



(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)



1-0049581

(51)^{2020.01} A23L 17/30; A23B 4/027

(13) B

(21) 1-2021-02566

(22) 20/11/2019

(86) PCT/DE2019/100993 20/11/2019

(87) WO2020/125848 25/06/2020

(30) 102018132386.7 17/12/2018 DE; 62/780,356 17/12/2018 US; 18212833.0
17/12/2018 EP

(45) 25/08/2025 449

(43) 27/09/2021 402A

(73) Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum Für Polar- Und Meeresforschung (DE)
Am Handelshafen 12, Bremerhaven, 27570, Germany

(72) Angela KÖHLER-GÜNTHER (DE).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT TRÚNG CÁ MUỐI HOẶC SẢN PHẨM TƯƠNG TỰ
TRÚNG CÁ MUỐI TỪ TRÚNG SỐNG, TRÚNG TRƯỞNG THÀNH, TRÚNG
RỤNG TỪ CÁ HOẶC ĐỘNG VẬT GIÁP XÁC VÀ TRÚNG CÁ MUỐI THU
ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY

(21) 1-2021-02566

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất trứng cá muối từ cá tầm sống và các sản phẩm tương tự trứng cá muối từ cá sống hoặc động vật giáp xác sống đặc biệt bền vững và cũng có hiệu quả cao về mặt kinh tế. Trong các giải pháp kỹ thuật đã biết trước đây, trứng sống, trưởng thành được xử lý với cation canxi, nhờ đó tạo ra lớp màng trứng rắn chắc về mặt cấu trúc. Trong quy trình theo sáng chế, trứng sống, trưởng thành, mà trong trường hợp cá và động vật giáp xác có ba hoặc nhiều lớp trong màng trứng, được tiếp xúc trong bước tiếp xúc với kali trong dung dịch nước đã khử ion và các cation kali, nhờ đó nồng độ cation kali và nhiệt độ nước không có ảnh hưởng gây hại làm hỏng trứng sống. Trứng hình thành lớp ổn định (SS) mới trong màng trứng bằng cách khử cực điện bất giữ. Lớp này có tính đàn hồi và mang lại cho trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối cấu trúc và trạng thái mới để sử dụng thêm. Các cation kali là phụ gia kỹ thuật được sử dụng không có trong sản phẩm cuối cùng. Có thể xử lý bổ sung với các cation canxi. Các sản phẩm có thể được sản xuất theo sáng chế có thời hạn sử dụng đặc biệt dài và thậm chí có thể được cấp đông mà không bị giảm chất lượng.

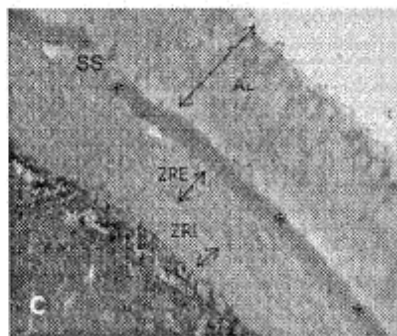


Fig.7C

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối từ trứng sống, trưởng thành của cá hoặc động vật giáp xác, trứng sống, trưởng thành này ở trạng thái có thể thụ tinh nhưng chưa được thụ tinh và có hàm lượng kali tự nhiên trong tế bào chất của trứng, bằng cách xử lý trứng sống, trưởng thành trong dung dịch nước muối mà dung dịch này không làm hư hại trứng và sau đó là trong ít nhất một dung dịch chứa nước và ít nhất một thành phần cation được hoà tan trong đó mà làm ổn định màng trứng của trứng sống, trưởng thành, và tạo ra trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trứng chưa được thụ tinh, đã được xử lý, đặc biệt là từ cá, được coi như một món ăn ngon và được tiêu thụ ngày càng nhiều. Thuật ngữ "trứng" được sử dụng để mô tả trứng (trong các thuật ngữ ngắn thông dụng) ở giai đoạn phát triển bất kỳ, tức là từ khi còn non đến khi trưởng thành, trong đó mức độ phát triển của trứng không được xác định rõ ràng. "Trứng trần" là chỉ trứng sống, trưởng thành do cá, tôm hùm hoặc động vật thủy sinh cái khác đẻ vào trong nước để được thụ tinh. Trứng rụng là trứng sống trưởng thành có thể thụ tinh mà được giải phóng từ vỏ kén trong buồng trứng và được giải phóng vào khoang cơ thể. Từ đó, chúng được đẻ ra hoặc được tách ra. Trứng cá muối có thể được sản xuất chỉ từ trứng của cá cái của các loại cá tầm khác nhau theo Tiêu chuẩn thực phẩm Codex do Tổ chức Nông lương Thế giới đặt ra (FAO Codex Alimentarius). Bên cạnh các loài cá tầm tự nhiên, các loài cá tầm được nuôi trong các cơ sở nuôi trồng thủy sản nước ngọt hiện cũng được sử dụng để sản xuất trứng cá muối. Trứng cá tầm chỉ xuất hiện trong nước ngọt trừ một số ít trường hợp ngoại lệ. Các loại cá tầm đã được biết đến rộng rãi (*Acipenseridae*) bao gồm *A. baerii*, *A. guldenstaedtii*, *Huso* (cũng được biết đến là cá tầm Beluga), *A. transmontanus*, *A. ruthenus* và loài bị bạch tạng của nó. Tuy nhiên, các loài lai giữa *A. schrenckii* (cá cái) và *A. dauricus* (cá đực) và cá tầm thìa Mỹ (American "Paddlefish") (*Polydon spatula*) có liên quan gần gũi với các loài cá tầm cũng được kể ra.

