(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) **1-0040793**

(51)[7] **A23K 50/80**; A23K 10/16; C12P 7/64; A23K 20/158; A01K 61/13; A23K 20/10

(13) **B**

(21) 1-2017-02653
(22) 11/12/2015
(86) PCT/EP2015/079417 11/12/2015
(87) WO2016/092071 16/06/2016
(30) 14197713.2 12/12/2014 EP; 14020113.8 18/12/2014 EP
(45) 26/08/2024 437
(43) 27/11/2017 356A
(73) DSM IP ASSETS B.V. (NL)
Het Overloon 1 NL-6411 TE Heerlen, The Netherlands
(72) MARTIN, Christian (US); SANTIGOSA, Ester (ES); VERLHAC, Vivien (FR).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ỔN ĐỊNH SẢN PHẨM THỊT TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN VÀ THỨC ĂN NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất ổn định sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản bằng cách cho cá ăn chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản trong các chu kỳ ăn của nó, trong đó phương pháp này bao gồm bước sản xuất chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản bằng cách thay thế toàn bộ hoặc một phần dầu cá trong chế phẩm bằng một nguồn vi khuẩn duy nhất chứa axit eicosapentaenoic ("EPA") và axit docosahexaenoic ("DHA"). Theo phương án được ưu tiên, nguồn vi khuẩn chứa DHA và EPA tạo ra từ vi sinh vật/vi khuẩn của chi *Schizochytrium* hoặc *Thraustochytrium.*

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này thuộc lĩnh vực nuôi trồng thuỷ sản. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất ổn định sản phẩm thịt trong nuôi trồng thủy sản bằng cách cho cá ăn chế phẩm thức ăn nuôi trồng thuỷ sản chứa ít nhất một lượng dầu cá giảm trong chu kỳ ăn của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nuôi trồng thủy sản là hình thức nông nghiệp liên quan đến việc nhân giống, trồng trọt và tiếp thị động vật và thực vật thủy sinh trong môi trường có kiểm soát. Hiện nay, ngành nuôi trồng thủy sản là ngành sản xuất lương thực phát triển nhanh nhất trên thế giới. Ngành nuôi trồng thủy sản thế giới sản xuất khoảng 60 triệu tấn hải sản, trị giá hàng năm hơn 70 tỷ đô la (Mỹ). Ngày nay, cá nuôi chiếm khoảng 50% tổng số cá tiêu thụ trên toàn cầu. Tỷ lệ này dự kiến sẽ tăng do kết quả của việc đánh bắt cá bị thu hẹp trong cả môi trường biển và môi trường nước ngọt và mức tiêu thụ hải sản tăng lên (nghĩa là tổng số và bình quân đầu người). Ngày nay, các nhóm loài trong sản xuất nuôi trồng thuỷ sản, ví dụ, bao gồm cá chép và cá thuộc họ chép khác; hàu; nghêu, sò điệp và sò lông; tôm và tôm pandan; cá hồi, cá hồi chấm và cá đối; trai; cá rô phi và họ cá hoàng đế khác; và sò điệp.

Trong khi một số loài nuôi trồng thủy sản (ví dụ như cá rô phi) có thể được cho ăn theo chế độ ăn chay hoàn toàn, nhiều loài khác được cho ăn theo chế độ ăn thịt. Thông thường, thức ăn cho cá ăn thịt bao gồm bột cá và dầu cá có nguồn gốc từ các loài cá biển nhỏ đánh bắt tự nhiên (chủ yếu là cá cơm, cá sòng, cá tuyết xanh, cá trứng, lươn cát và cá mòi dầu). Loại cá biển này được chế biến thành bột cá và dầu cá, với sản phẩm cuối cùng thường là thức ăn dạng viên hoặc dạng mảnh, phụ thuộc vào kích cỡ của cá. Các thành phần khác của chế phẩm thức ăn nuôi trồng thuỷ sản có thể bao gồm protein thực vật, vitamin, khoáng chất và sắc tố theo yêu cầu.

Dầu cá biển thường được sử dụng làm nguồn lipid duy nhất trong thức ăn cho cá thương phẩm bởi tính sẵn có, giá cả cạnh tranh và sự phong phú của các axit béo thiết yếu có mặt trong sản phẩm này. Ngoài ra, dầu cá dễ dàng cung cấp các axit béo

thiết yếu cần thiết cho sự tăng trưởng, thể chất, sinh sản và chức năng cơ thể bình thường của cá. Cụ thể hơn, tất cả các loài động vật có xương sống, kể cả cá, đều có nhu cầu về cả axit béo không bão hòa đa omega-6 và omega-3 ["PUFA: polyunsaturated fatty acid"]. Axit eicosapentaenoic ["EPA"; axit cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic; omega-3] và axit docosahexaenoic ["OHA"; axit cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic; omega-3 22:6] là cần thiết cho sự phát triển và thể chất của cá và thường được đưa vào thức ăn cho cá thương phẩm thông qua việc bổ sung dầu cá.

Ước tính rằng các chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản hiện đang sử dụng khoảng 87% nguồn cung cấp dầu cá toàn cầu làm nguồn lipid. Do sản lượng dầu cá hàng năm không tăng quá 1,5 triệu tấn/năm, nên ngành nuôi trồng thủy sản đang phát triển nhanh chóng không thể tiếp tục dựa vào nguồn cá biển hạn chế làm nguồn cung cấp dầu cá. Vì vậy, vấn đề cấp bách là tìm và thực hiện các giải pháp thay thế bền vững cho dầu cá có thể đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng trên toàn cầu đối với các sản phẩm cá.

Nhiều tổ chức nhận thấy những hạn chế nêu trên đối với sự sẵn có của dầu cá và tính bền vững của ngành nuôi trồng thủy sản. Ví dụ ở Mỹ, Cục Quản lý Đại dương và Khí quyển Quốc gia đang hợp tác với Bộ Nông nghiệp trong Sáng kiến thức ăn thay thế để "xác định các thành phần chế độ ăn thay thế để giảm lượng bột cá và dầu cá có mặt trong thức ăn nuôi trồng thuỷ sản trong lúc duy trì các lợi ích sức khoẻ quan trọng đối với con người của hải sản nuôi".

Bằng sáng chế Mỹ số 7,932,077 đề xuất *Yarrowia lipolytica* đã được thao tác di truyền tái tổ hợp có thể là nguồn bổ sung hữu hiệu cho hầu hết các thức ăn chăn nuôi, bao gồm thức ăn nuôi trồng thủy sản, dưới dạng phương pháp cung cấp các PUFA omega-3 và/hoặc omega-6 cần thiết và dựa trên thành phần protein:lipit:carbohydrat duy nhất của nó, cũng như profil carbohydrat phức tạp duy nhất (bao gồm tỷ lệ mannan:beta-glucan:chitin bằng khoảng 1:4:4,6).

Đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ số 2007/0226814 mô tả thực phẩm từ cá có chứa ít nhất một sinh khối thu được từ quá trình lên men vi sinh vật, trong đó sinh khối này chứa ít nhất 20% DHA so với tổng hàm lượng axit béo. Các vi sinh vật được ưu tiên sử dụng làm nguồn DHA là các sinh vật thuộc chi *Stramenopiles.*

Nếu ngành nuôi trồng thủy sản đang phát triển là để duy trì sự đóng góp của nó

cho nguồn cung cấp cá trên thế giới, trong lúc đó việc sản xuất các sản phẩm thịt trong nuôi trồng thuỷ sản vẫn tiếp tục mang lại các lợi ích về sức khoẻ cho người tiêu dùng thì việc giảm sử dụng cá hoang dã là cần thiết cùng với việc áp dụng các thực tiễn quản lý hữu ích về sinh thái của nguồn cung cá trên thế giới

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất ổn định sản phẩm thịt trong nuôi trồng thuỷ sản bằng cách cho cá ăn chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản trong các chu kỳ ăn của nó. Phương pháp này bao gồm bước sản xuất chế phẩm thức ăn nuôi trồng thuỷ sản bằng cách thay thế toàn bộ hoặc một phần dầu cá trong chế phẩm bằng nguồn vi khuẩn duy nhất chứa axit eicosapentaenoic ("EPA") và axit docosahexaenoic ("DHA").

Theo ví dụ được ưu tiên, nguồn vi khuẩn chứa DHA và EPA được sản xuất bằng cách sử dụng quy trình dựa trên khả năng tự nhiên của các vi khuẩn tự nhiên của loài *Schizochytrium.*

Theo phương án thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất ổn định sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản bằng cách cho cá ăn chế phẩm thức ăn nuôi trồng thuỷ sản trong các chu kỳ ăn của nó, trong đó chế phẩm thức ăn nuôi trồng thuỷ sản này chứa tổng lượng EPA và DHA có nguồn gốc từ nguồn vi khuẩn nêu trên bằng ít nhất khoảng 0,8% được đo dưới dạng phần trăm trọng lượng của chế phẩm thức ăn nuôi trồng thuỷ sản.

Theo phương án thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất ổn định sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản bằng cách cho cá ăn trong các chu kỳ ăn của nó chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản có nguồn dầu vi khuẩn EPA và DHA, trong đó dầu vi khuẩn được cung cấp dưới dạng được lựa chọn từ nhóm bao gồm: sinh khối, sinh khối đã xử lý, dầu tinh chế một phần và dầu tinh khiết, dầu bất kỳ trong số chúng thu được từ một vi khuẩn.

Theo phương án thứ tư, sáng chế đề xuất chế phẩm phụ gia thức ăn cho các sản phẩm thức ăn cho cá, chế phẩm phụ gia này chứa một nguồn vi khuẩn duy nhất chứa axit eicosapentaenoic ("EPA") và axit docosahexaenoic ("DHA").

