhiệt độ từ -20 đến -25°C tùy thuộc vào việc lựa chọn (các) chất bảo quản cryo và lượng muối trong dung dịch. Điểm mấu chốt đặc biệt được xác định để phương pháp theo sáng chế thành công là việc tránh hoặc hạn chế sự tăng nhiệt độ trong vật liệu do sự giải phóng nhiệt trong khoảng nhiệt độ mà các sinh vật kết tinh, tức là khoảng từ -10°C đến -15°C , cụ thể là từ -12°C đến -13°C . Phương thức cryo theo sáng chế bao gồm các dấu hiệu và các bước sau:

Đối với bước thứ nhất, các sinh vật được bảo quản sẽ được rút nước biển. Việc rút nước có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng các lưới hoặc các bộ lọc với cỡ lỗ hoặc cỡ lỗ xốp thích hợp để giữ lại con vật. Thường là, hàm lượng chất khô của hà như *Semibalanus balanoides* hoặc *Balanus crenatus*, là khoảng 10% sau khi rút nước. Mặc dù vậy hàm lượng này có thể thay đổi tùy thuộc vào sinh vật và các đặc tính giữ nước của nó. Do đó, hàm lượng khối lượng khô có thể thay đổi từ 6 đến 14% mà không ảnh hưởng đáng kể đến chất lượng của sản phẩm cuối cùng.

Sau đó, các sinh vật được rút nước được trộn với dung dịch gốc của chất bảo quản cryo. Tốt hơn là, etylen glycol (dung dịch gốc etylen glycol 7,2M trong dung dịch muối chứa từ 3 đến 4% NaCl, tốt hơn là khoảng 3,5% NaCl) được sử dụng làm chất bảo quản cryo, tốt hơn là với tỷ lệ thể tích chất bảo quản cryo/các sinh vật là từ 1:4 đến 1:1. Độ mặn của dung dịch gốc có thể thay đổi. Vì các lý do thực tiễn, nước biển thường được sử dụng trong dung dịch gốc, trong đó muối (NaCl) được bổ sung để đạt độ mặn tăng. Quan trọng là sử dụng nồng độ cao của chất bảo quản cryo để đạt được kết quả tối ưu trong quy trình bảo quản cryo. Nói chung, nồng độ của chất

bảo quản cryo được bổ sung nên nằm trong khoảng từ 5 đến 10 M chất bảo quản cryo, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6 đến 8 M. Do đó, tốt hơn là nồng độ của chất bảo quản cryo ít nhất là 6 M chất bảo quản cryo, tốt hơn nữa là ít nhất 7 M, và tốt nhất là khoảng 7,2 M.

Việc bổ sung muối trong dung dịch chất bảo quản cryo được thể hiện là làm cải thiện khả năng tái sinh của ấu trùng nauplius so với việc không bổ sung muối. Đặc biệt là hoạt động bơi được cải thiện. Do đó, nồng độ muối cuối cùng của NaCl tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,5%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3,0 đến 3,8%, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 3,2 đến 3,8%.

Theo phương án được ưu tiên khác, etylen glycol được thay thế bằng hỗn hợp của etylen glycol và propylen glycol làm chất bảo quản cryo. Các kết quả tốt nhất đạt được khi sử dụng hỗn hợp của 75% etylen glycol và 25% propylen glycol. Việc thay thế 50% etylen glycol là khả dĩ nhưng ít tối ưu hơn xét về khả năng sống sót sau khi tái sinh. Việc thay thế 75% etylen glycol vẫn dẫn đến một số sống sót. Tương tự, việc thay thế 25% etylen glycol bằng glyxerol cũng cho kết quả sống sót khá tốt, nhưng không tốt như khi sử dụng 25% propylen glycol với 75% etylen glycol hoặc chỉ sử dụng một mình etylen glycol làm chất bảo quản cryo. Ưu điểm của việc thay thế etylen glycol bằng propylen glycol hoặc glyxerol là độc tính thấp hơn của propylen glycol và glyxerol nói chung đã được ghi nhận. Điều này là có lợi nếu sinh vật được bảo quản cryo sẽ được sử dụng làm thức ăn cho ấu trùng cá biển vì các ấu trùng cá biển này đã được biết là rất nhạy với hóa chất bao gồm etylen glycol. Theo phương án khác, dimetyl sulfoxit (DMSO) được sử dụng làm chất bảo quản cryo. DMSO là ít được ưu tiên trong trường hợp ứng dụng sau này làm thức ăn sống do độc tính của nó nói chung đã được biết là cao hơn.

Hỗn hợp của chất bảo quản cryo và các sinh vật có thể thu được trực tiếp trong các đồ chứa thích hợp như các túi, các gói và các túi nhỏ hoặc được chuyển vào các loại đồ chứa này sau khi trộn. Các loại vật liệu khác nhau có thể được sử dụng để đóng gói miễn là chúng là thích hợp để chịu được quy trình làm đông lạnh, dự trữ và rã đông sau đó. Thường là, các đồ chứa, các túi, các khuôn, hoặc các túi nhỏ làm từ chất dẻo chịu lạnh có thể được sử dụng. Vật liệu thích hợp khác là silicon. Ví dụ về túi nhỏ mà được sử dụng nhằm mục đích này có kích thước dưới đây: 500 mm x 190 mm x 10mm. Túi nhỏ này là thích hợp để chứa khoảng khoảng 600 g hỗn hợp. Tùy

thuộc vào tỷ lệ được chọn giữa các chất bảo quản cryo và các sinh vật, túi nhỏ với kích thước này có thể thường chứa từ 300 đến 450 g con hà được bảo quản. Lượng (các sinh vật và chất bảo quản cryo được trộn) trong mỗi đơn vị để được làm đông lạnh theo sáng chế thường nằm trong khoảng từ 50 g đến 1000 g. Trong một số ứng dụng, các lượng nhỏ hơn trên một đơn vị được bảo quản riêng rẽ có thể được ưu tiên như 5, 10, 20 hoặc 25 g. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sáng chế không chỉ giới hạn ở các lượng và các kích thước cụ thể này. Các kích thước và các lượng khác của vật liệu cho các túi nhỏ là khả dĩ miễn là sự làm đông lạnh được kiểm soát và sự phân bố nhiệt độ đủ đồng đều có thể đạt được trong mỗi đơn vị trong quy trình làm đông lạnh dưới đây. Điều này là đặc biệt phụ thuộc vào độ dày của túi/gói, trong đó độ dày này tốt hơn là không vượt quá 50 mm, tốt hơn nữa là 10 mm, và tốt nhất là 5 mm.

Ngạc nhiên là, bằng cách của sáng chế, đã thấy rằng thời gian cân bằng trước khi bắt đầu quy trình làm đông lạnh theo phương thức của sáng chế không phải là dấu hiệu cốt yếu để quy trình thành công. Do đó, có thể thấy rằng bước cân bằng đã định có thể được bỏ qua hoàn toàn mà không ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh của các sinh vật khi được bảo quản cryo theo sáng chế nếu tốc độ làm đông lạnh thứ nhất là chậm trước khi kết tinh.

Tốt hơn là, chất bảo quản cryo nên được bổ sung vào sinh vật ở nhiệt độ từ 5 đến 10°C. Nhiệt độ thấp hơn là ít được ưu tiên. Nhiệt độ khoảng 0°C dẫn đến khả năng sống sót giảm.