Các loại trứng cá muối khác nhau đã được biết đến trên thị trường, như Sevruga, Osietra và Beluga. Trứng cá muối màu trắng (cũng được biết đến là "trứng cá muối vàng") thu được từ cá tầm bạch tạng. Các loài *A. ruthenus* bạch tạng đôi khi được sử dụng trong các cơ sở nuôi trồng thủy sản để sản xuất loại trứng cá muối được gọi là "trứng cá muối Tsar". Tuy nhiên, đây không phải là "trứng cá muối Tsar thật" mà có nguồn gốc từ loài bạch tạng của *Huso huso* và rất hiếm.

Hiện tại, các sản phẩm tương tự trứng cá muối được sản xuất từ khoảng 38 loại cá khác nữa không thuộc loài cá tầm được sản xuất và lưu hành trên thị trường, ví dụ, xem tài liệu do P Bronzi và đồng sự công bố: "Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview" (Journal of Applied Ichthyology 2014, 30 SI, 6, 1536-1546). Các loài cá này bao gồm cá ngừ, cá vây tròn, cá hồi, cá hồi vân, cá trích, cá tuyết, cá chép, cá thịt trắng và cá trổng, trứng chưa trưởng thành của các loài cá này được sử dụng để sản xuất các sản phẩm tương tự trứng cá muối (cũng được biết đến là 'các loại thay thế trứng cá muối' hoặc 'trứng cá muối giả'). Trứng từ tôm hùm, tôm càng lớn và các loài giáp xác khác cũng có thể được chế biến thành các sản phẩm tương tự trứng cá muối. Phương pháp được yêu cầu bảo hộ theo sáng chế và các sản phẩm có thể được sản xuất đề cập đến các loài cá và giáp xác này (cũng như các loài cá và giáp xác thích hợp khác nhưng không được đề cập đến). Trừ khi trứng cá muối từ cá tầm được đề cập rõ ràng, trứng cá muối cũng như các sản phẩm tương tự trứng cá muối từ các loại cá khác ngoài cá tầm và từ động vật giáp xác, cụ thể là tôm hùm và tôm càng, thường có ý nghĩa và bao gồm các loại sau đây.

Trứng cá muối và các sản phẩm tương tự trứng cá muối là các loại thực phẩm có giá trị. Trứng cá muối giàu protein với hàm lượng cao các axit amin thiết yếu và chất béo. Trứng cá muối chứa các vitamin D, E, B₁₂ và niacin, các khoáng chất natri, kali, magie và canxi cũng như các nguyên tố vi lượng gồm phospho, flo, iot và kẽm. Hơn nữa, trứng cá muối có hàm lượng cao cholesterol tốt (HDL). Trứng cá muối và các sản phẩm tương tự trứng cá muối có thể được sử dụng cả làm thực phẩm và chất trong công nghiệp mỹ phẩm hoặc trong các ngành công nghiệp khác mà nó đóng vai trò là các chất giá trị. Kích thước và độ cứng của trứng phụ thuộc cao vào loài cá hoặc giáp xác cũng như độ trưởng thành và thời gian thu hoạch trứng.

Hiện có một số sản phẩm trứng cá muối trên thị trường được làm từ trứng trưởng thành rụng từ cá tầm. Tuy nhiên, ngày nay, trứng cá muối, vốn là trứng chưa trưởng thành

được lấy cùng với buồng trứng từ các loài cá tầm đã bị giết, vẫn được cung cấp chủ yếu. Đây là phương pháp khai thác trứng cá muối thông thường. Trong trường hợp trứng cá muối từ các loài cá tầm nuôi, ban đầu người ta cũng cho rằng ở đây - như trường hợp trứng cá muối tự nhiên trước đây - trứng chưa trưởng thành có đủ độ bền mà không cần xử lý thêm các bước rửa xâm lấn để loại bỏ phần còn lại của mô tuyến sinh dục và để đóng gói lại. Tuy nhiên, kinh nghiệm thu được trong 20 năm qua trong quá trình khai thác trứng cá muối từ cá tầm nuôi đã chỉ ra rằng trứng chưa trưởng thành từ cá tầm nuôi đã chết quá mềm và chỉ có thể được chế biến thêm bằng cách sử dụng hàn the hoặc các chất bảo quản khác hoặc thanh trùng thành một sản phẩm thích hợp để đóng gói lại và giữ lâu hơn 2 đến 3 tháng.