Theo phương án thứ năm, sáng chế đề cập đến thức ăn nuôi trồng thủy sản chứa chế phẩm phụ gia vi khuẩn chứa EPA và DHA, trong đó chất phụ gia vi khuẩn thu

được từ một vi khuẩn duy nhất.

Theo phương án thứ sáu, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất ổn định sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản bằng cách cho cá ăn trong các chu kỳ ăn của nó chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản, trong đó phương pháp này bao gồm bước sản xuất chế phẩm thức ăn nuôi trồng thuỷ sản bằng cách thay thế toàn bộ hoặc một phần dầu cá trong chế phẩm bằng nguồn vi khuẩn duy nhất chứa axit eicosapentaenoic (EPA) và axit docosahexaenoic ("DHA"), trong đó vi khuẩn này là vi khuẩn chuyển gen được thao tác di truyền để tạo ra axit béo không no có chứa dầu vi khuẩn chứa EPA và DHA.

Tốt hơn là, vi khuẩn chuyển gen là một vi khuẩn thuộc bộ *Thraustochytriales.*

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Hệ số tiêu hóa biểu kiến của DHA trong thức ăn được bổ sung các lượng OvegaGold đã được phân loại. Các kết quả của phân tích thống kê được thể hiện trong Bảng 6.

Fig.2: Hệ số tiêu hóa biểu kiến của EPA trong thức ăn được bổ sung các lượng OvegaGold đã được phân loại. Các kết quả của phân tích thống kê được thể hiện trong Bảng 6.

Fig.3: Hệ số tiêu hóa biểu kiến của DHA trong thức ăn được bổ sung các lượng của OvegaGold đã được phân loại. Các kết quả của phân tích thống kê được thể hiện trong Bảng 6.

Fig.4: Mức lắng đọng axit béo omega-3 trong cơ sau khoảng 4 tuần cho cá ăn chế độ ăn thử nghiệm. Lượng cơ xác nhận độ sinh khả dụng cao của axit béo omega-3 từ nguồn vi khuẩn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong bản mô tả này, một số thuật ngữ và chữ viết tắt được sử dụng. Các định nghĩa dưới đây được đưa ra.

"Axit béo không bão hòa đa" (Polyunsaturated fatty acid) được viết tắt là "PUFA".

"Triaxylglyxerol" được viết tắt là "TAG".

"Axit béo toàn phần" (total fatty acid) được viết tắt là "TFA".

"Metyl este của axit béo" được viết tắt là "FAME".

"Trọng lượng tế bào khô" (dry cell weight) được viết tắt là "DCW".

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sáng chế" hoặc "sáng chế này" được dự định để nói tới tất cả các khía cạnh và phương án của sáng chế như được mô tả trong phần yêu cầu bảo hộ và bản mô tả ở đây và không nên được hiểu là bị giới hạn ở phương án hoặc khía cạnh cụ thể bất kỳ.

Thuật ngữ "chu kỳ ăn" của cá được dùng để chỉ các kỳ hoặc giai đoạn của quá trình phát triển (nghĩa là, giai đoạn phát triển) trong lúc đó cá được cho ăn khẩu phần ăn, hoặc thức ăn nuôi trồng thủy sản, trong quá trình sản xuất nuôi trồng thủy sản. Một ví dụ về chu kỳ ăn cho cá hồi Đại Tây Dương được nêu trong Bảng 1 dưới đây trong đó có 6 giai đoạn tương ứng với trọng lượng ban đầu và cuối cùng được ghi nhận. Chu kỳ ăn trong một số giai đoạn, cũng như trọng lượng ban đầu và cuối của cá đối với mỗi giai đoạn, có thể thay đổi đối với các dạng cá khác nhau và/hoặc đối với các ứng dụng nuôi trồng thủy sản khác nhau.

Bảng 1: Ví dụ về chu kỳ ăn hoặc các giai đoạn phát triển của cá

	Giai đoạn					
	1	2	3	4	5	6
Trọng lượng ban đầu (g)	100	250	800	1500	2500	3500
Trọng lượng cuối cùng (g)	250	800	1500	2500	3500	4500

Ở đây, thuật ngữ "chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản", "thức ăn nuôi trồng thủy sản" và "thức ăn thủy sản" được sử dụng thay thế lẫn nhau. Chúng được dùng để chỉ khẩu phần thức ăn được sản xuất ra hoặc khẩu phần thức ăn nhân tạo (nghĩa là, thức ăn công thức) để cung cấp hoặc để thay thế thức ăn tự nhiên trong ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản. Các thức ăn đã được chế biến sẵn này thường được sản xuất ở dạng mảnh, hạt hoặc viên nén. Thông thường, chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản được dùng để chỉ thức ăn được sản xuất nhân tạo mà có thể được sử dụng cho loài cá và giáp xác nuôi (nghĩa là, cả loài cá thực phẩm có giá trị thấp [nghĩa là, loài cá nước ngọt như cá chép, cá rô phi và cá da trơn] và các loại thủy sản có giá trị cao hơn cho thị trường cao cấp hoặc thị trường ngách [nghĩa là, chủ yếu các loài hải sản và loài di chuyển giữa nước ngọt và nước mặn như tôm, cá hồi, cá hồi chấm, cá cam, cá vược,

cá tráp và cá mú]). Các thức ăn công thức này được tạo nên từ các thành phần theo các tỷ lệ khác nhau bổ sung cho nhau để tạo ra khẩu phần thức ăn hoàn chỉnh về mặt dinh dưỡng cho các loài thủy sản nuôi. Chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản được sử dụng trong quá trình sản xuất "sản phẩm nuôi trồng thủy sản", trong đó sản phẩm này là các loài thủy sản được nuôi trồng thu hoạch được (nghĩa là, cá, loài giáp xác), thường được bán cho người tiêu dùng. Ví dụ, cá hồi được sản xuất thâm canh trong nuôi trồng thủy sản và do đó là sản phẩm nuôi trồng thủy sản.

Thuật ngữ "sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản" được dùng để chỉ sản phẩm thức ăn được dự định dành cho người tiêu dùng chứa ít nhất một phần thịt có nguồn gốc từ sản phẩm nuôi trồng thủy sản như nêu trên. Sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản, ví dụ, có thể là toàn bộ con cá hoặc miếng philê cắt từ cá, mỗi loại trong số chúng có thể được tiêu thụ dưới dạng thức ăn.

"Axit eicosapentaenoic" ["EPA"] là tên thông thường của axit eis- 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic. Axit béo này là axit béo omega-3 20:5. Thuật ngữ EPA như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ axit hoặc dẫn xuất của axit (nghĩa là, glyxerit, este, phospholipit, amit, lacton, muối hoặc chất tương tự) trừ khi có quy định cụ thể khác.

"Axit docosahexaenoic" ["DHA"] là tên thông thường của axit eis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic. Axit béo này là axit béo omega-3 22:6. Thuật ngữ DHA như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ axit hoặc dẫn xuất của axit (nghĩa là, glyxerit, este, phospholipit, amit, lacton, muối hoặc chất tương tự) trừ khi có quy định cụ thể khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thành phần bổ sung" được dùng để chỉ chất được tạo ra từ nguồn vi khuẩn mà được tạo ra ở dạng được chọn từ nhóm bao gồm: sinh khối, sinh khối đã qua xử lý, dầu tinh chế một phần và dầu tinh khiết, loại bất kỳ trong số chúng thu được từ một loại vi khuẩn duy nhất.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sinh khối" được dùng để chỉ vật liệu tế bào vi khuẩn. Sinh khối có thể được tạo ra một cách tự nhiên, hoặc có thể được tạo ra từ quá trình lên men chủng gốc nguyên thủy hoặc chủng đột biến hoặc sản phẩm gốc tái tổ hợp. Sinh khối có thể ở dạng tế bào toàn phần, dịch phân giải tế bào toàn phần, tế bào được đồng nhất hóa, vật liệu tế bào được thủy phân một phần, và/hoặc vật liệu tế bào được tinh chế một phần (nghĩa là, dầu được tạo ra nhờ vi khuẩn). Thuật ngữ "sinh

khối đã qua xử lý" được dùng để chỉ sinh khối đã trải qua quá trình xử lý bổ sung như làm khô, tiệt trùng, phân rã, v.v., mỗi dạng trong số chúng được thảo luận chi tiết hơn dưới đây.

Thuật ngữ "lipit" được dùng để chỉ các phân tử chất béo tan (nghĩa là, ưa chất béo) có trong tự nhiên bất kỳ. Tổng quan về lipit được nêu trong công bố đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ số 2009-0093543-A1. Thuật ngữ "dầu" được dùng để chỉ chất lipit là chất lỏng ở 25°C và thường là không no.

Thuật ngữ "dầu chiết tách" được dùng để chỉ dầu được tách ra vật liệu tế bào, như vi sinh vật trong đó dầu được tổng hợp. Dầu chiết tách thu được nhờ rất nhiều phương pháp khác nhau, trong đó phương pháp đơn giản nhất chỉ liên quan đến phương pháp vật lý. Ví dụ, nghiền cơ học bằng cách sử dụng các cấu hình nén ép khác nhau (nghĩa là, trục vít, ép, piston, máy phá vỡ hạt, v.v.) có thể tách dầu ra khỏi vật liệu tế bào. Theo cách khác, quá trình chiết tách dầu có thể xảy ra bằng cách xử lý bằng các dung môi hữu cơ khác nhau (nghĩa là, hexan), bằng phương pháp chiết có sử dụng enzym, bằng phương pháp sốc thẩm thấu, bằng phương pháp chiết siêu âm, bằng phương pháp chiết chất lỏng siêu tới hạn (nghĩa là, chiết CO_2), bằng phương pháp xà phòng hóa và bằng cách phối hợp các phương pháp này. Sau đó, dầu chiết tách có thể được tinh chế hoặc cô.