Tùy ý, phương pháp bảo quản cryo theo sáng chế có thể được kết hợp với thời gian cân bằng. Nếu được thực hiện, thời gian cân bằng có thể thường kéo dài từ 15 đến 60 phút. Thời gian lâu hơn 60 phút, ví dụ 120 phút, có thể tác động tiêu cực đến khả năng sống sót. Tốt hơn là, nhiệt độ trong quá trình cân bằng là nằm trong khoảng từ 5°C đến 10°C, và tốt nhất là khoảng 5°C trong suốt pha này để hấp thu một cách hiệu quả chất bảo quản cryo. Nhiệt độ dưới 20°C và đặc biệt là 5°C được cho là có lợi trong quy trình do hoạt tính chuyển hóa của các sinh vật thường thấp hơn trong pha này mà có thể có tác dụng bảo vệ. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, thời gian cân bằng là từ 15 đến 30 phút ở 5°C được sử dụng. Tuy nhiên, các thử nghiệm được thực hiện theo sáng chế đã chỉ ra rằng thậm chí thời gian cân bằng là 24 giờ với (dung dịch gốc) etylen glycol 7,2 M lạnh băng làm chất bảo quản cryo

cũng không gây hại đáng kể đến ấu trùng nauplius của hà *Semibalanus balanoides* trong thử nghiệm độc tính. Điều này chỉ ra khả năng dung nạp rất cao đối với các chất bảo quản cryo ở nồng độ cao và trong khoảng thời gian dài. Sáng chế lợi dụng ưu điểm của khả năng dung nạp cao một cách bất ngờ này đối với nồng độ cao của chất bảo quản cryo thậm chí khi được tiếp xúc trong thời gian rất dài như trong suốt quá trình làm đông lạnh theo sáng chế. Trong suốt quy trình làm đông lạnh rất chậm theo sáng chế, các sinh vật được tiếp xúc với nồng độ cao này của chất bảo quản cryo trong thời gian dài khi làm đông lạnh các mẻ lớn hơn đã nêu so với phương pháp đã biết từ lĩnh vực này sử dụng ống hút. Do đó quy trình làm đông lạnh theo sáng chế kéo dài trong vài giờ, tốt hơn là ít nhất 12 giờ, từ nhiệt độ cân bằng (ví dụ, 5°C), lần lượt là nhiệt độ khi chất bảo quản cryo được bổ sung, đến nhiệt độ khi hỗn hợp được chuyển vào nitơ lỏng (thường là ở nhiệt độ khoảng từ -39 đến -43°C, tùy ý là từ -30°C hoặc -35°C). Đã phát hiện là tối ưu nếu quy trình làm đông lạnh kéo dài ít nhất 5 giờ và tốt hơn nữa là ít nhất 8 giờ, tốt nhất là từ 12 đến 16 giờ. Quy trình làm đông lạnh thậm chí có thể kéo dài 24 giờ hoặc lâu hơn thế. Thời gian làm đông lạnh rất dài này được hiểu trong văn cảnh sáng chế là cần thiết để đạt được tỷ lệ tái sinh cao của các sinh vật khi được làm đông lạnh trong các đơn vị mẻ lớn như vậy. Do đó, thời gian tiếp xúc trong quy trình làm đông lạnh là dài hơn nhiều so với các kỹ thuật đã biết thông thường được áp dụng ở các thể tích nhỏ như các ống hút hoặc khi sử dụng kỹ thuật làm đông lạnh nhanh dựa trên sự thủy tinh hóa.

Sau bước làm cân bằng, lần lượt sau khi chất bảo quản cryo đã được bổ sung, đồ chứa chứa hỗn hợp được chuyển vào máy làm đông lạnh, thường là máy làm đông lạnh tốc độ được kiểm soát mà cho phép kiểm soát tốc độ làm đông lạnh. Đồ chứa (ví dụ, túi, khuôn, hoặc túi nhỏ) được cung cấp bằng phương tiện thích hợp để giám sát nhiệt độ bên trong vật liệu. Các phương tiện để kiểm soát nhiệt độ này đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ và do đó không cần phải giải thích chi tiết hơn. Sau đó hỗn hợp được xử lý bằng hai quy trình làm đông lạnh chậm kế tiếp. Trong suốt toàn bộ quy trình làm đông lạnh, điều cốt yếu là tốc độ làm đông lạnh được áp dụng phải dẫn đến sự phân bố nhiệt độ đồng nhất trong vật liệu. Do đó, sự gây hại cho sinh vật được ngăn chặn hoặc được giảm đi. Tốc độ làm đông lạnh tốt hơn là không nên vượt quá -1°C/phút trong suốt quá trình tốc độ làm đông lạnh chậm thứ nhất. Tốt hơn nữa là, tốc độ làm đông lạnh nên là -0,5°C/phút hoặc nhỏ hơn.

Ví dụ là, đối với túi nhỏ phẳng (độ dày khoảng 10 mm chứa khoảng 600 g hỗn hợp và được đặt trong máy làm đông lạnh tốc độ được kiểm soát) thường là tốc độ làm đông lạnh trong vật liệu là từ $-0,05$ đến $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ được áp dụng cho khoảng nhiệt độ từ khoảng $+5^{\circ}\text{C}$ đến khoảng -12°C .

Thông thường, sự làm lạnh không đúng mức được quan sát trong quy trình làm đông lạnh, và khi nhiệt độ xuống dưới, ví dụ, -15°C , nhiệt độ sẽ tăng đến khoảng -13°C khi các sinh vật kết tinh. Ẩn nhiệt nóng chảy (giải phóng năng lượng) gây ra sự tăng nhiệt độ này. Sự làm lạnh không đúng mức là thay đổi, và thường chỉ thấy sự tăng nhiệt độ $0,5^{\circ}\text{C}$ hoặc không tăng nhiệt độ, trong khi đó các mẫu khác có thể có sự tăng nhiệt độ tới 3°C . Sự tăng nhiệt độ, ví dụ, khoảng 3°C do sự kết tinh của chất bảo quản cryo dường như không tác động tiêu cực đến các sinh vật có trong hỗn hợp.

Nếu etylen glycol được sử dụng làm chất bảo quản cryo (tức là, 7,2 M trong dung dịch 3% NaCl trước cân bằng) trong hỗn hợp thì thường nó sẽ bắt đầu kết tinh ở khoảng -20 đến -25°C . Nhiệt độ kết tinh chính xác của các sinh vật và chất bảo quản cryo cũng sẽ phụ thuộc vào hàm lượng nước biển còn lại trong vật liệu đã rút nước trước khi cân bằng cũng như hàm lượng muối trong dung dịch chất bảo quản cryo. Ví dụ, hàm lượng nước thấp hơn do đó dẫn đến nhiệt độ kết tinh cao hơn của các sinh vật trong hỗn hợp chất bảo quản cryo, ví dụ, ở khoảng -16°C đối với 12% khối lượng khô của vật liệu đã rút nước và ở khoảng -12°C đối với 9% khối lượng khô của vật liệu. Tùy thuộc vào kỹ thuật làm đông lạnh được sử dụng, tốc độ làm đông lạnh cao hơn có thể được áp dụng trong pha này như khi sử dụng máy làm đông lạnh với khí tuần hoàn hoặc máy làm đông lạnh sử dụng chất lỏng mà cho phép sự phân bố và truyền nhiệt hiệu quả hơn so với máy làm đông lạnh nạp khí và các dạng tương tự.

Tuy nhiên, điều rất quan trọng là đạt được sự phân bố nhiệt độ đồng nhất trên toàn bộ vật liệu khi tiến từ -12°C đến khoảng -25°C .