Việc giết chết các cá cái để lấy trứng cá muối từ đánh bắt tự nhiên, kết hợp với việc đánh bắt quá mức, ô nhiễm nước thải công nghiệp, nông nghiệp và nước thải sinh hoạt đối với nguồn nước và việc xây dựng các đập nước và đập tràn đã ngăn các tuyến đường di cư đến các bãi đẻ nước ngọt, đã dẫn đến mối đe dọa lớn đối với quần thể tự nhiên của khoảng 27 loài cá tầm khác nhau. Ở nhiều khu vực, nạn săn trộm và buôn bán cá bất hợp pháp vẫn diễn ra phổ biến bất chấp sự bảo vệ các loài cá tầm theo Công ước Washington về Buôn bán quốc tế các loài động, thực vật hoang dã nguy cấp (Washington Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES)). Các chương trình phục hồi tổn kém chi phí đã được khởi xướng trên toàn thế giới, tuy nhiên, theo báo cáo của Hiệp hội bảo tồn cá tầm Thế giới (World Sturgeon Conservation Society), rất tiếc là các chương trình này đang thể hiện ít thành công trên hết là ở Trung Quốc và còn ở Iran và Nga. Chỉ có các biện pháp bảo tồn và phục hồi các nguồn giống ở Hoa Kỳ và Canada thể hiện thành công bước đầu. Ngoài việc đánh bắt hợp pháp các động vật đang sinh sản, các loài cá tầm khác nhau từ việc nuôi trồng thủy sản cũng được thả vào tự nhiên với nhiều mức độ thành công khác nhau như một phần của các chương trình bảo tồn nhằm cứu các nguồn giống đang bị đe dọa tuyệt chủng. Các quần thể tôm càng và tôm càng quý hiếm cũng bị đe dọa nghiêm trọng do ô nhiễm môi trường và các bệnh du nhập như nấm trên tôm càng. Tiến bộ quyết định trong nuôi tôm càng xanh trong nuôi trồng thủy sản và các biện pháp nuôi vỗ quảng canh đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn các nguồn giống bản địa. Trong nuôi trồng thủy sản, các động vật cái được giữ sống để sinh sản và trứng được lấy bằng cách vắt lấy trứng. Tuy nhiên, trong sản xuất trứng cá muối từ nguồn nuôi, các loài cá tầm cái thường bị

giết chế theo cách thông thường vì các phương pháp nhẹ nhàng hơn không được quán triệt thực hiện. Cách làm này hoàn toàn không quan tâm quan đến thực tế là chúng thể hiện năng suất sinh sản tăng lên đáng kể khi độ tuổi tăng. "Phương pháp rạch mổ lấy trứng", cũng được thực hiện một phần ở Nga, hoàn toàn không phải là một trong những phương pháp nhẹ nhàng, vì phương pháp này có liên quan đến tỷ lệ tử vong cao của các loài cá tầm được xử lý theo cách này.

Từ RU 2 232 523 C2, phương pháp sản xuất trứng cá muối dạng hạt từ trứng cá tầm rụng từ buồng trứng đã được biết đến. Trứng rụng thu hoạch được đầu tiên được xử lý trong dung dịch nước nóng chứa từ 1,5 phần trăm đến 2 phần trăm chất bảo quản để chuẩn bị cho bước thanh trùng sau đó ở nhiệt độ từ 65°C đến 70°C. Ngoài thực tế là mỗi quy trình nhiệt đều có ảnh hưởng đáng kể đến hương vị của trứng, việc sử dụng trứng rụng, có màng trứng rất mềm và dính, không đảm bảo rằng chúng sẽ chịu đựng được và các bước xử lý tiếp theo bằng chất bảo quản mà không bị vỡ. Tuy nhiên, ngay cả một phần nhỏ trứng vỡ cũng có thể làm giảm chất lượng của trứng cá muối, vì trứng vỡ rất khó loại bỏ. Quá trình thanh trùng dẫn đến sự biến tính của các protein có giá trị và tạo cho trứng cá muối có hương vị béo ngậy.

Liên quan đến việc khai thác trứng rụng từ cá tầm, ví dụ, từ công trình do M. Szczepkowski và đồng sự công bố: "A simple method for collecting sturgeon eggs using a catheter" (Arch. Pole. Fich. (2011) 19:123-128), việc sử dụng ống thông cho mục đích này đã được biết đến. Kết quả là, trứng có thể dễ dàng được lấy ra hoặc hút ra nhờ chân không. Một phương pháp đơn giản cũng đã được biết đến là xoa bóp nhẹ nhàng để trứng đi ra khỏi khoang bụng của cá tầm. Phương pháp này được gọi là "vắt trứng" và là phương pháp thu hoạch nhẹ nhàng nhất.

Giải pháp kỹ thuật gần nhất với sáng chế được bộc lộ trong WO 2007/045233 A1. Được mô tả trong tài liệu này là phương pháp sản xuất trứng cá muối hoặc các sản phẩm tương tự trứng cá muối từ trứng chín rụng nhưng chưa được thụ tinh của động vật thủy sinh, tốt nhất là cá, bằng phương pháp xử lý trứng chín ngoài cơ thể trong dung dịch, trong đó phương pháp này đem lại sự thay đổi hình thái, nội sinh của màng trứng tế bào, mà màng tế bào phân tách tế bào trứng (tế bào chất của trứng cùng với màng bao quanh) khỏi môi trường cùng với sự ổn định cấu trúc của trứng. Dung dịch được sử dụng chứa nước và ít nhất một thành phần cation (cation canxi Ca^{++}) mà được hoà tan trong nước ở nồng độ định trước và dẫn đến sự ổn định cấu trúc khi tiếp xúc với trứng. Canxi