"Dầu cá" được dùng để chỉ dầu được tạo ra từ mô của cá chứa dầu. Ví dụ về cá chứa dầu, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: cá mòi dầu, cá trống, cá trích, cá ốt vảy nhỏ, cá thu và cá tương tự. Dầu cá là thành phần thông thường của thức ăn được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản.

"Dầu thực vật" được dùng để chỉ dầu ăn được bất kỳ thu được từ thực vật. Dầu thực vật thông thường được chiết tách từ hạt của thực vật. Thuật ngữ "triaxylglyxerol" ["TAG"] được dùng để chỉ lipit trung tính chứa ba gốc axyl béo được este hóa thành phân tử glyxerol.

TAG có thể chứa PUFA mạch dài và axit béo bão hòa, cũng như axit béo bão hòa và không bão hòa mạch ngắn hơn. "Lipit trung tính" được dùng để chỉ các lipit thường được tìm thấy trong tế bào trong các thể mỡ dưới dạng chất béo dự trữ và được gọi là như vậy do ở độ pH tế bào, lipit không chứa nhóm mang điện. Nói chung, chúng hoàn toàn không phân cực và không có ái lực với nước. Lipit trung tính thường được dùng để chỉ mono-, di-, và/hoặc trieste của glyxerol với axit béo, còn được gọi lần lượt

là monoaxylglyxerol, diaxylglyxerol hoặc triaxylglyxerol, hoặc được gọi chung là axylglyxerol. Phản ứng thủy phân phải xảy ra để giải phóng axit béo tự do ra khỏi axylglyxerol.

Thuật ngữ "axit béo toàn phần" ["TFA"] ở đây được dùng để chỉ tổng của tất cả các axit béo tế bào mà có thể được tạo dẫn xuất thành metyl este của axit béo ["FAME"] bằng phương pháp chuyển este hóa cơ bản (như đã biết trong lĩnh vực này) trong mẫu đã cho, mà có thể là sinh khối hoặc dầu. Do đó, axit béo toàn phần bao gồm các axit béo từ các phân đoạn lipit trung tính (bao gồm diaxylglyxerol, monoaxylglyxerol và TAG) và từ các phân đoạn lipit phân cực (nghĩa là bao gồm, các phân đoạn phosphatidylcholin và phosphatidyletanolamin) nhưng không phải axit béo tự do.

Thuật ngữ "hàm lượng lipit toàn phần" của tế bào là số đo lượng TFA dưới dạng phần trăm của trọng lượng tế bào khô ["DeW"] mặc dù hàm lượng lipit toàn phần có thể gần bằng số đo của FAME dưới dạng phần trăm của DeW ["FAME% DeW"]. Do đó, hàm lượng lipit toàn phần ["TFA% DeW"] bằng số milligam axit béo toàn phần mỗi 100 milligam DeW.

Nồng độ của axit béo trong lipit toàn phần được biểu diễn ở đây dưới dạng phần trăm trọng lượng của TFA (% TFA), nghĩa là, số milligam của axit béo đã cho mỗi 100 milligam TFA. Trừ khi có quy định cụ thể khác trong bản mô tả ở đây, khi nhắc tới phần trăm của axit béo đã cho liên quan đến lipit toàn phần sẽ bằng nồng độ của axit béo dưới dạng% TFA (nghĩa là,% EPA của lipit toàn phần bằng EPA% TFA).

Trong một số trường hợp, có thể có lợi khi biểu hiện hàm lượng của (các) axit béo đã cho trong tế bào dưới dạng phần trăm trọng lượng tế bào khô của nó (% DCW). Do đó, ví dụ, axit eicosapentaenoic% DCW sẽ được xác định theo công thức sau: (axit eicosapentaenoic% TFA) *(TFA% DCW)]/100. Tuy nhiên, hàm lượng của (các) axit béo đã cho trong tế bào dưới dạng phần trăm trọng lượng tế bào khô của nó (% DCW) có thể gần bằng: (axit eicosapentaenoic% TFA) * (FAME% DCW)]/100.

Các thuật ngữ "profil lipit" và "thành phần lipit" có thể thay thế lẫn nhau và được dùng để chỉ lượng của các axit béo riêng rẽ có mặt trong một phân đoạn lipit cụ thể, như trong lipit toàn phần hoặc dầu, trong đó lượng này được biểu hiện dưới dạng phần trăm trọng lượng của TFA. Tổng của mỗi axit béo riêng rẽ có mặt trong hỗn hợp nên bằng 100.

Thuật ngữ "dầu pha trộn" được dùng để chỉ dầu thu được bằng cách trộn lẫn, hoặc pha trộn, dầu chiết tách được mô tả ở đây với hỗn hợp dầu bất kỳ hoặc với dầu riêng rẽ bất kỳ để thu được chế phẩm mong muốn. Do đó, ví dụ, các loại dầu từ các vi khuẩn khác nhau có thể được trộn cùng với nhau để thu được chế phẩm PUFA mong muốn. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, dầu chứa PUFA được bộc lộ ở đây có thể được trộn với dầu cá, dầu thực vật hoặc hỗn hợp của chúng để thu được chế phẩm mong muốn.

Thuật ngữ "axit béo" được dùng để chỉ axit béo mạch dài (axit alkanoic) có chiều dài mạch khác nhau, từ khoảng C12 đến C22, mặc dù cả các axit mạch dài hơn và ngắn hơn là đã biết. Độ dài mạch chiếm ưu thế là nằm trong khoảng từ C16 đến C22 . Cấu trúc của axit béo được thể hiện bằng hệ ký hiệu đơn giản bao gồm "X: Y", trong đó X là tổng số lượng nguyên tử cacbon ["C"] trong axit béo cụ thể và Y là số lượng liên kết đôi. Các chi tiết bổ sung liên quan đến sự khác biệt giữa "axit béo bão hòa" và "axit béo không bão hòa", "axit béo không bão hòa đơn" và "axit béo không bão hòa đa" ["PUFA"], và "axit béo omega-6" ["00-6" hoặc "n-6"] và "axit béo omega-3" ["00-3" hoặc "n-3"] được thể hiện trong bằng sáng chế Mỹ số 7,238,482.

"Bột cá" được dùng để chỉ nguồn protein đối với chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản. Bột cá thường được chế biến từ các chất thải thủy sản thu được từ các bước chế biến cá dành cho người tiêu thụ (nghĩa là, cá hồi, cá ngừ) hoặc được chế biến từ loại cá cụ thể (nghĩa là, cá trích, cá mòi dầu) mà được thu hoạch chỉ với mục đích sản xuất bột cá.

Nghề nuôi trồng thủy sản là nghề thực hành nuôi trồng động vật và thực vật trong môi trường nước. Nghề này liên quan đến việc nuôi sản phẩm thủy sinh (nghĩa là, động vật nước ngọt và nước mặn) trong các điều kiện có kiểm soát. Nghề này liên quan đến việc nuôi trồng và thu hoạch cá, tôm cua, và cây thủy sinh trong nước sạch, nước lợ hoặc nước mặn.

Các sinh vật được nuôi trồng trong nghề nuôi trồng thủy sản có thể bao gồm cá và loài giáp xác. Loài giáp xác, ví dụ, là tôm hùm, cua, tôm, tôm pandan và tôm hùm đất. Nuôi cá là dạng thông thường nhất của nghề nuôi trồng thủy sản.

Nghề này liên quan đến việc nuôi cá thương mại trong bể, ao hoặc thùng nước biển, thông thường để ăn. Một cơ sở thả cá non vào vùng hoang vu để câu cá giải trí hoặc để bổ sung một số loài tự nhiên được gọi chung là trại sản xuất cá giống. Mối

quan tâm đặc biệt là cá của nhóm cá hồi, ví dụ, cá hồi Masu (*Oncorhynchus rnasou*), cá hồi Chinook (*O. tshawytscha*), cá hồi Chum (*O. keta*), cá hồi Coho (*O. kisutch*), cá hồi hồng (*O. gorbuscha*), cá hồi đỏ (*O. nerka*) và cá hồi Đại Tây Dương (*Salmo salar*). Loại cá khác được quan tâm trong nghề nuôi trồng thủy sản bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cá hồi chấm khác, cũng như cá thịt trắng như cá rô phi (bao gồm các loài khác nhau của Oreochromis, Sarotherodon, và Tilapia), cá mú, cá da trơn (order *Siluri-formes*), cá ngừ mắt to (*Thunnus obesus*), cá chép (họ *Cyprinidae*) và cá thu (*Gadus*).

Nghề nuôi trồng thủy sản thường đòi hỏi chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản đã qua chế biến để đáp ứng các yêu cầu về chế độ ăn của động vật nuôi. Nhu cầu về chế độ ăn của các loại thủy sản nuôi trồng khác nhau cũng khác nhau, cũng như nhu cầu về chế độ ăn của một loài cũng khác nhau trong các giai đoạn phát triển khác nhau. Do đó, nghiên cứu rộng rãi đã được thực hiện để tối ưu hóa mỗi chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản đối với mỗi giai đoạn phát triển của sinh vật được nuôi trồng.

Chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản được tạo thành từ các thành phần vi lượng và đa lượng. Nói chung, tất cả các thành phần mà được sử dụng ở nồng độ lớn hơn 1% được gọi là thành phần đa lượng. Các thành phần thức ăn được sử dụng ở nồng độ nhỏ hơn 1% là các thành phần vi lượng. Chúng được trộn sơ bộ để đạt được sự phân bố đồng nhất các thành phần vi lượng trong thức ăn thủy sản hoàn chỉnh. Cả thành phần đa lượng và thành phần vi lượng được chia nhỏ thành các hợp phần có chức năng dinh dưỡng và chức năng kỹ thuật.