Điều rất quan trọng là sự giảm nhiệt độ là rất thấp trong bước làm đông lạnh chậm thứ hai từ -20°C đến khoảng -40 đến -42°C , khi hỗn hợp được đưa vào nitơ lỏng. Điều này là quan trọng để thu được hiệu suất tái sinh tối ưu của sinh vật được làm đông lạnh khi được bảo quản dưới dạng các lượng lớn đã nêu. Cụ thể là, sự gia tăng nhiệt độ tiềm ẩn gây ra bởi sự kết tinh của hỗn hợp chất bảo quản cryo/sinh vật phải được tránh hoặc được hạn chế vì đã phát hiện ra rằng điều này có thể tác động

một cách trầm trọng đến hiệu suất tái sinh sau này. Tốc độ làm đông lạnh tại đó nên tối đa là $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, tốt hơn là không lớn hơn $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ và tốt hơn nữa là không lớn hơn $-0,05^{\circ}\text{C}/\text{phút}$. Kết quả (khả năng sống sót) đặc biệt tốt đạt được khi tốc độ làm đông lạnh chậm thứ hai là $-0,04^{\circ}\text{C}$.

Cách khác, đối với tốc độ làm đông lạnh rất chậm này ở bước làm đông lạnh thứ hai, nhiệt độ có thể được giữ không đổi xung quanh khoảng -12°C đến -13°C và -22°C đến -23°C trong thời gian dài hơn, điển hình là trong thời gian 0,5 đến 3 giờ tùy thuộc vào độ dày của sản phẩm được đóng gói, cho đến khi đạt được sự phân bố nhiệt độ đồng nhất trước khi bắt đầu quá trình kết tinh. Sau thời gian giữ 0,5 đến 3 giờ ở nhiệt độ -22 đến -23°C , tốc độ làm đông lạnh nên không vượt quá $-0,15^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, và tốt hơn là không lớn hơn $-0,08^{\circ}\text{C}/\text{phút}$. Bằng cách sử dụng thời gian giữ, cụ thể là tốc độ làm đông lạnh chậm thứ hai có thể được chọn ở mức độ nhất định là cao hơn so với khi thời gian giữ không được áp dụng.

Điều quan trọng là nhiệt sinh ra trong bước kết tinh phải được giải phóng trước khi nhiệt độ được giảm thêm. Cụ thể là, khi sử dụng máy làm đông lạnh trên cơ sở không khí, điều quan trọng là nhiệt độ, tức là nhiệt độ của không khí bao quanh trong máy làm đông lạnh, được giữ không đổi và ổn định nhất có thể trong suốt quá trình giải phóng nhiệt đã nêu (cụ thể là giữa khoảng nhiệt độ từ -10 đến -13°C và từ -20 đến -25°C) nhờ đó tránh được một cách hiệu quả hoặc tối thiểu hóa sự tăng nhiệt độ trong sản phẩm. Nếu không thực hiện được như trên, sự kết tinh đá gây hại có thể xảy ra với tác động tiêu cực tới tỷ lệ tái sinh của sinh vật.

Khi đạt đến khoảng -39 đến -43°C , vật liệu được làm đông lạnh, điển hình là dưới dạng đĩa, được đưa vào nitơ lỏng để làm đông lạnh tiếp (bước làm đông lạnh nhanh thứ nhất) và dự trữ ở nhiệt độ cryo. Việc dự trữ các đĩa có thể được thực hiện theo các cách khác nhau như trong nitơ lỏng hoặc máy làm đông lạnh thích hợp để dự trữ cryo.

Thậm chí các đĩa có thể được nghiền thành các hạt mà không đóng gói bên ngoài bất kỳ trước khi được đưa vào đồ chứa dự trữ.

Thời gian được sử dụng trong quy trình làm đông lạnh đối với các lượng lớn hơn thường ít nhất là từ 5 đến 10 giờ, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 đến 12 giờ, tốt nhất là trên 12 giờ tùy thuộc vào đồ chứa (ví dụ, độ dày của túi nhỏ) và máy làm đông lạnh được sử dụng.

Để đạt được kết quả tốt, toàn bộ quy trình bảo quản cryo (bắt đầu từ bước làm cân bằng trong 30 phút) theo sáng chế đối với các lượng lớn hơn được nêu này nên không được thực hiện nhanh hơn trong khoảng 6 đến 8 giờ. Thời gian làm đông lạnh dưới 5 giờ dẫn đến khả năng sống sót nhất định, nhưng được phát hiện là không tối ưu đối với các mẻ lớn hơn, trong đó thời gian làm đông lạnh dài hơn thường dẫn đến khả năng sống sót tốt hơn thời gian ngắn. Điển hình là, quy trình diễn ra trong thời gian từ 12 đến 24 giờ tùy thuộc vào thể tích được sử dụng trong quy trình làm đông lạnh. Thay vì sử dụng máy làm đông lạnh trong đó không khí được làm lạnh bên trong máy làm đông lạnh, máy làm đông lạnh sử dụng chất lỏng có thể được sử dụng. Trong trường hợp sau, thời gian làm đông lạnh có thể được giảm xuống nhờ sự kiểm soát hiệu quả hơn đối với quy trình làm đông lạnh và sự giải phóng nhiệt.

Bằng phương pháp theo sáng chế, trứng, ấu trùng nauplius, và ấu trùng cyprid của con hà có thể được bảo quản cryo ở quy mô lớn, ví dụ, dưới các lượng khoảng 5 g đến trên một kg. Quy trình thông thường trong lĩnh vực bảo quản cryo là để bảo quản cryo các sinh vật ở quy mô mililit hoặc microlit, như trong các lọ nhỏ và trong các ống hút (thường là từ 0,5 đến 1,5ml). Để đạt được sự bảo quản cryo quy mô lớn như vậy, các chất có tính chất bảo quản cryo (chất bảo quản cryo) được sử dụng với nồng độ cao hơn nồng độ được tiên liệu là dung nạp được đối với các sinh vật đích như vậy trong thời gian dài hơn như trong quy trình làm đông lạnh 2 bước rất chậm ban đầu được áp dụng theo sáng chế. Điển hình là, với quy trình làm đông lạnh chậm theo thời gian dài như vậy, nồng độ cuối cùng cao của chất bảo quản cryo lớn hơn khoảng 3,2 M được cho là sẽ dẫn đến tác động độc hại trong suốt quá trình tiếp xúc thời gian dài dẫn đến tỷ lệ tử vong lớn của sinh vật cần được bảo quản cryo.

Do đó, ưu điểm chính của phương pháp này là khả năng bảo quản cryo thể tích lớn trong cùng một đơn vị. Các kỹ thuật đã biết trước đây không thực hiện được vì chúng không thích hợp đối với các thể tích lớn hơn này do dẫn đến hiệu suất tái sinh thấp hoặc không tái sinh. Trong trường hợp của sáng chế, sự tái sinh thành công đạt được nếu các sinh vật thể hiện sự vận động bơi bình thường khi được tái sinh.

Sự bảo quản cryo theo sáng chế được phát triển và được chấp thuận đối với các con hà ở các giai đoạn sớm của cuộc đời sống ở vùng duyên hải. Điển hình là, các sinh vật này đã phát triển các protein nội sinh bảo vệ chống đông lạnh để chống chịu môi trường lạnh.

Khi các lượng (số lượng con vật) lớn hơn được bảo quản trong một mẻ cần được bảo quản cryo cùng nhau, như được thực hiện theo sáng chế, có thể thấy rằng quy trình làm đông lạnh rất chậm là khá quan trọng để đạt được sự phân bố nhiệt độ đồng nhất trên khắp toàn bộ vật liệu. Bằng phương thức bảo quản cryo theo sáng chế mà dựa trên sự làm đông lạnh rất chậm, thời gian làm đông lạnh dài, kết hợp với nồng độ cao của chất bảo quản cryo như etylen glycol cũng như nồng độ mặn đã định, có thể đạt được khả năng sống sót cao và có thể tái sinh của các sinh vật được bảo quản thậm chí khi được bảo quản dưới các lượng làm đông lạnh lớn này.