là nguyên tử dẫn truyền tín hiệu tế bào mà gây ra sóng canxi trong tế bào trứng trong tế bào chất của trứng, mà sau đó dẫn đến phản ứng vỏ não và tiết ra và hoạt hoá ovoperoxidaza. Enzym này đảm bảo việc liên kết ngang trong cấu trúc không thể đảo ngược của các sợi protein trong tạo vỏ ngoại bào nhờ sự kết hợp của các phân tử tyrosin vào lớp tế bào vành bên trong (zona radiata interna) và lớp tế bào vành bên ngoài (zona radiata externa). Quá trình cảm ứng trong trứng sống có sự trao đổi chất dẫn đến sự ổn định cấu trúc mong muốn của màng trứng. Sự ổn định như thế không thể được tạo ra trong trứng chưa trưởng thành vì các thụ thể và tầng enzym tương ứng chưa trưởng thành. Trong trường hợp trứng chết, quy trình này hoàn toàn không thể được khởi tạo, vì sự chuyển hoá không còn diễn ra nữa. Trứng sống, trưởng thành ngay lập tức tạo ra lớp nhón dính do dịch buồng trứng khi chúng tiếp xúc với nước sao cho chúng có thể dính vào đá và cây trong khu vực đẻ trứng. Do đó, trứng được rửa trong dung dịch nước muối không sống ("sinh lý") trước khi xử lý để loại bỏ dịch buồng trứng. Hơn nữa, trứng sống, trưởng thành có hàm lượng kali tự nhiên trong tế bào chất của trứng. Ví dụ, liều không độc hại của kali (ví dụ, để kích hoạt sự rụng trứng) được bổ sung vào chúng từ bên ngoài trước khi thu hoạch.

Chuỗi phản ứng được mô tả được đề cập trong tài liệu như là "phản ứng thứ hai". Đây là phản ứng trao đổi chất chậm mà, sau khi tinh trùng đầu tiên dung nhập vào trứng, tạo ra cấu trúc cơ học vĩnh viễn để bảo vệ trứng chống lại các tinh trùng khác tụ tập bên ngoài trứng (sự thụ tinh nhiều tinh trùng), nhưng trên hết là chống lại các độc tố môi trường, vi khuẩn và tổn hại cơ học đối với phôi mới tạo ra. Trong phương pháp đã biết, phản ứng thứ hai này được khởi tạo mà không cần diễn ra sự thụ tinh bởi tinh trùng. Sự ổn định cấu trúc đạt được tạo nên "hiệu ứng plop" và sự tiết ra mạnh mẽ của tế bào chất lỏng của trứng khi tiêu thụ sản phẩm. Sở thích về độ mạnh cụ thể của hiệu ứng plop phụ thuộc nhiều vào việc sử dụng trứng cá muối và người tiêu dùng.

Hơn nữa, EP 2 522 226 B1 đã bộc lộ việc bảo quản trứng chưa trưởng thành của cá nuôi trong hỗn hợp flavonoid và chất chống oxy hoá Taxifolin (Dihydroquercetin) và muối hữu cơ, cụ thể là trong kali xitrat. Tuy nhiên, các nồng độ cao của hỗn hợp được sử dụng dẫn đến sự thay đổi hiển nhiên trong môi trường ion nội bào, điều gây ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình (chết rụng tế bào). Do đó, trứng được xử lý theo cách chết ngay. Các công bố SU 1662469 A1 và RU 2 048 111 C1 cũng thể hiện các phương pháp bảo quản trứng cá tầm trong đó các hợp chất kali được sử dụng ở các nồng độ cao

vô cùng mà sự chết rụng tế bào được kích hoạt ngay trong trứng và chúng chết đi. Điều tương tự cũng áp dụng cho EP 2 868 207 B1 tương ứng với RU 2 232 523 C2 được đề cập ở trên, trong đó xảy ra sự biến tính bổ sung nhờ nhiệt.

Công trình công bố bởi G. E. Bledsoe và đồng sự: "Caviars and Fish Roe products" (các đánh giá quan trọng trong Food Science and Nutrition, Vol. 43, No. 3, May 1, 2003, các trang từ 317 đến 356) bộc lộ việc sử dụng kali nitrat trong bối cảnh ứng dụng nitrat làm chất bảo quản chung cho trứng cua, trứng cá tầm và trứng của các loại cá khác. Tuy nhiên, điều này diễn ra - như thường lệ trong tất cả các quy trình bảo quản - ở nồng độ cao đến mức xảy ra tác dụng gây độc tế bào mà làm phá vỡ đáng kể sự cân bằng thẩm thấu và giết chết ngay trứng đã xử lý. Hơn nữa, chỉ trứng chưa trưởng thành trong giai đoạn phát triển ban đầu mới được bảo quản bởi cá giết mổ, mà một mặt phải được chà xát cơ học ra khỏi tuyến sinh dục, chấp nhận thiệt hại có thể xảy ra, và mặt khác chưa có cấu trúc phát triển đầy đủ trong màng trứng trưởng thành, do đó chúng không thể được sử dụng theo sáng chế.