Các hợp phần có chức năng kỹ thuật cải thiện chất lượng vật lý của chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản hoặc hình thức bên ngoài của nó.

Các thành phần đa lượng có chức năng dinh dưỡng cung cấp cho động vật thủy sinh protein và năng lượng cần thiết đối với sự phát triển và năng suất. Liên quan đến cá, chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản, lý tưởng là, cung cấp cho cá: 1) chất béo, có tác dụng như là nguồn axit béo tạo ra năng lượng (đặc biệt là cho cơ tim và cơ xương); và 2) axit amin có tác dụng như là các khối protein xây dựng. Chất béo cũng hỗ trợ sự hấp thu vitamin; ví dụ, các vitamin A, D, E và K có tính chất tan trong chất béo hoặc chỉ có thể được tiêu hóa, hấp thu và vận chuyển cùng với chất béo. Carbohydrat, thường có nguồn gốc từ thực vật (nghĩa là, bột mì, bột hạt dướng dương, gluten ngô, bột đậu nành), cũng thường được đưa vào chế phẩm thức ăn, mặc dù carbohydrat không phải là nguồn năng lượng tốt cho cá so với protein hoặc chất béo.

Chất béo thường được cung cấp nhờ việc đưa bột cá (chứa lượng nhỏ dầu cá) và dầu cá vào chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản. Dầu chiết tách có thể được sử dụng trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản bao gồm dầu cá (nghĩa là, từ gan cá mòi dầu, cá trống, cá trích, cá ốt vảy nhỏ và cá thu có chứa dầu), và dầu thực vật (nghĩa là, từ hạt đậu nành, hạt nho, hạt hoa hướng dương và hạt lanh). Thông thường, dầu cá là dầu được ưu tiên, do nó chứa axit béo omega-3 mạch dài không bão hòa đa ["PUFA"], EPA và DHA; ngược lại, dầu thực vật không cung cấp nguồn EPA và/hoặc DHA. Các PUFA là cần thiết cho sự phát triển và sức khỏe của hầu hết các sản phẩm nuôi trồng thủy sản. Một chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản thông thường sẽ chứa dầu với lượng nằm trong khoảng từ 15 đến 30% (nghĩa là, cá, rau, v.v.), được đo dưới dạng phần trăm trọng lượng của chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản.

Lượng của EPA (dưới dạng phần trăm của axit béo toàn phần ["% TFA"]) và DHA% TFA được cung cấp trong các loại dầu cá thông thường sẽ thay đổi, giống như tỷ lệ của EPA so với DHA. Các giá trị trung bình được tổng hợp trong Bảng 2, dựa trên công trình nghiên cứu của Turchini, Torstensen và Ng (Reviews in Aquaculture 1:10-57 (2009)):

Bảng 2. Hàm lượng EPA và DHA thông thường trong các loại dầu cá khác nhau

Dầu cá	EPA	DHA	Tỷ lệ PA:DHA
Dầu cá trống	17%	8,8%	1,93 : 1
Dầu cá ốt vảy nhỏ	4,6%	3,0%	1,53 : 1
Dầu cá mòi dầu	11%	9,1%	1,21 : 1
Dầu cá trích	8,4%	4,9%	1,71 : 1

Protein được cung cấp trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản có thể có nguồn gốc thực vật hoặc động vật. Ví dụ, protein có nguồn gốc động vật có thể là từ động vật biển (nghĩa là, bột cá, dầu cá, protein cá, bột của loài nhuyễn thể, bột của con trai, vỏ tôm, bột mực ống, dầu mực ống, v.v.) hoặc động vật trên mặt đất (nghĩa là, bột huyết, bột trứng, bột gan, bột thịt, thịt và bột xương, con tằm, bột nhộng, bột váng sữa, v.v.). Protein có nguồn gốc từ thực vật có thể bao gồm bột đậu nành, gluten ngô, gluten lúa mì, bột hạt bông, bột canola, bột hạt hướng dương, gạo và chất tương tự.

Các chức năng kỹ thuật của hợp phần đa lượng có thể chồng chéo, ví dụ, như gluten lúa mì có thể được sử dụng làm chất hỗ trợ tạo hạt và đối với hàm lượng protein của nó lại có giá trị dinh dưỡng tương đối cao. Có thể kể đến gôm guar và bột mì.

Các hợp phần vi lượng bao gồm các chất phụ gia thức ăn như vitamin, khoáng chất vết, chất kháng sinh dùng trong thức ăn chăn nuôi. Các chất khoáng được sử dụng ở mức nhỏ hơn 100mg/kg (100ppm) được coi là vi khoáng hoặc khoáng vết.

Các hợp phần vi lượng có chức năng dinh dưỡng đều là các chất sinh học và khoáng vết. Chúng liên quan đến các quá trình sinh học và cần thiết để đảm bào sức khỏe tốt và năng suất cao. Các hợp phần vi lượng có thể được đề cập đến là vitamin như vitamin A, E, K3, D3, Bl, B3, B6, B12, C, biotin, axit folic, axit pantothenic, axit nicotinic, cholin clorua, inositol và axit para-amino-benzoic. Có thể kể đến các chất khoáng như muối của canxi, coban, đồng, sắt, magie, phospho, kali, selen và kẽm. Các hợp phần khác có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất chống oxy hóa, beta-glucan, muối mật, cholesterol, enzym, mono natri glutamat, carotenoit, v.v..

Các chức năng kỹ thuật của các thành phần vi lượng chủ yếu liên quan đến việc tạo hạt, giải độc, chống mốc, chống oxy hóa, v.v..

Trong nghề nuôi trồng thủy sản, thông thường cá được cho ăn theo các chu kỳ ăn khác nhau khi chúng phát triển. Ví dụ, cá hồi Đại Tây Dương có thể được cho ăn theo 6 chu kỳ ăn khác nhau trong lúc phát triển từ 100g đến 4kg như được thể hiện trong Bảng 1 nêu trên. Trọng lượng của cá trong các chu kỳ ăn khác nhau có thể thay đổi phụ thuộc vào loại cá và/hoặc thực tiễn nuôi trồng thủy sản được áp dụng.

Theo khía cạnh thứ hai, chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản có thể chứa lượng tổng cộng của EPA và DHA có nguồn gốc từ nguồn vi khuẩn duy nhất ít nhất chiếm khoảng 0,8%, được đo dưới dạng phần trăm trọng lượng của chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản. Lượng này (nghĩa là, 0,8%) thường là nồng độ tối thiểu thích hợp để hỗ trợ sự phát triển của nhiều động vật trong nghề nuôi trồng thủy sản, và cụ thể là thích hợp để đưa vào chế độ ăn của cá hồi.

Như đã thảo luận trước đây, tỷ lệ EPA:DHA cao nhất trong dầu cá (nghĩa là, dầu cá trống) bằng 1,93:1 (Turchini, Torstensen và Ng, nêu trên) và tỷ lệ EPA:DHA thấp nhất trong dầu cá bằng 1,21:1. Do đó, tin rằng không có chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản có bán sẵn trên thị trường được sản xuất có tỷ lệ EPA:DHA cao hơn 1,93:1 hoặc nhỏ hơn 1,21:1.

Để đạt được tỷ lệ EPA:DHA lớn hơn 2:1 hoặc nhỏ hơn 1,2:1, như được mô tả ở đây, nguồn thay thế của EPA và DHA là cần thiết.

Theo một ví dụ, chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản theo sáng chế chứa một nguồn DHA và EPA, trong đó tỷ lệ của EPA:DHA là lớn hơn 2:1 dựa trên các nồng độ riêng rẽ của EPA và DHA, mỗi nồng độ được đo dưới dạng phần trăm trọng lượng của axit béo toàn phần trong nguồn vi khuẩn hoặc trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản.

Theo một ví dụ khác, chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản theo sáng chế chứa một nguồn DHA và EPA, trong đó tỷ lệ của EPA:DHA nhỏ hơn 1:1, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,2:1 đến 1:1 dựa trên nồng độ riêng rẽ của EPA và DHA, mỗi nồng độ được đo dưới dạng phần trăm trọng lượng của axit béo toàn phần trong nguồn vi khuẩn hoặc trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản.

Hầu hết các quá trình sản xuất chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản theo sáng chế sẽ bắt đầu bằng bước lên men vi khuẩn, trong đó vi sinh vật cụ thể được nuôi cấy trong các điều kiện cho phép phát triển và sinh ra dầu vi khuẩn chứa EPA và DHA. Ở thời điểm thích hợp, các tế bào vi khuẩn được thu hồi từ bình lên men. Sinh khối vi khuẩn có thể được xử lý một cách cơ học bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau, như loại nước, làm khô, phân rã cơ học, ép viên, v.v.. Sau đó, sinh khối (hoặc dầu chiết tách từ đó) được sử dụng dưới dạng thành phần trong thức ăn nuôi trồng thủy sản (tốt hơn là làm chất thay thế cho ít nhất một phần dầu cá được sử dụng trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản chuẩn). Sau đó, động vật thủy sinh được cho ăn thức ăn nuôi trồng thủy sản trong một phần của vòng đời của chúng, sao cho EPA và DHA từ thức ăn nuôi trồng thủy sản tích tụ trong động vật thủy sinh. Bằng cách đó, khi thu hoạch, sản phẩm thịt thủy sản nuôi thu được sẽ chứa EPA và DHA với tỷ lệ lớn hơn hoặc bằng 2:1 hoặc bằng hoặc nhỏ hơn 1:1. Mỗi khía cạnh trong số các khía cạnh này sẽ được thảo luận chi tiết hơn dưới đây.