Bằng cách sử dụng phương thức được bộc lộ trong sáng chế, trứng, ấu trùng và con non của các loài hà có thể được bảo quản cryo. Ví dụ về các loài này là loài *Semibalanus balanoides* và *Balanus crenatus*. Ấu trùng nauplius của các loài trên là lớn hơn ấu trùng nauplius của hà được bảo quản cryo đã biết trong lĩnh vực này như các loài hà *Balanus amphithrite* và *Balanus improvises*. Các sinh vật lớn hơn thường là khó khăn hơn trong việc bảo quản bằng các phương pháp bảo quản cryo, cụ thể là các phương pháp mà trong đó sự cân bằng thẩm thấu phải đạt được. *Balanus crenatus* (chiều dài 240 μm , chiều rộng 100 μm) có ấu trùng nauplius nhỏ hơn đáng kể so với *Semibalanus balanoides* (chiều dài 320 μm , chiều rộng 150 μm).

Các chất bảo quản cryo thông thường nhất, cụ thể là các chất xuyên thấm tế bào, được sử dụng với thể tích rất lớn. Điển hình là, tỷ lệ thể tích giữa chất bảo quản cryo và vật liệu sinh học nên là 1:1. Theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng thể tích thấp hơn nhiều của chất bảo quản cryo có thể được sử dụng mà không ảnh hưởng đến hiệu suất tái sinh. Do đó, có thể sử dụng thể tích 20 đến 25% chất bảo quản cryo trên 70 đến 75% vật liệu con hà khi sử dụng phương pháp theo sáng chế. Điều này rõ ràng là ưu điểm vì việc sử dụng các hóa chất này, thường là khá độc, được giảm đi và tổng thể tích được xử lý và dự trữ cũng được giảm. Hơn nữa, còn giảm lượng chất thải hóa học khi tái sinh con hà.

Khía cạnh mới khác của sáng chế là ở chỗ thời gian thường đủ để đạt được sự cân bằng thẩm thấu với chất bảo quản cryo được bổ sung trước khi làm đông lạnh để tránh sự kết tinh nội bào đường như là yếu tố ít quan trọng đối với con hà so với các sinh vật khác.

Ngoài etylen glycol, các chất bảo quản cryo đã biết khác có thể được sử dụng với phương pháp theo sáng chế như DMSO, cũng như hỗn hợp của etylen glycol và propylen glycol hoặc glyxerol.

Trong văn cảnh của sáng chế, các giai đoạn sớm của cuộc đời của con hà có nghĩa bao gồm trứng, ấu trùng (ví dụ các giai đoạn ấu trùng nauplius), và, các con non của các sinh vật này. Cụ thể là, gồm cả các giai đoạn sống tự do phù du của các sinh vật biển này như các giai đoạn meroplankton.

Sự phân bố đồng nhất của nhiệt độ được hiểu là nhiệt độ không thay đổi hoặc chỉ thay đổi ở mức độ rất thấp trong hỗn hợp (sản phẩm).

Sự tiếp cận nhiệt độ được hiểu là đạt được nhiệt độ đồng nhất đã định $\pm 2^{\circ}\text{C}$ trong vật liệu trong quá trình bảo quản cryo.

Nhiệt độ kết tinh của các sinh vật trong hỗn hợp có thể được xác định bằng cách đo sự gia tăng nhiệt độ (sự giải phóng năng lượng) trong hỗn hợp mà diễn ra trong suốt quá trình kết tinh của chúng. Sự gia tăng này thường diễn ra ở nhiệt độ thấp hơn, tức là sau đó trong quy trình làm đông lạnh, so với sự giải phóng năng lượng do sự kết tinh chất bảo quản cryo theo sáng chế. Đối với các sinh vật trong hỗn hợp, nó thường ở khoảng -13°C , trong khi đó chất bảo quản cryo, ví dụ, etylen glycol kết tinh ở khoảng -20 đến -22°C .

Sự bảo quản quy mô lớn được hiểu là phương pháp thích hợp để bảo quản cryo các lượng trong cùng một đơn vị hoặc cùng một mẻ, mà lớn hơn một cách đáng kể so với các lượng thường được bảo quản cryo bằng các kỹ thuật đã biết như trong các ống hút nhỏ và dưới quy mô microlit hoặc mililit. Các lượng này điển hình là 5 gam hoặc lớn hơn (vài trăm gam hoặc thậm chí trên 1 kg), mà được bảo quản đồng thời cùng lúc trong cùng một đơn vị (đồ chứa). Tuy nhiên, điều này không loại trừ việc phương pháp có thể được sử dụng đối với các thể tích hoặc các lượng nhỏ hơn nếu muốn. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng phương pháp này không chỉ giới hạn ở việc sử dụng duy nhất cho việc bảo quản cryo quy mô lớn, mà có thể còn được sử dụng với các lượng và các thể tích nhỏ hơn.

Làm tái sinh các sinh vật được bảo quản cryo

Sự tái sinh hiệu quả các sinh vật được bảo quản cryo có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau. Các túi nhỏ chứa các sinh vật đông lạnh có thể

được làm rã đông trong bồn nước ở nhiệt độ 30 đến 40°C, trong đó quan trọng là các túi này được liên tục đảo trộn nhiều hoặc ít để đạt được sự phân bố nhiệt độ đồng nhất bên trong các túi. Sau khi rã đông các sinh vật được rót lên lưới lọc cỡ lỗ 100 µm và rửa bằng nước biển (tốt hơn là ít nhất là nhỏ hơn 10°C) để loại bỏ chất bảo quản cryo. Sau khi rửa, ấu trùng nauplius được làm tái sinh trong nước biển được sục khí (ở nhiệt độ nhỏ hơn 5°C, tốt hơn là từ 0 đến 3°C) trong thời gian trên 3 giờ để đạt được hoạt động bơi tốt. Hoạt động bơi thậm chí tốt hơn đạt được trong khoảng thời gian 10 đến 36 giờ. Nhiệt độ của ấu trùng nauplius đã rã đông có thể được từ từ làm thích nghi với nhiệt độ của bể cá trong tiến trình pha tái sinh.

Để dẫn đến hoạt động bơi thậm chí tốt hơn của sinh vật (ví dụ, ấu trùng nauplius của hà) sau khi rã đông, tốt hơn là nghiền thành phần đông lạnh của các túi nhỏ trên rây hoặc máy lọc mà được rửa liên tục bằng nước biển tốt hơn là ở nhiệt độ lạnh hơn 10°C. Sau khi rửa, ấu trùng nauplius được tái sinh trong nước biển được sục khí (dưới 5°C, tốt hơn là 0 đến 3°C) trong thời gian trên 3 giờ để đạt được hoạt động bơi tốt. Hoạt động bơi thậm chí tốt hơn đạt được trong khoảng thời gian 6 đến 36 giờ. Nhiệt độ của ấu trùng nauplius đã rã đông có thể được từ từ làm thích nghi với nhiệt độ của bể cá trong tiến trình pha tái sinh.

Cách khác, để dẫn đến khả năng sống sót thậm chí cao hơn của các sinh vật được rã đông là thực hiện phương pháp trong đó thành phần chứa trong túi nhỏ đã được nghiền được ủ trong thùng nước biển và sục khí. Nhược điểm của phương pháp này là nồng độ còn lại chất bảo quản cryo trong các sinh vật/nước là có tiềm năng cao hơn, điều này có thể gây độc trong ứng dụng sau này như trong việc cho ăn đầu tiên cho ấu trùng cá. Khi sử dụng etylen glycol làm chất bảo quản cryo, nồng độ cuối cùng của chất này không nên vượt quá 100 ppm trên lít trong bước cho ăn đầu tiên.