DE 2 416 685 A bộc lộ phương pháp bảo quản cải tiến màu đỏ khi bảo quản trứng cá hồi hoặc cá hồi bằng cách bổ sung chất phụ gia thực phẩm ở dạng xitrat được phép sử dụng trong thực phẩm. Sau khi hoàn thành phương pháp, chất sau vẫn còn ở mức có thể phát hiện trong sản phẩm cuối cùng và làm thay đổi thành phần của sản phẩm. Các nồng độ cao được sử dụng (từ 5 đến 10 phần trăm trọng lượng) giết chết trứng sống ngay khi tiếp xúc. Chỉ vì trứng chưa trưởng thành được sử dụng có thể được rửa với nước. Như đã được đề cập, trứng trưởng thành sẽ tạo ra lớp gel dính. Việc cấp đông trứng chưa trưởng thành cả trước và sau khi bảo quản luôn dẫn đến các hư hại do cấp đông trên màng trứng và sự mất nước do cấp đông, vì màng trứng chưa phát triển và chưa ổn định không thể bảo vệ được trứng. JP S63 - 36 763 A bộc lộ phương pháp sản xuất natri clorua trong bảo quản trứng cá để giảm vị mặn. Natri clorua cũng được thay thế bằng các hợp chất kali khác. Tuy nhiên, điều này xảy ra lần nữa trong các nồng độ cao như thế là trứng, mà đó là trứng chưa trưởng thành) bị giết chết và không còn khả năng thực hiện công việc trao đổi chất nữa. JP 2001 - 299 285 A bộc lộ phương pháp xử lý trứng cấp đông ở trạng thái chưa trưởng thành để cải thiện cấu trúc. Trứng được rửa ở nhiệt độ 5°C trong thời gian lên đến 24 h và sử dụng các hoá chất chứa kali. Thời gian xử lý kéo dài như thế làm gián đoạn quy trình trao đổi chất. Vì trứng đã được cấp đông mà không bảo vệ chống lại việc cấp đông, trứng chưa

trưởng thành không còn có hoạt tính trao đổi chất và cũng không thể thụ tinh. Do đó, chúng không thể được sử dụng theo sáng chế. Tuy nhiên, phương pháp được yêu cầu bảo hộ theo sáng chế không liên quan đến sự bảo quản sau đó và giết chế, khử màu hoặc cấp đông, nhưng với sản phẩm nguyên gốc là trứng cá muối và các sản phẩm tương tự trứng cá muối từ trứng sống trưởng thành chưa được xử lý. Sự bảo quản hoặc cấp đông sau khi xử lý trứng sống là bước bổ sung tùy chọn theo sáng chế. Sự khử màu được miễn trừ hoàn toàn vì nó không cần thiết.

Từ tài liệu công bố của Huang Hui và đồng sự: "Effect of Synthetic Preservatives on Volatile Flavor Compounds in Caviar of Sturgeon" (*Huso dauricus* × *A. schrenckii*) ([J] FOOD SCIENCE, 2015, 36(12): 97-103), đã biết rằng tốt nhất là ngăn chặn sự mất mùi vị trong quá trình lưu trữ lạnh trứng cá muối nhờ bảo quản nhân tạo với các chất bảo quản là kali sorbat (E202, axit sorbic) và ascorbat (vitamin C). Kali sorbat có nồng độ 0,5 trên mỗi mililit không đổi được sử dụng trong các nhóm thử nghiệm khác nhau. Trứng chưa trưởng thành được sử dụng để thu được hương vị đậm đà hơn như là kết quả của việc xử lý bảo quản. Kali sorbat được coi là ức chế sự phát triển của nấm mốc và sự lên men nhưng cũng ảnh hưởng không tối đến mùi vị của sản phẩm.

Công trình công bố bởi L. Dufresne và đồng sự: "Kinetics of actin assembly attending fertilization or artificial activation of sea urchin eggs" (Experimental Cell Research, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 172, No.1, September 1987, pages 32 to 42) đề cập đến việc kích hoạt nhân tạo trứng của nhím biển. Mặc dù sáng chế không đề cập đến việc xử lý trứng nhím biển, vì chúng không thể hiện cấu trúc phù hợp (chỉ có màng trứng có hai lớp), công bố này sẽ được thảo luận ngắn gọn ở đây. Một mặt, trứng nhím biển được sử dụng là được thu được bằng cách tiêm dung dịch KCl 0,5 M với nồng độ kali clorua cực cao vào khoang bụng của nhím biển. Kết quả là, trứng bị ảnh hưởng mạnh ở trạng thái phân cực điện của nó và hàm lượng kali tự nhiên trong tế bào chất của trứng bị thay đổi một cách rõ ràng. Hơn nữa, tất cả trứng nhím biển tiếp xúc với nước trước khi xử lý và tạo ra lớp gel mà sau đó phải được loại bỏ cơ học. Điều này làm thay đổi cơ bản các đặc tính hình thái cũng như sinh lý của màng trứng không bào. Trứng nhím biển không thể được sử dụng theo sáng chế không chỉ vì cấu trúc khác biệt cơ bản của chúng, mà còn vì các can thiệp chuyển hóa lớn với kali clorua trong quá trình thu hoạch chúng. Hơn nữa, nước biển không có canxi không được khử ion, nó chứa hơn 10

g natri, 0,43 g kali và 1,3 g magiê và 20 g clo mỗi lít. Do đó, việc rửa trứng trong nước không có canxi không tương ứng với rửa trong dung dịch nước muối không gây hỏng trứng sống, trưởng thành.

Cấu trúc của màng trứng của cá và động vật giáp xác tuân theo mô hình cơ bản và được mô tả cho phương pháp theo phương pháp lượng được mô tả trong công trình do Siddique và đồng sự công bố: "A review of the structure of sturgeon egg membranes and of the associated terminology", (J. Appl. Ichthyol. (2014), 1–10). Dưới đây là mô tả vắn tắt cách thiết lập phù hợp về mặt khái niệm.