Dầu vi khuẩn chứa EPA và DHA theo sáng chế có thể được cung cấp ở nhiều dạng khác nhau để sử dụng trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản ở đây, trong đó dầu thường có mặt trong sinh khối vi khuẩn hoặc sinh khối đã qua xử lý, hoặc dầu được tinh chế một phần hoặc dầu tinh khiết. Trong hầu hết các trường hợp, sẽ có hiệu quả nhất khi đưa sinh khối vi khuẩn hoặc sinh khối đã qua xử lý vào chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản, trái ngược với dầu vi khuẩn (ở dạng được tinh chế một phần hoặc

dạng tinh khiết); tuy nhiên, các lợi ích kinh tế này không được cho là giới hạn ở đây.

Vi khuẩn theo sáng chế là tảo, nấm hoặc nấm men. Vi khuẩn được ưu tiên là Thraustochytrid là vi sinh vật của bộ Thraustochytriales. Thraustochytrid bao gồm các thành viên của chi *Schizochytrium* và *Thraustochytrium* và đã được nhận biết là nguồn thay thế của axit béo omega-3, bao gồm DHA và EPA. Xem bằng sáng chế Mỹ số 5,130,242.

Theo phương án được ưu tiên, vi sinh vật là chủng đột biến của loài *Schizochytrium.* Chủng *Schizochytrium* là nguồn tự nhiên của PUFA như DHA và có thể được tối ưu hóa bằng cách gây đột biến để được sử dụng dưới dạng nguồn vi khuẩn theo sáng chế.

Chủng *Schizochytrium* sản sinh ra DHA và EPA có thể thu được bằng cách gây đột biến liên tiếp, sau đó bằng cách lựa chọn chủng đột biến thích hợp có mức sản sinh EPA và DHA tốt hơn và tỷ lệ EPA:DHA tốt hơn. Các chủng kiểu dại ban đầu bao gồm các chủng khi lưu giữ cùng với các tập hợp giống nuôi cấy khác nhau trên khắp thế giới, nghĩa là ATCC và Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). Thông thường, cần thực hiện hai hoặc nhiều chu kỳ đột biến liên tiếp để thu được các chủng đột biến mong muốn.

Tác nhân hóa học bất kỳ hoặc tác nhân không hóa học bất kỳ (nghĩa là chiếu xạ cực tím (UV: ultraviolet) có khả năng làm biến đổi di truyền ở tế bào nấm men có thể được sử dụng làm tác nhân gây đột biến. Các tác nhân này có thể được sử dụng một mình hoặc phối hợp với một tác nhân khác, và các tác nhân hóa học có thể được sử dụng ở dạng tinh khiết hoặc cùng với dung môi.

Ví dụ, một chủng có thể được đột biến và lựa chọn sao cho nó tạo ra EPA và DHA với lượng khả thi về mặt thương mại và có tỷ lệ EPA:DHA lớn hơn hoặc bằng 2:1 và có thể có tỷ lệ ít nhất bằng khoảng 2,2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1,4:1,4,5:1, 5:1,5,5:1, 6:1, 6,5:1,7:1, 7,5:1,8:1,8,5:1,9:1, 9,5:1, hoặc 10:1 hoặc cao hơn. Theo cách khác, chủng này có thể được đột biến và lựa chọn sao cho nó tạo ra EPA và DHA với lượng khả thi về mặt thương mại và có tỷ lệ EPA:DHA bằng hoặc nhỏ hơn 1:1 và có thể có tỷ lệ bằng khoảng 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, 0,5:1, 0,4:1, 0,3:1, 0:2:1 hoặc thấp hơn.

Theo cách khác, nguồn vi khuẩn theo sáng chế có thể được tạo ra bởi các vi khuẩn chuyển gen để tạo ra PUFA. Tùy ý, vi sinh vật có thể được thao tác di truyền để tạo ra DHA và EPA bằng cách biểu hiện các gen dị thể thích hợp mã hóa, ví dụ,

desaturaza và elongaza của con đường delta-6 desaturaza/delta-6 elongaza hoặc con đường delta-9 elongaza/delta-8 desaturaza ở sinh vật chủ.

Gen dị thể trong các caset biểu hiện thường được hợp nhất vào hệ gen của tế bào chủ. Gen cụ thể có mặt trong caset biểu hiện cụ thể phụ thuộc vào sinh vật chủ, profil PUFA của nó và/hoặc profil desaturaza/elongazacua nó, khả năng của cơ chất và (các) sản phẩm cuối cùng mong muốn. Hệ PUFA polyketit synthaza ("PKS"tạo ra EPA như được tìm thấy, ví dụ, trong *Shewanella putrefaciens* (patent Mỹ số 6,140,486), *Shewanella olleyana* (patent Mỹ số 7,217,856), *Shewanella japonica* (patent Mỹ số 7,217,856) và *Vibrio marinus* (patent Mỹ số 6,140,486), cũng có thể được đưa vào vi khuẩn sản sinh DHA thích hợp để cho phép tạo ra EPA và DHA. Các sinh vật chủ có hệ PKS khác tự nhiên tạo ra DHA có thể được thao tác di truyền để cho phép tạo ra chế phẩm thích hợp chứa PUFA để tạo ra tỷ lệ EPA:DHA lớn hơn 2:1 hoặc nhỏ hơn 1:1.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ về các cân nhắc và kỹ thuật cần thiết để đưa một hoặc nhiều caset biểu hiện mã hóa các enzym thích hợp để sinh tổng hợp EPA và DHA vào vi khuẩn chủ đã chọn, và nhiều phương pháp đã được đề xuất trong tài liệu chuyên ngành cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Dầu vi khuẩn chứa EPA và DHA từ các sinh vật đã được thao tác di truyền này cũng có thể thích hợp để sử dụng trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản ở đây, trong đó dầu này có thể có mặt trong sinh khối vi khuẩn hoặc sinh khối đã qua xử lý, hoặc dầu này có thể là dầu được tinh chế một phần hoặc dầu tinh khiết.

Các loài vi sinh vật thông thường có thể được sử dụng theo sáng chế này được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, hoặc PTA-10211, PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vi sinh vật được phân lập có các đặc tính của loài được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10212 hoặc chủng được tạo ra từ đó. Các đặc tính của loài được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10212 có thể bao gồm các tính chất sinh trưởng và phenotypic của chúng (ví dụ về các tính chất phenotyp bao gồm các tính chất về hình thái và sinh sản), các tính chất vật lý và hóa học của chúng (như trọng lượng khô và profil lipit), trình tự gen của chúng, và các tổ hợp của chúng, trong đó các đặc tính phân biệt các loài đã được xác định trước đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vi sinh vật phân lập có các đặc tính của

loài được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10212, trong đó các đặc tính bao gồm rARN 18s chứa trình tự polynucleotit SEQ ID NO1 hoặc trình tự polynucleotit có độ đồng nhất ít nhất bằng 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự SEQ ID NO1, đặc tính hình thái và sinh sản của các loài được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10212, và profil axit béo của các loài được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10212.

Theo các phương án khác, chủng đột biến là chủng được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10213, PTA-10214, hoặc PTA-10215. Vi sinh vật đi kèm với số đăng ký ATCC PTA-10213, PTA-10214, và PTA-10215 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest ngày 14 tháng 7 năm 2009 ở Trung tâm lưu ký của Bảo tàng giống chuẩn Mỹ, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 201 10-2209.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vi sinh vật phân lập của loài được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10208. Vi sinh vật được phân lập đi kèm với số đăng ký ATCC PTA-10208 ở đây còn được biết đến là *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-10208. Vi sinh vật đi kèm với số đăng ký ATCC PTA-10208 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest ngày 14 tháng 7 năm 2009 ở Trung tâm lưu ký của Bảo tàng giống chuẩn Mỹ, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chủng đột biến của vi sinh vật được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10208. Theo các phương án khác, chủng đột biến là chủng được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10209, PTA-10210, hoặc PTA-10211. Vi sinh vật đi kèm với số đăng ký ATCC. PTA-10209, PTA-10210, và PTA-10211 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest ngày 25 tháng 9 năm 2009 Trung tâm lưu ký của Bảo tàng giống chuẩn Mỹ, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

Vi khuẩn theo sáng chế có thể được nuôi cấy và phát triển trong môi trường lên men trong các điều kiện bằng cách đó PUFA được tạo ra bởi vi sinh vật. Thông thường, vi sinh vật được nuôi dưỡng bằng nguồn cacbon và nitơ, cùng với một số hóa chất hoặc chất khác cho phép phát triển vi sinh vật và/hoặc tạo ra EPA và DHA. Các điều kiện lên men sẽ phụ thuộc vào vi sinh vật được sử dụng và có thể được tối ưu hóa để cho tạo ra PUFA mong muốn với hàm lượng cao trong sinh khối tạo ra.

Nói chung, các điều kiện môi trường có thể được tối ưu hóa bằng cách thay đổi loại và lượng của nguồn cacbon, loại và lượng của nguồn nitơ, tỷ lệ cacbon/nitơ, lượng

của các ion khoáng khác nhau, hàm lượng oxy, nhiệt độ sinh trưởng, độ pH, độ dài của pha tạo ra sinh khối, độ dài của pha tích tụ dầu và thời gian và phương pháp thu hoạch tế bào.