Thậm chí được ưu tiên nữa là phương pháp trong đó thành phần chứa trong các túi nhỏ được nghiền trong thể tích nhỏ của nước biển được sục khí có nhiệt độ dưới 5°C và được ủ cho đến khi được rã đông (tùy thuộc vào thể tích điển hình sau 15 đến 30 phút). Sau đó nước chứa chất bảo quản cryo được loại bỏ bằng cách sử dụng máy lọc với cỡ lỗ dưới 120 µm. Sau đó, các con vật được đưa vào thùng đã nạp nước biển để tái sinh và làm thích nghi nhiệt độ. Nhằm mục đích này, chúng thường được giữ ở đó trong vài giờ. Nhiệt độ trong bình này nên nhỏ hơn 5°C ở thời điểm

bắt đầu. Trong quá trình ủ, nhiệt độ có thể được tăng một cách cẩn thận đến nhiệt độ trong môi trường nuôi cá đích được sử dụng.

Thậm chí được ưu tiên nữa là phương pháp trong đó thành phần chứa trong các túi nhỏ được nghiền (hoặc các viên hoặc đã nghiền trước trực tiếp từ đồ chứa dự trữ nitơ lỏng) trong thể tích nước biển được sục khí có nhiệt độ dưới 5°C, và trong đó nước biển được liên tục rửa trôi (tỷ lệ pha loãng là >5 đến 10 lít/giờ) trong thời gian >4 giờ, và được tái sinh trong 8 giờ hoặc lâu hơn. Nhiệt độ có thể được làm thích nghi đến nhiệt độ yêu cầu trước khi cho các sinh vật này làm thức ăn cho ấu trùng hải sản.

Các chất hoạt hóa tùy ý như sucroza có thể được áp dụng trong suốt quá trình rã đông và tái sinh.

Các phương án của sáng chế còn được mô tả trong phần dưới đây, qua các ví dụ thực hiện sáng chế. Các ví dụ được mô tả, tương ứng với các phương án ưu tiên theo sáng chế bao gồm các bước sau:

1. Thu hoạch hoặc nuôi trồng trứng và/hoặc ấu trùng nauplius/ấu trùng/giai đoạn sớm của cuộc đời của loài hà đã chọn từ vùng triều, ví dụ, loài *Semibalanus balanoides* hoặc dưới vùng liên triều, loài *Balanus crenatus*.

1. Tùy ý đưa tùy ý các sinh vật vào các bình chứa cùng với nước và và sục khí để dự trữ tạm thời

2. Lọc các sinh vật với lượng thích hợp trên máy lọc để rút nước

3. Bổ sung dung dịch 7,2 M etylen glycol (được giữ trên đá) vào vật liệu đã rút nước đã lọc ở tỷ lệ 1:4 đến 1:1 (theo thể tích). Theo giả thuyết này, điều này dẫn đến nồng độ cuối cùng là 3,6 M etylen glycol trong hỗn hợp nếu được làm cân bằng hoàn toàn với các sinh vật. Tuy nhiên, như được giải thích trên đây và được thể hiện trong các thử nghiệm dưới đây, sự đồng hóa chất bảo quản cryo bởi các sinh vật là khá thấp. Có các chỉ báo rằng sự cân bằng không đạt 100%, mà đúng ra là <15% với các sinh vật này. Chất bảo quản cryo chứa 40% etylen glycol và 60% nước biển theo tỷ lệ thể tích/thể tích (30 PSU; PSU= đơn vị độ mặn thực tế (Practical salinity unit) = g/kg) trong một thể tích (tương ứng với dung dịch 7,2 M). Nước biển còn được mặn hóa đến nồng độ cuối cùng là 50 đến 70 PSU trước khi được trộn với etylen glycol.

4. Diễn hình là khoảng 600g hỗn hợp các sinh vật và chất bảo quản cryo được cho vào túi nhựa (ví dụ, có kích thước 500 mm x190 mm x 10mm; được sản xuất

chịu được nhiệt độ rất thấp) và được ủ trong 30 phút ở 5°C (cân bằng) hoặc các đồ chứa thích hợp khác.

5. Các túi/các đồ chứa chứa các sinh vật được bảo quản cryo và chất bảo quản cryo, được đưa vào máy làm đông lạnh có thể lập trình hoặc vào máy siêu đông lạnh để làm đông lạnh.

6. Hỗn hợp được làm đông lạnh đến nhiệt độ khoảng -12 đến -13°C. Tốc độ làm đông lạnh là từ -0,05 đến -0,5 °C/phút được áp dụng trong khoảng nhiệt độ từ +5°C đến -12°C trong túi nêu trên chứa khoảng 600 g. Ở khoảng nhiệt độ từ khoảng -13°C đến khoảng -39°C, tốc độ làm đông lạnh là từ -0,025 đến -0,07°C/phút được sử dụng sao cho nhiệt độ được phân bố đồng đều trên toàn bộ vật liệu. Tốc độ làm đông lạnh cao hơn có thể được áp dụng ở giai đoạn này mà không gây hại đến các sinh vật miễn là đạt được sự phân bố nhiệt độ đồng nhất trong vật liệu. Đây là trường hợp đặc biệt khi thời gian giữ được áp dụng (xem trên đây).

7. Các sinh vật trong hỗn hợp thường bắt đầu kết tinh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -12°C đến -16°C. Trong khoảng này, sự gia tăng nhiệt độ do sự giải phóng nhiệt phải là thấp nhất có thể. Điều này đạt được bằng tốc độ làm đông lạnh được ưu tiên là từ -0,02 đến -0,1°C trên phút. Cách khác, nhiệt độ có thể giữ không đổi xung quanh khoảng từ -12 đến -15°C trong vài giờ sao cho đạt được sự phân bố nhiệt độ đồng nhất trong túi trước khi bắt đầu kết tinh.

8. Chất bảo quản cryo kết tinh ở nhiệt độ khoảng -22°C. Trong khoảng này, sự gia tăng nhiệt độ do sự giải phóng nhiệt phải là thấp nhất có thể. Điều này đạt được bằng tốc độ làm đông lạnh được ưu tiên là từ -0,02 đến -0,1°C/phút, tốt hơn là -0,04°C/phút. Cách khác, nhiệt độ có thể giữ không đổi xung quanh khoảng từ -22 đến -25 °C trong vài giờ sao cho đạt được sự phân bố nhiệt độ đồng nhất trong túi trước khi bắt đầu kết tinh.

9. Tốc độ làm đông lạnh chậm điển hình là từ -0,01 đến -0,1°C/phút, tốt hơn là -0,04°C/phút, được áp dụng trong khoảng nhiệt độ từ khoảng -25 đến khoảng -38 đến -43°C. Thời gian được sử dụng trong bước này tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 20 giờ, tốt hơn là trong khoảng 12 đến 20 giờ.