Trong trứng đang trưởng thành (tế bào chất, tế bào trứng) trong buồng trứng của động vật, nang, gồm có các tế bào nang hạt (cũng được biết đến là các tế bào nang, màng nang, biểu mô nang) và các tế bào vỏ (cũng được gọi là vỏ trong và vỏ ngoài), bao quanh trứng để cung cấp cho trứng các chất báo hiệu và chất dinh dưỡng. Giữa các tế bào hạt nang và các tế bào vỏ cũng có lớp nền mỏng (trong khoa học cũng được gọi là màng quanh nang lông, màng, lớp nền). Tế bào chất của trứng (tế bào chất noãn hoàng, olemna, tế bào chất, trứng bên trong) được bao quanh bởi màng trứng (màng tế bào chất, màng sinh chất PM, màng tế bào trứng). Trong khi rụng, trứng được tách ra khỏi các tế bào nang và được giải phóng vào khoang bụng của cá. Trứng rụng chỉ giữ lại màng trứng không bào của nó (trong khoa học còn được biết đến là chất nền ngoại bào hoặc màng ngoại bào), mà được tạo ra trong quá trình trưởng thành của trứng và được tạo cấu trúc từ bên ngoài vào đến bên trong từ:

- Lớp phế nang (Alveolar layer - AL) (trong khoa học cũng được gọi là áo gel, lớp dính, vỏ gel, vỏ gelatin (bên ngoài thứ hai), lớp 3, màng đệm (2)), lớp ngoài cùng của màng trứng không bào
- Lớp tế bào vành bên ngoài (Zona radiata externa - ZRE) (trong khoa học cũng được gọi là vỏ noãn hoàng bên ngoài (lớp tế bào vành = vỏ noãn hoàng), vùng noãn hoàng bên ngoài, màng noãn hoàng bên ngoài, lớp 2, lớp màng đệm 2, vùng thấu quang bên ngoài lat., lớp tế bào vành bên ngoài lat., lớp vỏ 1B, vỏ thứ hai), phần ngoài cùng của vỏ noãn hoàng, nằm trực tiếp dưới lớp phế nang
- Lớp mặt ngoài (Epilayer - EP) (trong khoa học cũng được gọi là lớp mặt ngoài 1, lớp 4, lớp ngoài của màng thứ nhất) phân tách ZRE khỏi ZRA, không có trong tất cả các loại trứng
- Lớp tế bào vành bên trong (Zona radiata interna - ZRI) (trong khoa học cũng

được gọi là vỏ noãn hoàng bên trong, vùng noãn hoàng trong, màng noãn hoàng trong, lớp màng đệm 1, vùng thấu quang bên trong lat., lớp tế bào vành bên lat., lớp vỏ 1A, lớp bên trong của vỏ thứ nhất), phần bên trong của màng noãn hoàng, được nối chặt chẽ với ZRA và

- khoảng hở quanh hoàng thể (trong khoa học cũng được gọi là nền tế bào chất phụ thêm, khoảng hở với các thể nhô vi nhung mao của tế bào chất của trứng), không gian hẹp giữa ZRI và màng trứng, mà tế bào chất của trứng chen một số lượng lớn vi nhung mao (microvilli - MV) vào đó.

Các tế bào trứng rụng sống có thể dễ bị kích thích bằng điện bởi các kênh ion nằm trong màng sinh chất của chúng. Các thay đổi trong tính chất điện của màng sinh chất cấu thành, trong số các thứ khác, điều kiện tiên quyết để kích hoạt trứng và có ảnh hưởng đến màng trứng. Công trình tiên phong trên động vật không xương sống ở biển đã chứng minh các dòng ion của các cation kali qua màng trứng, gây ra sự thay đổi điện thế tạm thời qua màng (điện thế thụ tinh (fertilization potential - FP)). Điện thế này được tạo ra bởi sự kích hoạt của dòng điện hướng vào trong thoáng qua phụ thuộc vào điện thế vào bên trong trứng. Sự khử cực của điện thế màng (RP) đã được chứng minh là kết quả của dòng ion đi qua màng trứng (dòng ion (dòng thụ tinh FC)). Dòng điện này chạy qua các lỗ mở của các kênh ion không đặc hiệu và dẫn điện cao, mà có thể được kích hoạt bởi các tác động cơ học hoặc hóa học hoặc cơ học lên tinh trùng. Các mô hình giả thuyết về vai trò của các kênh ion khác nhau và các ion liên quan cho đến nay cho thấy sự khác biệt cụ thể tùy theo từng loài.

Trong các tế bào trứng, kali đóng vai trò trung tâm trong tự nhiên, so với công trình nghiên cứu do E. Tosti và đồng sự công bố: "Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans" (2004 Human Reproduction Update, vol. 10, no. pp 53-65). Kali K^+ là cation quyết định tiềm năng còn lại của tế bào trứng.