Khi đạt được lượng cần thiết của EPA và DHA tạo ra bởi (các) vi sinh vật, môi trường lên men có thể được xử lý để thu được sinh khối vi khuẩn chứa (các) PUFA. Ví dụ, môi trường lên men có thể được lọc hoặc được xử lý theo cách khác để loại bỏ ít nhất một phần thành phần nước. Môi trường lên men và/hoặc sinh khối vi khuẩn có thể được xử lý tiếp, ví dụ sinh khối vi khuẩn có thể được tiệt trùng hoặc xử lý bằng các phương pháp khác để làm giảm hoạt tính của các enzym vi khuẩn nội sinh mà có thể làm hại dầu vi khuẩn và/hoặc PUFA. Sinh khối vi khuẩn có thể được làm khô (nghĩa là, tới hàm lượng nước cần thiết) hoặc bằng phương pháp phân rã cơ học (nghĩa là, bằng phương pháp vật lý như máy nghiền hạt, máy ép đùn trục vít, v.v., để tạo ra khả năng xâm nhập lớn hơn vào thành phần tế bào), hoặc phối hợp của các phương pháp này. Sinh khối vi khuẩn có thể được tạo hạt hoặc hóa hạt để dễ xử lý. Do đó, sinh khối vi khuẩn thu được từ phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên có thể được sử dụng làm nguồn dầu vi khuẩn chứa EPA và DHA. Sau đó, nguồn dầu vi khuẩn này có thể được sử dụng làm thành phần trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản.

Trong ví dụ đầu tiên của sáng chế, sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản chứa EPA và DHA với tỷ lệ lớn hơn hoặc bằng 2:1, dựa trên nồng độ của mỗi EPA và DHA trong sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản, được tạo ra theo cách ổn định. Tỷ lệ của nồng độ EPA/DHA có thể lớn hơn hoặc bằng 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1,2,9:1, 3:1, 3,5:1, 4:1,4,5:1,5:1, 5,5:1, 6:1, 6,5:1, 7:1,7,5:1, 8:1, 8,5:1, 9:1, 9,5:1, hoặc 10:1 hoặc cao hơn.

Theo ví dụ thứ hai của sáng chế, sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản chứa EPA và DHA theo tỷ lệ bằng hoặc nhỏ hơn 1:1, dựa trên nồng độ của mỗi EPA và DHA trong sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản, được tạo ra một cách ổn định. Tỷ lệ của nồng độ EPA/DHA bằng hoặc nhỏ hơn 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, 0,5:1, 0,4:1, 0,3:1, 0:2:1 hoặc thấp hơn.

Một ví dụ được ưu tiên về dầu vi khuẩn theo sáng chế là dầu từ *Schizochytrium* chứa:

- ít nhất 40% (trọng lượng) DHA và EPA, tốt hơn là khoảng 50% (trọng lượng) DHA và EPA,
- tỷ lệ EPA:DHA bằng nằm trong khoảng từ 0,2:1 đến 1:1, tốt hơn là từ 0,4:1 đến 0,8:1, và
- ít nhất một chất oxy hóa được thêm vào để tạo ra độ ổn định.

Dầu vi khuẩn như được mô tả và thu được từ phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên có thể được sử dụng dưới dạng nguồn duy nhất chứa EPA và DHA để sử dụng trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản mà được cung cấp cho động vật nuôi trồng thủy sản để tạo ra sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản có tỷ lệ EPA:DHA lớn hơn hoặc bằng 2:1 hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1:1.

Sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản thu được bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế có thể chứa thêm tổng lượng EPA và DHA ít nhất bằng khoảng 0,5% dưới dạng phần trăm trọng lượng của sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản. Lượng này là lượng thường có mặt trong sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản.

Tổng lượng EPA và DHA ít nhất bằng khoảng 0,5% dưới dạng phần trăm trọng lượng của sản phẩm thịt nuôi trồng thủy sản có thể nhận được bằng cách cho động vật nuôi trồng thủy sản ăn chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản có tổng lượng EPA và DHA thường ít nhất bằng khoảng 1,6% chế phẩm thức ăn nuôi trông thủy sản, tính theo trọng lượng.

Dựa trên bản mô tả này, rõ ràng là các chất thay thế có thể có hiệu lực thay cho dầu cá có thể được sử dụng, như một cách để tạo ra một cách ổn định chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản cho các chu kỳ ăn của cá.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Được mô tả chung bởi sáng chế này, có thể hiểu thêm rõ hơn bằng cách tham khảo các ví dụ được cung cấp ở đây. Những ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1

Các đặc tính phát triển của vi sinh vật được phân lập được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10212

Vi sinh vật được phân lập được lưu giữ với số đăng ký theo ATCC là PTA-10212 được kiểm tra các đặc tính phát triển theo các chu trình lên men riêng rẽ, như

được mô tả dưới đây. Các điều kiện môi trường và nuôi cấy thông thường được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3: Môi trường của bình nuôi cấy PTA-10212

Thành phần	Nồng độ	Khoảng
Na_2SO_4	31,0g/l	0-50, 15-45, hoặc 25-35
NaCl	0,625g/l	0-25, 0,1-10, hoặc 0,5-5
KCl	1,0g/l	0-5, 0,25-3, hoặc 0,5-2
$MgSO_4*7H_2O$	5,0g/l	0-10, 2-8, hoặc 3-6
$(NH_4)_2SO_4$	0,44g/l	0-10, 0,25-5, hoặc 0,05-3
$MSG*1H_2O$	6,0g/l	0-10, 4-8, 01-5-7
$CaCl_2$	0,29g/l	0,1-5, 0,15-3, hoặc 0,2-1
T 154 (dịch chiết nấm men)	6,0g/l	0-20, 0,1-10, hoặc 1-7
KH_2PO_4	0,8g/l	0,1-10, 0,5-5, hoặc 0,6-1,8
Sau khi hấp (Kim loại)		
Axit xitric	3,5mg/l	0,1-5000, 10-3000, hoặc 3-2500
$FeSO_4*7H_2O$	10,30mg/l	0,1-100, 1-50, hoặc 5-25
$MnCl_2*4H_2O$	3,10mg/l	0,1-100, 1-50, hoặc 2-25
$ZnSO_4*7H_2O$	3,10mg/l	0,01-100, 1-50, hoặc 2-25
$CoCl_2*6H_2O$	0,04mg/l	0-1, 0,001-0,1, hoặc 0,01-0,1
$Na_2MoO_4*2H_2O$	0,04mg/l	0,001-1, 0,005-0,5, hoặc 0,01-0,1
$CuSO_4*5H_2O$	2,07mg/l	0,1-100, 0,5-50, hoặc 1 -25
$NiSO_4*6H_2O$	2,07mg/l	0,1-100, 0,5-50, hoặc 1-25
Sau khi hấp (Vitamin)		
Thiamin	9,75mg/l	0,1-100, 1-50, hoặc 5-25
Vitamin B12	0,16mg/l	0,01-100, 0,05-5, hoặc 0,1-1
Ca[1/2]-pantothenat	2,06mg/l	0,1-100, 0,1-50, hoặc 1-10
Biotin	3,21mg/l	0,1- 100, 0,1-50, hoặc 1-10
Sau khi hấp (Cacbon)		
Glyxerol	30,0g/l	5-150, 10-100, hoặc 20-50
Cấp nitơ:		
$MSG*1H_2O$	17g/l	0-150, 10-100, hoặc 15-50

Các điều kiện canh tác thông thường bao gồm các điều kiện sau:

Độ pH	6,5 - 9,5, khoảng 6,5 - 8,0, hoặc khoảng 6,8 - 7,8;
Nhiệt độ	15 - 30°C, khoảng 18 - 28°C hoặc khoảng 21-23°C;
Oxy hòa tan	độ bão hòa 0,1 - khoảng 100%, độ bão hòa khoảng 5 - 50%, hoặc độ bão hòa khoảng 10 - 30%; và/hoặc
Lượng glyxerol được kiểm soát @	5 - khoảng 50g/l, khoảng 10 - khoảng 40g/l, hoặc khoảng 15 - khoảng 35g/l.

Trong môi trường nuôi cấy được cung cấp cacbon (glyxerol) và nitơ với CI l000ppm ở 22,5°C với 20% oxy hòa tan ở độ pH=7,3, PTA-10212 tạo ra trọng lượng tế bào khô bằng 26,2g/l sau 138 giờ nuôi cấy thể tích lên men 10l. Hiệu suất lipit bằng 7,9g/l; hiệu suất omega-3 bằng 5,3g/l; hiệu suất EPA bằng 3,3g/l và hiệu suất DHA bằng 1,8g/l. Hàm lượng axit béo bằng 30,3%, tính theo trọng lượng; hàm lượng EPA bằng 41,4% của metyl este của axit béo (FAME); và hàm lượng DHA bằng 26,2% của FAME. Sản lượng lipit bằng l,38g/l/ngày, và sản lượng omega-3 bằng 0,92g/l/ngày trong các điều kiện này, sản lượng EPA bằng 0,57g/l/ngày và sản lượng DHA bằng 0,3 lg/l/ngày.

Trong môi trường nuôi cấy được cung cấp cacbon (glyxerol) và nitơ với CI l000ppm ở 22,5°C với 20% oxy hòa tan ở độ pH=7,3, PTA-10212 tạo ra trọng lượng tế bào khô bằng 38,4g/l sau 189 giờ nuôi cấy trong thế tích lên men 10l. Hiệu suất lipit bằng 18g/l; hiệu suất omega-3 bằng 12g/l; hiệu suất EPA bằng 5g/l và hiệu suất DHA bằng 6,8g/l. Hàm lượng axit béo bằng 45%, tính theo trọng lượng; hàm lượng EPA bằng 27,8% của FAME; và hàm lượng DHA bằng 37,9% của FAME. Sản lượng lipit bằng 2,3g/l/ngày, và sản lượng omega-3 bằng 1,5g/l/ngày trong các điều kiện này, sản lượng EPA bằng 0,63g/l/ngày và sản lượng DHA bằng 0,86g/l/ngày.