10. Vật liệu được làm đông lạnh được loại bỏ nhanh chóng ra khỏi máy làm đông lạnh và được đưa vào nitơ lỏng và được dự trữ ở nhiệt độ cryo (ví dụ, -196°C) cho đến khi làm tái sinh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Thử nghiệm 1 - Thử nghiệm độc tính

Ấu trùng nauplius ở giai đoạn I và II của loài hà *Semibalanus balanoides* được tiếp xúc với dung dịch 7,2 M của etylen glycol (dung dịch gốc) và được dự trữ trên đá. Các mẫu được lấy ra sau 0, 1, 2, 4, 8, 12, và 24 giờ và chất bảo quản cryo được rửa để kiểm tra khả năng sống sót của ấu trùng nauplius. Các mức khả năng sống sót được xác định là 0, 1, 2, 3, 4 và 5. “0” là không hoạt động (ấu trùng nauplius chết), 1-3 là sự co giập của các phần phụ là kém hơn ấu trùng nauplius trước khi được bảo quản cryo, nhưng 3 là gần với khả năng bơi tự nhiên. 4 là khả năng bơi như ấu trùng nauplius trước khi được bảo quản cryo, và 5 là ấu trùng nauplius được kích thích quá mức. Ngạc nhiên là, tất cả các ấu trùng nauplius được hồi phục (mức 2-3), và thể hiện khả năng bơi tương đối tốt (80-90% số đối tượng), thậm chí sau 24 giờ tiếp xúc với chất bảo quản cryo.

Khả năng sống sót cao thậm chí sau 24 giờ chỉ ra rằng ấu trùng nauplius giai đoạn I và II của hà bất ngờ là có thể dung nạp nồng độ cao của etylen glycol trong thời gian dài. Điều này có thể chỉ ra rằng etylen glycol chỉ được các con vật hấp thu ở mức độ giới hạn, vì nồng độ này thường được xem như là độc hại trong suốt quá trình tiếp xúc thời gian dài. Giả thiết hấp thu giới hạn etylen glycol trong quá trình cân bằng được hỗ trợ bằng kết quả phân tích etylen glycol trong ấu trùng nauplius của được bảo quản cryo được làm tái sinh sau khi rã đông (xem dưới đây). Ngay sau khi rã đông, ấu trùng nauplius được rút nước và được làm đông lạnh lại. Ấu trùng nauplius được phân tích về hàm lượng etylen glycol của chúng. Kết quả chỉ ra rằng chỉ 5% lượng chất bảo quản cryo được hấp thu bởi các sinh vật. Mặc dù một lượng etylen glycol nhất định có thể đã khuếch tán ra khỏi các sinh vật trong quy trình rã đông trước khi phân tích, nhưng nồng độ etylen glycol trong các sinh vật hầu như là khá thấp dưới nồng độ cân bằng hoàn toàn với chất bảo quản cryo.

Thử nghiệm 2— Bảo quản cryo sử dụng các chất bảo quản cryo khác nhau

Tính thích hợp của các chất bảo quản cryo khác nhau được thử nghiệm trong các thử nghiệm được mô tả dưới đây bằng cách sử dụng phương pháp bảo quản cryo theo sáng chế. Chi tiết về phương pháp bảo quản cryo và quy trình rã đông được áp dụng trong các thử nghiệm này là như sau:

Ấu trùng nauplius của hà (*Semibalanus balanoides* hoặc *Balanus crenatus*) được rút nước và cô đặc (10% khối lượng khô) và được trộn theo tỷ lệ 1:1 với chất bảo quản cryo (trên đá). Hỗn hợp này được nạp, bịt kín và làm cân bằng trong túi (600 gam chứa 300 ml chất bảo quản cryo và 300 ml con hà) trong 30 phút ở 5°C trước khi đưa vào máy làm đông lạnh được kiểm soát. Túi được đưa vào giá nhôm, và các máy ghi nhiệt độ được đưa vào trong túi này và đưa vào trong máy làm đông lạnh để đo nhiệt độ của không khí. Cách khác, lượng nhỏ hơn khoảng 60 g hoặc các lọ nhỏ được sử dụng trong các thử nghiệm này.

Sau khi làm đông lạnh từ 5 xuống -42°C, với thời gian >12 giờ sử dụng phương pháp theo sáng chế, các túi được ngâm trong nitơ lỏng cho đến khi nhiệt độ -196°C đạt được một cách đồng nhất bên trong các túi này. Các túi được đưa vào các tủ chứa cryo (với nitơ lỏng) dung tích 175 lít, và dự trữ trong thời gian trên 48 giờ. Để kiểm tra khả năng sống sót, các túi được lấy ra khỏi tủ chứa cryo, nghiền để lấy ra thành phần bên trong túi và làm rã đông trong nước biển lạnh (dưới 5°C). Sau 15 phút, ấu trùng nauplius đã rã đông được rửa trên máy lọc 100 µm để loại bỏ chất bảo quản cryo. Sự tái sinh được thực hiện trong thời gian >8 giờ trong thùng được sục khí với nước biển 30 PSU (nhiệt độ ban đầu là 2,5°C).

A) Etylen glycol:

Ấu trùng nauplius giai đoạn I và II của loài hà *Semibalanus balanoides* hoặc *Balanus crenatus* được bảo quản cryo bằng cách sử dụng dung dịch etylen glycol 7,2 M làm chất bảo quản cryo sau khi trộn chất bảo quản cryo với các sinh vật với tỷ lệ 1:1. Khả năng sống sót cao đạt được sau khi rã đông, với >50% có hoạt động bơi tự nhiên (mức 4) và số còn lại có hoạt động bơi mức 1-3 (nhỏ hơn mức tự nhiên, nhưng một số gần với mức hoạt động bơi tự nhiên).

B) Dimetyl sulfoxit:

Ấu trùng nauplius giai đoạn I và II của loài hà *Semibalanus balanoides* được xử lý với dung dịch dimetyl sulfoxit 6M (DMSO) làm chất bảo quản cryo và trộn chất bảo quản cryo với các sinh vật theo tỷ lệ 1:1. Sự cân bằng đạt được trong 30 phút ở nhiệt độ 3 đến 5°C.

DMSO có độc tính cao hơn so với etylen glycol và vì lý do này nó ít được ưu tiên hơn mặc dù khả năng sống sót sau khi rã đông là có thể so sánh với ấu trùng nauplius của hà được tiếp xúc với etylen glycol.

C) Glucoza hoặc propylen glycol:

Etylen glycol được thay thế bằng glucoza hoặc propylen glycol (40% glucoza, metanol hoặc propylen glycol theo thể tích được trộn với 60% nước biển theo thể tích; etylen glycol 3,4 M, propylen glycol 5,4 M) và được thử nghiệm với ấu trùng nauplius giai đoạn I và II của loài *Semibalanus balanoides* (tỷ lệ thể tích 1:1) áp dụng phương pháp bảo quản cryo theo sáng chế. Mặc dù vẫn phát hiện thấy tỷ lệ sống sót nhỏ nhất định nhưng phần trăm số ấu trùng nauplius có thể sống sót sau khi rã đông vẫn là rất nhỏ so với việc sử dụng etylen glycol làm chất bảo quản cryo.

D) Etylen glycol và propylen glycol hoặc glyxerol:

Tác dụng của các hỗn hợp khác nhau của các chất bảo quản cryo etylen glycol và propylen glycol hoặc glyxerol đã được thử nghiệm về khả năng sống sót của ấu trùng nauplius giai đoạn I và II của loài *Semibalanus balanoides* sau khi bảo quản cryo theo sáng chế. Trong thử nghiệm này, 25, 50, hoặc 75% etylen glycol được thay thế bằng propylen glycol hoặc glyxerol (tỷ lệ thể tích/thể tích). Sự trao đổi 75% etylen glycol bằng propylen glycol hoặc glyxerol dẫn đến khả năng sống sót thấp hơn nhiều so với dung dịch etylen glycol 7,2 M (tỷ lệ thể tích so với các sinh vật là 1:1). Việc thay thế 50% etylen glycol bằng propylen glycol hoặc glyxerol cho kết quả tốt hơn về mặt khả năng sống sót (mặc dù 50% propylen glycol cho kết quả tốt hơn nhiều so với 50% glyxerol), trong khi 25% propylen glycol dẫn đến khả năng sống sót có thể so sánh hoặc tốt hơn etylen glycol khi được sử dụng làm chất bảo quản cryo. 25% glyxerol cho kết quả tốt hơn so với 50% glyxerol, nhưng vẫn là kết quả kém hơn nhiều so với 25% propylen glycol.