Sự thay đổi nồng độ kali⁺ và tính thẩm thấu của trứng đối với các ion đã được điều chỉnh nhờ sự vận chuyển protein và các kênh ion. Các nồng độ cation kali nội bào tự nhiên là 50 mmol/l trong trứng trưởng thành chưa được thụ tinh của cá tầm A. baerii theo các nghiên cứu ở cơ quan Alfred Wegener Institute. Canxi ngoại bào, mặt khác, không ảnh hưởng đến điện thế nghỉ/điện thế thụ tinh của trứng và cũng không tham gia vào chính khối điện ly nhanh đầu tiên (xem bên dưới). Thành phần ion bên trong tế bào trứng khác với thành phần ion ở môi trường xung quanh. Sự khác biệt này giữa môi trường bên trong và môi trường bên ngoài tế bào phải được duy trì cho hoạt động trao đổi chất và

do đó cho sự sống sót của tế bào. Sự phân bố khác nhau của các điện tích bên trong và bên ngoài tế bào tạo ra gradien điện qua màng ngăn, mà có thể được đo bằng hiệu điện thế (điện thế nghỉ).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Dựa trên giải pháp kỹ thuật gần nhất của sáng chế theo WO 2007/045233 A1, mà cũng được sử dụng để sản xuất trứng cá muối và các sản phẩm tương tự trứng cá muối, vấn đề theo sáng chế là phát triển hơn nữa quy trình được mô tả ở đây trên cơ sở trứng sống, trưởng thành, chưa được thụ tinh của cá hoặc động vật giáp xác theo cách mà sự thay đổi về các tính chất cảm quan đối với cấu trúc, mùi vị, vận chuyển, lưu trữ và cấp đông sâu trứng trưởng thành có thể đạt được. Nhờ đó, tuy nhiên, các ưu điểm được đề cập ở trên của trứng cá muối hoặc các sản phẩm tương tự trứng cá muối có thể sản xuất bằng quy trình hoặc nói cách khác, mà cũng có thể được yêu cầu bảo hộ bởi sáng chế, được duy trì. Giải pháp được đặt ra cho nhiệm vụ này là có được từ điểm yêu cầu bảo hộ chính. Các phương án theo sáng chế có ưu điểm khác nữa được thể hiện trong các điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc và trong các điểm yêu cầu bảo hộ về sản phẩm và được mô tả chi tiết hơn dưới đây gắn liền với sáng chế.

Phương pháp được yêu cầu bảo hộ để sản xuất trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối dựa trên trứng sống, trưởng thành của cá hoặc động vật giáp xác theo sáng chế khác biệt ở chỗ, trong bước tiếp xúc với kali, kali được hoà tan trong nước như là thành phần cation ở nồng độ không làm hư hại trứng sống, trưởng thành và không làm thay đổi hàm lượng kali tự nhiên của chúng, nước được khử ion trước khi bổ sung chất cho kali để tạo ra thành phần cation và ở nhiệt độ mà không gây hại cho trứng sống, trưởng thành, và khác biệt ở chỗ trứng sống, trưởng thành được xử lý trong dung dịch trong thời gian tiếp xúc với kali cho đến khi đạt được sự ổn định đàn hồi của màng trứng mong muốn.

Ở quy trình được yêu cầu bảo hộ theo sáng chế, trứng sống, trưởng thành được sử dụng mà có thể thu được một cách tự nhiên mà không gây hại cho cá hoặc động vật giáp xác. Trứng sống, trưởng thành là có thể thụ tinh, nhưng chưa được thụ tinh. Dịch buồng trứng được loại bỏ bằng cách rửa trước với dung dịch nước muối mà không gây hại cho trứng sống, trưởng thành, sao cho không có lớp gel dính có thể tạo ra trên vỏ ngoài. Ngoài ra, trứng có hàm lượng kali tự nhiên, không bị thay đổi nhân tạo. Chỉ có các nồng

độ của các cation kali có hiệu quả về mặt sinh lý tế bào được sử dụng. Trứng sống, trong cá và động vật giáp xác với màng trứng có nhiều hơn hai lớp, tức là ba hoặc nhiều hơn ba lớp, được hoạt hoá điện. Sản phẩm ban đầu là trứng sống, trưởng thành, có thể thụ tinh, nhưng chưa được thụ tinh với đầy đủ chức năng trao đổi chất, sao cho, ngay cả các nồng độ thấp nhất của cation kali, mà không gây hư hại và không để lại dấu vết trong trứng, cũng có thể kích hoạt các quá trình vận chuyển qua màng trứng và các quá trình trao đổi chất trong tế bào chất của trứng. Trứng cá muối hoặc các sản phẩm tương tự trứng cá muối được sản xuất theo cách này thể hiện cấu trúc mới với độ đàn hồi ổn định có lợi thông qua lớp không bào trong suốt mới (lớp ổn định đàn hồi) trong màng trứng, mà phần nào trở thành hơi mềm hơn ở nhiệt độ phòng mà không làm hạn chế độ ổn định của trứng cá muối. Có thể dễ dàng xác định mức độ ổn định đàn hồi mong muốn bằng cách tự kiểm tra (mức độ đàn hồi của trứng). Mùi vị của trứng là tươi và cay dễ chịu, không bị "tanh". Độ tinh khiết của trứng được sử dụng, ngay cả khi không thêm chất bảo quản như hàn the, vốn đã bị cấm ở nhiều quốc gia, dẫn đến thời hạn sử dụng dài (9 đến 12 tháng) ở nhiệt độ tiêu chuẩn giữa -2°C và -4°C . Trứng được xử lý bằng phương pháp này cũng có thể được cấp đông ban đầu mà không bị giảm chất lượng, dẫn đến những lợi thế to lớn về lưu trữ và vận chuyển, xem bên dưới.