Trong môi trường nuôi cấy được cung cấp cacbon (glyxerol) và nitơ với CI l000ppm ở 22,5°C với 20% oxy hòa tan ở độ pH=6,8-7,7, PTA-10212 tạo ra trọng lượng tế bào khô bằng 13g/l sau 189 giờ nuôi cấy trong thể tích lên men 10l. Hiệu suất lipit bằng 5,6g/l; hiệu suất omega-3 bằng 3,5g/l; hiệu suất EPA bằng 1,55g/l và hiệu suất DHA bằng 1,9g/l. Hàm lượng axit béo bằng 38%, tính theo trọng lượng; hàm lượng EPA bằng 29,5% của FAME; và hàm lượng DHA bằng 36% của FAME. Sản lượng lipit bằng 0,67g/l/ngày, và sản lượng omega-3 bằng 0,4g/l/ngày trong các điều

kiện này, sản lượng EPA bằng 0,20g/l/ngày và sản lượng DHA bằng 0,24g/l/ngày.

Trong môi trường nuôi cấy được cung cấp cacbon (glyxerol) và CI 1000ppm ở 22,5-28,5°C với 20% oxy hòa tan ở độ pH=6,6-7,2, PTA-10212 tạo ra trọng lượng tế bào khô bằng 36,7g/l - 48,7g/l sau 191 giờ nuôi cấy trong thể tích lên men 10l. Hiệu suất lipit bằng 15,2g/l - 25,3g/l; hiệu suất omega-3 bằng 9,3g/l - 13,8g/l; hiệu suất EPA bằng 2,5g/l - 3,3g/l và hiệu suất DHA bằng 5,8g/l - 11 g/l. Hàm lượng axit béo bằng 42,4% - 53%, tính theo trọng lượng; hàm lượng EPA bằng 9,8% - 22% của FAME; và hàm lượng DHA bằng 38,1% - 43,6% của FAME. Sản lượng lipit bằng l,9g/l/ngày - 3,2g/l/ngày, và sản lượng omega-3 bằng l,2g/l/ngày - 1,7g/l/ngày trong các điều kiện này, với sản lượng EPA bằng 0,3 lg/l/ngày - 0,41g/l/ngày và sản lượng DHA bằng 0,72g/l/ngày - l,4g/l/ngày.

Ví dụ 2

Độ tiêu hóa biểu kiến của DHA và EPA dưới dạng sinh khối vi khuẩn ở cá hồi Đại tây dương

Cá hồi Đại Tây Dương có thể trọng ban đầu khoảng 200g được chia ngẫu nhiên vào các bể chứa l,5m với số lượng 50 cá mỗi bể. Nhiệt độ nước bằng khoảng 10°C. Cá được làm cho thích nghi với chế độ ăn đối chứng trong 2 tuần trước khi bắt đầu được cho ăn theo chế độ thử nghiệm theo sáng chế.

Thức ăn có kích thước 3mm được tạo ra bằng cách ép đùn ở Nofima, Bergen theo công thức được mô tả trong bảng 4. Chỉ có dầu hạt nho được thêm vào chế độ ăn và mức DHA và EPA cơ bản trong thức ăn đối chứng có nguồn gốc từ bột cá được đưa vào chế độ ăn ở mức khoảng 23%. Dầu cá không được thêm vào chế độ ăn này.

Nguồn vi khuẩn chứa DHA và EPA sinh khối của các loài *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-10208 còn được gọi là OvegaGold™ được sử dụng. Các thể bao sinh khối là 0; 0,9; 3,5 và 6,2% chế độ ăn tương ứng với mức DHA bằng 0; 0,5; 1,0; 1,5%.

Cá được cho ăn ít nhất 4 tuần và mỗi chế độ ăn được thực hiện ba lần. Sau 4 tuần cho ăn thử nghiệm, phân được thu hồi bằng cách tách mỗi con cá ra khỏi mỗi bể chứa riêng rẽ. Mẫu cơ được lấy ra khỏi 5 con cá mỗi bể chứa.

Hệ số tiêu hóa biểu kiến được xác định đối với axit béo omega-3 và đối với các chất dinh dưỡng như chất khô, lipit và protein.

Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình Statbox Pro (ANOVA một chiều).

Bảng 4: Công thức thức ăn

Thành phần chính của thức ăn (%)	Đối chứng	OvegaGold cung cấp 0,5%	OvegaGold cung cấp 1,0%	OvegaGold cung cấp 1,5%
		DHA	DHA	DHA
Bột cá	23	22	22,4	22
Phần cô protein đậu nành	17	17	17	17
Dầu hạt nho	22	21	20	19
Bột lúa mì	11,4	10,9	8,7	7,4
Gluten ngô	5	5	5	5
Gluten lúa mì	13	13	13	13
Phần cô protein đậu Hà Lan	2	2	2	2
OvegaGold	0	2,5	5,2	8,0

Các kết quả về sự tái sinh của DHA và EPA trong thức ăn chăn nuôi được thể hiện trong Bảng 5. Các kết quả này cho thấy sự khôi phục rất tốt của DHA và EPA sau quá trình xử lý thức ăn chăn nuôi bằng cách ép đùn và có đáp ứng liều lượng rõ rệt.

Bảng 5: Mức khôi phục trong thức ăn chăn nuôi

Chế độ ăn		Mức thu hồi (mg/g)		
	EPA	DHA	EPA + DHA	Tổng Ω-3
Đối chứng	2,21	4,32	6,53	25,81
OvegaGold cung cấp 0,5% DHA	4,31	9,61	13,92	34,26
Từ việc bổ sung	2,1	5,3	6,4	
OvegaGold cung cấp 1,0% DHA	5,57	12,80	18,37	37,38
Từ việc bổ sung	3,4	8,5	11,9	
OvegaGold cung cấp 1,5% DHA	7,52	17,64	25,16	43,38
Từ việc bổ sung	5,3	13,3	18,6	

Hệ số tiêu hóa biểu kiến được xác định đối với DHA, EPA, DHA + EPA và axit béo omega-3. Các Fig.1, 2 và 3 lần lượt thể hiện khả năng tiêu hóa của DHA+ EPA,

EPA và DHA. Các kết quả này cho thấy rằng EPA và DHA được cung cấp nhờ nguồn tảo có thể được tiêu hóa mạnh.

Bảng 6: Hệ số tiêu hóa biểu kiến dưới dạng giá trị trung bình + Sd

Chế độ ăn	ADC (%)							
	EPA	±SD	DHA	±SD	EPA+DHA	±SD	Tổng Ω-3	±SD
Đối chứng	97,35	0,05	94,18	0,23	95,25	0,17	98,36	0,07
OvegaGold 0,5%DHA	98,50	0,06	96,96	0,06	97,40	0,06	98,65	0,02
OvegaGold 1,0%DHA	98,72	0,16	97,52	0,14	97,88	0,14	98,69	0,11
OvegaGold 1,5%DHA	99,05	0,05	98,19	0,14	98,44	0,11	98,90	0,08

Kết luận là, DHA và EPA có độ sinh khả dụng cao khi được cung cấp dưới dạng sinh khối vi tảo có bổ sung cho chế độ ăn của cá hồi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất ổn định sản phẩm thịt trong nuôi trồng thủy sản bao gồm bước cho cá ăn chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản trong các chu kỳ ăn của chúng, trong đó:

một phần hoặc toàn bộ dầu cá trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản được thay thế bằng nguồn vi sinh vật duy nhất mang axit eicosapentaenoic (Eicosapentaenoic acid - EPA) và axit docosahexaenoic (Docosahexaenoic acid - DHA) , trong đó:

nguồn vi sinh vật này là dầu vi sinh vật được cung cấp ở dạng được chọn từ nhóm gồm dầu tinh chế và dầu tinh chế một phần, loại bất kỳ trong số chúng thu được từ nguồn vi sinh vật, trong đó:

chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản bao gồm tổng lượng EPA và DHA chiếm ít nhất khoảng 0,8%, được đo bằng phần trăm trọng lượng của chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản, và trong đó:

EPA và DHA có mặt với tỷ lệ nồng độ của EPA so với nồng độ của DHA nhỏ hơn hoặc bằng 1:1, tính theo các nồng độ đơn lẻ của EPA và DHA trong nguồn vi sinh vật hoặc trong chế phẩm thức ăn nuôi trồng thủy sản.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật mà từ đó thu được nguồn vi sinh vật là tảo, nấm hoặc nấm men.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó vi sinh vật này là thành viên thuộc giống *Schizochytrium* hoặc *Thraustochytrium.*

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó vi sinh vật này có đặc tính của các loài được nộp lưu với số truy cập ATCC là PTA-10208 hoặc PTA-10209 hoặc PTA-10210 hoặc PTA-10211 hoặc PTA-10212 hoặc PTA-10213 hoặc PTA-10214 hoặc PTA-10215.

5. Phương pháp theo điểm 3, trong đó vi sinh vật này là chủng đột biến của *Schizochytrium.*

6. Phương pháp theo điểm 2, trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn chuyển gen bằng kỹ

thuật di truyền để sản xuất dầu vi sinh vật chứa axit béo đa bất bão hòa bao gồm EPA và DHA.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sản phẩm thịt trong nuôi trồng thủy sản có tỷ lệ nồng độ EPA so với nồng độ DHA nhỏ hơn hoặc bằng 1:1 tính theo nồng độ của mỗi thành phần này trong sản phẩm thịt trong nuôi trồng thủy sản.