Vì propylen glycol là ít độc hơn so với etylen glycol nên hỗn hợp 25% propylen glycol và 75% etylen glycol thể hiện là chất bảo quản cryo được ưu tiên cho phương pháp bảo quản cryo theo sáng chế. Cụ thể, khi được sử dụng làm khẩu phần ăn thay thế thức ăn hải sản sống.

Thử nghiệm 3 – Bảo quản cryo sử dụng các tỷ lệ thể tích khác nhau của các chất bảo quản cryo

Thử nghiệm tác dụng của các tỷ lệ thể tích khác nhau của các chất bảo quản cryo so với thể tích của các sinh vật được bảo quản. Các chất bảo quản cryo xuyên thấm nội bào thường được bổ sung với tỷ lệ thể tích là 50% chất bảo quản cryo trên 50% thể tích các sinh vật được bảo quản.

Tác dụng của các tỷ lệ thể tích khác nhau của chất bảo quản cryo etylen glycol đối với khả năng sống sót của ấu trùng nauplius giai đoạn I và II của loài hà *Semibalanus balanoides* được thử nghiệm. Các mẫu của các sinh vật này được bảo quản cryo với tỷ lệ thể tích là A) 30% chất bảo quản cryo trên 70% các sinh vật (tỷ lệ thể tích/thể tích) và B) 40% chất bảo quản cryo trên 60% các sinh vật (tỷ lệ thể tích/thể tích). Đối chứng là C) 50% chất bảo quản cryo trên 50% các sinh vật (tỷ lệ thể tích/thể tích). Tất cả các thử nghiệm đều được tiến hành trên ba mẫu lặp.

Các sinh vật được bảo quản cryo theo phương pháp của sáng chế và sau đó được làm tái sinh. Không có sự khác biệt có ý nghĩa về khả năng sống sót giữa các mẫu được xử lý.

Kết quả này thể hiện rằng lượng chất bảo quản cryo rất nhỏ dường như được hấp thu thực tế vào con hà và là cần thiết cho việc bảo vệ nội bào trong quá trình bảo quản cryo. Điều này là trái ngược với các sinh vật khác, trong đó điều cốt yếu đối với sự tái sinh đã được biết đến là chất bảo quản cryo được hấp thu vào nội bào và nồng độ phải là rất cao để đạt đến sự cân bằng trước khi làm đông lạnh. Ngạc nhiên là, điều này dường như không có hiệu lực đối với ấu trùng nauplius của hà. Ấu trùng nauplius của hà dường như không phụ thuộc vào sự thiết lập cân bằng với chất bảo quản cryo trước khi bước làm đông lạnh trong quy trình bảo quản cryo được thực hiện như theo phương pháp được bộc lộ trong sáng chế. Điều này còn được chứng minh bằng các quan sát được thực hiện trong trường hợp sáng chế, trong đó các sinh vật có thể được bảo quản cryo trước khi đạt đến sự cân bằng (xem cả thử nghiệm 4).

Thử nghiệm 4 – Tác dụng của thời gian cân bằng đối với khả năng sống sót

Tác dụng của thời gian ủ rút ngắn trước khi đạt đến sự cân bằng với chất bảo quản cryo được thử nghiệm với các mẫu ấu trùng nauplius I và II của *Semibalanus balanoides*.

Các sinh vật được ủ trong 0, 15, 30, 60 và 90 phút trong etylen glycol 7,2 M ở 5°C (tỷ lệ thể tích với các sinh vật là 1:1). Sau đó, các sinh vật được bảo quản cryo bằng phương pháp được mô tả trong sáng chế, dự trữ trong nitơ lỏng trong 48 giờ, rã đông và làm tái sinh. Ấu trùng nauplius của hà được phân tích về khả năng sống sót của chúng sử dụng kính hiển vi kép. Không thấy có khác biệt đáng kể về khả năng sống sót giữa các cách xử lý, ngoại trừ đối với mẫu được dự trữ trong 90 phút, mẫu này thể hiện các sinh vật sống sót kém hơn so với các mẫu xử lý khác.

Thử nghiệm 5 - Sự hấp thu nội bào của con hà đối với chất bảo quản cryo

Ấu trùng nauplius của loài hà *Semibalanus balanoides* được bảo quản cryo trong các gói 600 g như được mô tả trong sáng chế sử dụng etylen glycol 7,2 M với tỷ lệ thể tích đối với các sinh vật là 1:1. Sau khi rã đông, ấu trùng nauplius được phân tích về etylen glycol ngay sau khi rút nước. Mẫu vật liệu đông lạnh nhỏ được cho vào máy lọc, và rửa cho đến khi nó được rã đông, và sau đó được làm đông lạnh và phân tích. Đây là mẫu thời điểm không, mẫu này có hàm lượng etylen glycol nằm trong khoảng từ 7400 đến 11000 ppm. Điều này chỉ ra rằng khoảng 5% etylen glycol được hấp thu bởi các sinh vật. Khả dĩ hơn là, vì sự rò rỉ của etylen glycol có thể diễn ra, nhưng cũng khó tưởng tượng rằng >10% etylen glycol có thể được phát hiện trong các sinh vật. Sự cân bằng hoàn toàn được cho là sẽ dẫn đến 3,6 M etylen glycol bên trong các sinh vật. Dung dịch gốc 7,2 M etylen glycol có nồng độ 400 000 ppm. Sau đó 600 gam mẫu được đưa vào 15 lit nước biển, và được phân tích sau 15 phút (được rút nước và đông lạnh), mẫu thể hiện từ 6100 đến 7000 ppm etylen glycol, là lượng nhỏ hơn <2% lượng etylen glycol được bổ sung hoặc khoảng 0,1 M etylen glycol. Đối với bước thứ hai (bắt chước việc rửa sản phẩm ở trại nuôi cá), rút nước, và bổ sung 15 lít nước biển vào để rửa ấu trùng nauplius của hà, nồng độ bên trong các sinh vật là <300 ppm. Khi được tái sinh, ấu trùng nauplius của hà được làm rút nước biển lần nữa, và bổ sung 30 lít nước biển. Sau một giờ, hàm lượng etylen glycol trong ấu trùng nauplius đã rút nước của hà là <25 ppm. Sau hai giờ, hàm lượng này trong ấu trùng nauplius đã rút nước của hà nằm dưới mức phát hiện được là 10 ppm. Mức dung nạp của các con vật sống dưới nước đối với etylen glycol là khá biến đổi, nhưng mức 100 ppm hoặc nhỏ hơn được xem như là không độc đối với các sinh vật sống dưới nước nói chung.

Kết quả chỉ ra rằng khoảng 5% lượng chất bảo quản cryo được hấp thu thực tế bởi các sinh vật. Điều này là ngược lại với sự hấp thu được báo cáo của loại chất bảo quản cryo này ở các sinh vật khác trong quá trình bảo quản cryo bằng các chất bảo quản cryo tác động nội bào. Các con hà dường như là không hấp thu các chất bảo quản cryo ở tỷ lệ cao. Không giới hạn bởi giả thuyết bất kỳ, điều này có thể là kết quả của các chất chống đông lạnh nội sinh đã có trong các sinh vật sống trong vùng duyên hải, trong đó sự tiếp xúc với nhiệt độ thấp không phải là bất thường.

Thử nghiệm 6 – Con hà được bảo quản cryo được tạo viên để sử dụng làm thức ăn

Sáng chế còn bộc lộ các phương pháp sản xuất các hạt hoặc các viên thức ăn được bảo quản cryo. Các thử nghiệm đã được thực hiện để sản xuất một cách hiệu quả các hạt thức ăn được tạo viên với các đơn vị nhỏ hơn để sử dụng sau này làm thức ăn đầu tiên cho việc nuôi trồng hải sản.

Theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng các hạt thực phẩm được tạo viên được bảo quản cryo có tỷ lệ tái sinh cao có thể được sản xuất bằng hai phương pháp khác nhau:

A) Các mẻ vật liệu lớn mà trước đó đã được bảo quản cryo theo phương pháp như được bộc lộ trong sáng chế ví dụ như các túi nhỏ/các đĩa chứa vài trăm gam vật liệu và được dự trữ trong nitơ lỏng có thể được bẻ gãy bằng cách cơ học thành các hạt/các viên nhỏ hơn trong nitơ lỏng. Thử nghiệm được thực hiện trong các túi 600 g như được mô tả trong sáng chế sử dụng 7,2 M etylen glycol với tỷ lệ thể tích với các sinh vật là 1:1. Các hạt thu được có thể được dự trữ trực tiếp trong nitơ lỏng mà không phải đóng gói hoặc bịt kín theo cách bất kỳ. Việc nghiền không ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh sau này thậm chí khi được dự trữ trong thời gian lâu hơn 7 tháng trong nitơ lỏng sau khi nghiền.

B) Các viên có thể được sản xuất trong máy làm đông lạnh bảo quản cryo có kiểm soát bằng cách làm đông lạnh các sinh vật trong các thể tích nhỏ hơn mà thường là từ 5 đến 50 ml sử dụng phương thức theo sáng chế. Các viên được sản xuất bằng cách sử dụng các khuôn silicon có kích cỡ và hình dạng thích hợp trong quy trình bảo quản cryo theo sáng chế sử dụng 7,2 M etylen glycol ở tỷ lệ thể tích với các sinh vật là 1:1. Nhờ đó có thể đạt được các hình dạng và kích cỡ của hạt/viên chuẩn hóa. Việc làm đông lạnh trong các khuôn này không ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh sau này thậm chí khi được dự trữ trong thời gian lâu hơn 7 tháng trong nitơ lỏng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bảo quản cryo đối với trứng, ấu trùng nauplius và/hoặc con non của con hà (barnacles), phương pháp này bao gồm các bước được thực hiện theo thứ tự như sau:
 - rút nước từ các sinh vật này,
 - bổ sung dung dịch chất bảo quản cryo có nồng độ 5 đến 8 M chứa chất bảo quản cryo được chọn từ nhóm bao gồm etylen glycol, propylen glycol, glyxerol, và dimetyl sulfoxit hoặc hỗn hợp của chúng,
 - làm đông lạnh hỗn hợp trong đồ chứa theo các bước tiếp theo dưới đây:
 - (i) làm đông lạnh ở tốc độ làm đông lạnh chậm thứ nhất là không lớn hơn -1°C/phút cho đến khi tiếp cận nhiệt độ tại đó các sinh vật trong hỗn hợp bắt đầu kết tinh;
 - (ii) làm đông lạnh ở tốc độ làm đông lạnh chậm thứ hai là không lớn hơn $-0,1^{\circ}\text{C/phút}$ cho đến khi các sinh vật và chất bảo quản cryo trong hỗn hợp được kết tinh hoàn toàn; và
 - (iii) làm đông lạnh ở tốc độ làm đông lạnh nhanh thứ nhất đến nhiệt độ bảo quản cryo.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tốc độ làm đông lạnh chậm thứ nhất là $-0,5^{\circ}\text{C/phút}$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là $-0,3^{\circ}\text{C/phút}$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là $-0,1^{\circ}\text{C/phút}$ hoặc nhỏ hơn.
3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó bước cân bằng được thực hiện trước bước làm đông lạnh thứ nhất, tốt hơn là kéo dài từ 5 đến 60 phút, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 15 đến 30 phút, tốt nhất là khoảng 15 phút.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó tốc độ làm đông lạnh chậm thứ hai là nằm trong khoảng từ $-0,015$ đến $-0,1^{\circ}\text{C/phút}$, tốt hơn là nằm trong khoảng từ $-0,04$ đến $-0,08^{\circ}\text{C/phút}$, tốt hơn nữa là $-0,05^{\circ}\text{C/phút}$, tốt nhất là $-0,04^{\circ}\text{C/phút}$.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó các sinh vật được rút nước có hàm lượng khối lượng khô từ 6 đến 14% sau khi rút nước, tốt hơn nữa là từ 8 đến 12% và tốt nhất là khoảng 10%.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó nồng độ của chất bảo quản cryo để bổ sung vào các sinh vật là nằm trong khoảng từ 6 đến 8 M, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 6,5 M đến 7,5 M, tốt nhất là 7,2 M.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó chất bảo quản cryo là hỗn hợp của etylen glycol và propylen glycol, tốt hơn là hỗn hợp của khoảng 50% mỗi chất, tốt hơn nữa là hỗn hợp của khoảng 75% etylen glycol và 25% propylen glycol.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó lượng vật liệu được bảo quản cryo trong một đơn vị ít nhất là từ 5 g đến 10 g, tốt hơn là ít nhất 10 g đến 50 g, tốt hơn nữa là ít nhất 50 g đến 100 g, tốt nhất là từ 200 g đến 2000 g.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên trong đó tốc độ làm đông lạnh chậm thứ nhất được kết thúc khi tiếp cận được nhiệt độ đồng nhất trong vật liệu là khoảng từ -10°C đến -13°C, tốt hơn là khoảng từ -12°C đến -13°C.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên trong đó toàn bộ quy trình làm đông lạnh kéo dài ít nhất là 5 giờ, tốt hơn là từ 6 đến 10 giờ, tốt hơn từ 10 đến 12 giờ, tốt nhất là trên 12 giờ.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó các sinh vật được bảo quản cryo trong các thể tích từ 5 đến 50 ml, tốt hơn là trong thể tích từ 10 đến 25 ml, trong các khuôn có kích cỡ thích hợp, tốt hơn là các khuôn được làm bằng silicon.
12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó các sinh vật được bảo quản cryo trong các đĩa hoặc các túi và các đĩa hoặc các túi với các sinh vật được bảo quản cryo này bị nghiền thành các hạt nhỏ hơn trong nitơ lỏng, do đó các hạt thu được tốt hơn là được dự trữ mà không đóng gói trong nitơ lỏng.

13. Phương pháp tái sinh các sinh vật được bảo quản cryo theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, áp dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được chọn từ:
- làm rã đông chúng trong bể nước ấm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C;
 - nghiền vật liệu đông lạnh và rửa nó trong nước biển lạnh chảy ở nhiệt độ 10°C hoặc nhỏ hơn, và sau đó làm tái sinh chúng ở nhiệt độ <5°C trong thời gian lên tới 36 giờ; hoặc
 - nghiền vật liệu đông lạnh và ủ nó trong nước biển với sự sục khí ở nhiệt độ 10°C hoặc nhỏ hơn, và sau đó làm tái sinh chúng ở nhiệt độ <5°C trong thời gian lên tới 36 giờ.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó các sinh vật đã rã đông được làm thích nghi sau khi rã đông với nhiệt độ nước trong môi trường nuôi cá mà chúng sẽ được đưa vào đó.
15. Sản phẩm hoặc thức ăn được bảo quản cryo khác biệt ở chỗ sản phẩm hoặc thức ăn này thu được bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo điểm từ 1 đến 12.