8. Thức ăn nuôi trồng thủy sản bao gồm:

nguồn vi sinh vật duy nhất mang axit eicosapentaenoic (EPA) và axit docosahexaenoic (DHA), trong đó nguồn vi sinh vật này là dầu vi sinh vật được cung cấp ở dạng được chọn từ nhóm gồm dầu tinh chế và dầu tinh chế một phần, loại bất kỳ trong số chúng thu được từ nguồn vi sinh vật, và trong đó:

EPA và DHA có mặt trong thức ăn với lượng ít nhất khoảng 0,8%, đo được bằng phần trăm trọng lượng của thức ăn, và với tỷ lệ nồng độ của EPA so với nồng độ của DHA nhỏ hơn hoặc bằng 1:1, tính theo các nồng độ đơn lẻ của EPA và DHA trong nguồn vi sinh vật hoặc thức ăn.

9. Thức ăn nuôi trồng thủy sản theo điểm 8, trong đó vi sinh vật mà từ đó thu được nguồn vi sinh vật là tảo, nấm hoặc nấm men.

10. Thức ăn nuôi trồng thủy sản theo điểm 9, trong đó vi sinh vật này là thành viên thuộc giống *Schizochytrium* hoặc *Thraustochytrium.*

11. Thức ăn nuôi trồng thủy sản theo điểm 10, trong đó vi sinh vật này có đặc tính của các loài được nộp lưu với số truy cập ATCC là PTA-10208 hoặc PTA-10209 hoặc PTA-10210 hoặc PTA-10211 hoặc PTA-10212 hoặc PTA-10213 hoặc PTA-10214 hoặc PTA-10215.

12. Thức ăn nuôi trồng thủy sản theo điểm 10, trong đó vi sinh vật này là chủng đột biến của *Schizochytrium.*

Fig. 1

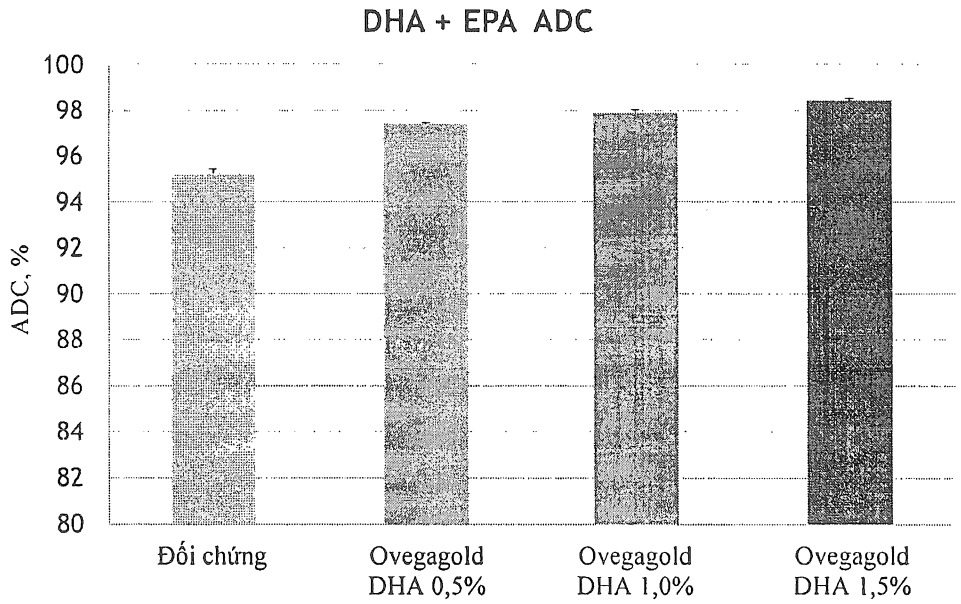

DHA + EPA ADC
ADC, %
100
98
96
94
92
90
88
86
84
82
80
Đối chứng
Ovegagold DHA 0,5%
Ovegagold DHA 1,0%
Ovegagold DHA 1,5%

Fig. 2

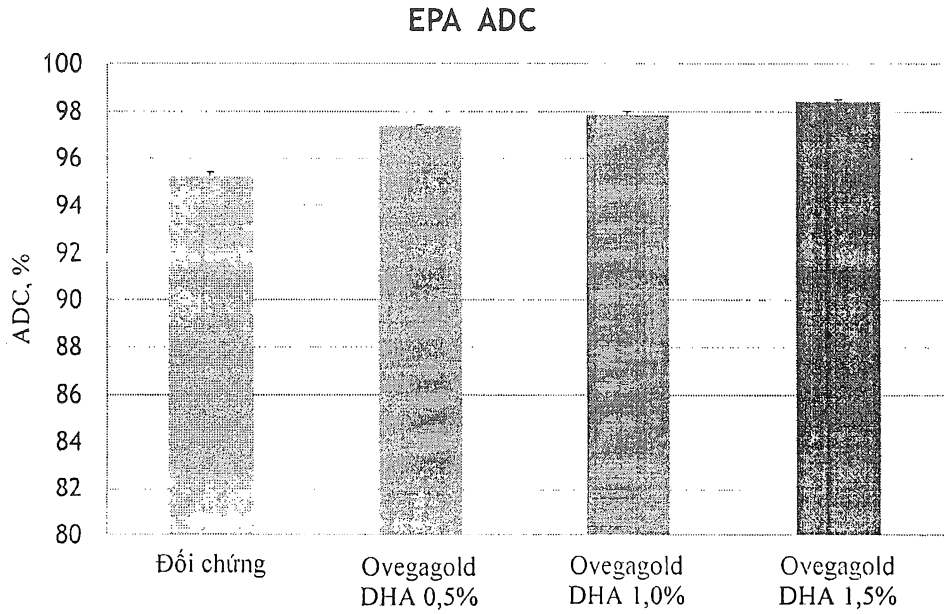

EPA ADC
ADC, %
100
98
96
94
92
90
88
86
84
82
80
Đối chứng
Ovegagold DHA 0,5%
Ovegagold DHA 1,0%
Ovegagold DHA 1,5%

Fig. 3

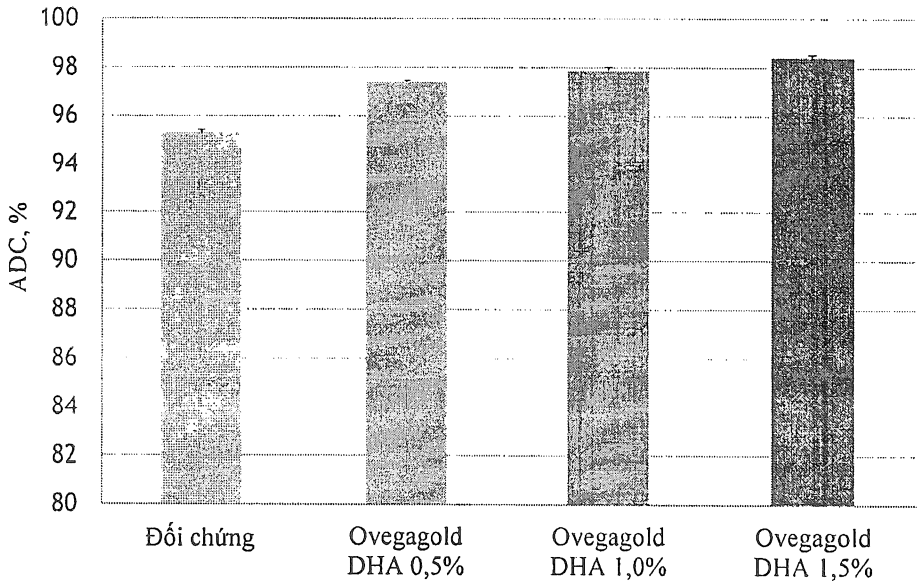
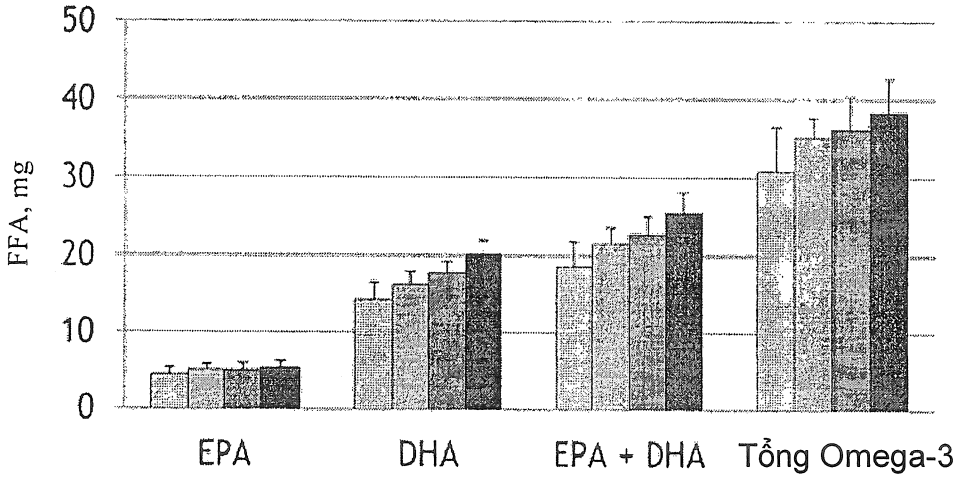

100
98
96
94
92
90
88
86
84
82
80
ADC, %
Đối chứng
Ovegagold DHA 0,5%
Ovegagold DHA 1,0%
Ovegagold DHA 1,5%

Fig. 4


50
40
30
20
10
0
FFA, mg
EPA
DHA
EPA + DHA
Tổng Omega-3