Bằng cách đưa trứng sống, trưởng thành vào tiếp xúc với các cation kali (K^{+}) ở nồng độ sinh lý, tức là không gây hại, theo sáng chế, trứng được thay đổi trong khuôn khổ các sự kiện điện và "phản ứng thứ nhất" được kích hoạt, dẫn đến trong thời gian ngắn nhất (từ vài giây đến vài phút) để gây ra sự loại bỏ chất dính bằng điện khi tiếp xúc với nước và trong thời gian dài hơn xử lý, để tạo ra lớp ổn định đàn hồi mới trong màng trứng. Lớp ổn định mới này tạo độ đàn hồi cho màng trứng, sao cho sáng chế sản xuất ra trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối có chất lượng cao nhất ở giai đoạn này, mà cũng có thể trải qua các bước xử lý tùy chọn, cụ thể là bảo quản và cấp đông sâu (ở -18°C) mà không làm giảm chất lượng.

Quá trình kích hoạt trứng bao gồm và đi qua toàn bộ một loạt các đợt sinh học tế bào. "Phản ứng (chậm) thứ hai" (khởi chậm) với phản ứng vỏ não được sử dụng trong WO 2007/045233 A1 được theo sau bởi sự hoạt hóa enzym phụ thuộc canxi để khuếch đại và cuối cùng là sự thay đổi cấu trúc lớn của màng trứng nhờ các sợi protein liên kết tyrosin không thể đảo ngược trong lớp tế bào vành bên trong và lớp tế bào vành bên ngoài. Trong tự nhiên, phản ứng này chuẩn bị cho lần phân chia tế bào đầu tiên cho sự

phát triển của phôi thai. Ngược lại, "phản ứng (nhạy) thứ hai" (khối nhanh, khối điện, khối điện nhanh) được sử dụng trong các phương án nhất định theo sáng chế với sự khử cực/siêu phân cực tiếp theo và sự ổn định của nó trong thời gian khác nhau tùy thuộc vào các loài động vật ở đầu của tất cả các đợt sinh học tế bào. Cả hai quá trình khác nhau đáng kể về các chất được sử dụng, cụ thể là A) các cation kali để ngăn chặn điện nhanh chóng với sự khử cực của màng trứng và do đó kích hoạt sự hoạt hoá trứng và hình thành vùng mới, bổ sung trong màng trứng (hình thành lớp cấu trúc đàn hồi) và B) cation canxi để ngăn chặn cơ học chậm với sự chuyển đổi hình thái được kiểm soát bằng enzyme trong các lớp hiện có màng trứng (hình thành lớp ổn định cấu trúc).

Tình huống điện là sự khử cực nhanh hoặc thậm chí là sự siêu phân cực trong thời gian cỡ mili giây và được dự kiến để ngăn chặn tinh trùng không dính thêm nữa vào trứng sau khi thụ tinh tự nhiên. Sự siêu phân cực nhanh được tách ra khỏi hiện tượng siêu phân cực ổn định trong vòng tối đa 60 phút sau đó (ở một số loại động vật thủy sinh như tôm hùm, thậm chí lên đến 5 giờ). Mặc dù tinh trùng còn lại trong vùng lân cận của trứng vẫn có thể được gắn vào sau khi khối điện nhanh và vẫn bị mắc kẹt trong áo nảo hoàng của màng trứng (áo mềm), nó không thể xâm nhập qua màng sinh chất của trứng để thực sự thụ tinh, như có thể được thể hiện trên động vật thân mềm. Nếu sự tiếp xúc với cation kali tiếp tục diễn ra theo các phương án về phương pháp nhất định theo sáng chế, sự hình thành khu vực thấu quang (trong suốt, tựa thủy tinh, giống như gel) toàn toàn mới (lớp ổn định đàn hồi) được quan sát trong trứng sống, trưởng thành, có thể thụ tinh, nhưng chưa được thụ tinh, mà chưa được biết đến cho đến nay, là GAG-dương tính (sự xuất hiện tăng của các glucosaminoglycan) và ái toan (có thể nhuộm màu với thuốc nhuộm chẩn đoán eosin có tính axit màu đỏ) để quan sát các bào quan tế bào, protein huyết tương, mô liên kết và các tiền tố của nó), và trong đó tinh trùng sẽ dính vào. Sự hình thành lớp ổn định đàn hồi này trước hết diễn ra trong quá trình siêu phân cực liên tục trong 10 giây và nhiều hơn trong các phân vùng trên màng trứng và, sau khi hoàn tất, được định vị giữa lớp tế bào vành bên ngoài và lớp phôi nang trong trứng sống với thiết kế cấu trúc tương tự với cá và động vật giáp xác (ít nhất có hai lớp trong màng trứng). Nguyên nhân hình thành lớp ổn định đàn hồi mới được thấy trong quá trình khử cực liên tục của màng trứng nhờ cung cấp cation kali ở nồng độ sinh lý theo sáng chế.

Theo pháp luật của các nước thành viên EU về chất bổ sung thực phẩm, chỉ các

chất chứa kali được liệt kê ở đây, chẳng hạn như kali bicarbonat (kali hydro carbonat, KHCO_3) (CAS no. 298-14-6), kali carbonat (K_2CO_3) (CAS no. 584-08-7), kali xitrat (CAS no. 6100-05-6), kali hydroxit (KOH) (CAS no. 1310-58-3), kali clorua (KCl) (CAS no. 7447-40-7), K, kali iodua (KI) (CAS no. 7681-11-0), kali iodat (KIO_3) (CAS no. 7758-05-6), có thể được sử dụng cho mục đích dinh dưỡng. Tương tự, đề xuất đối với Quy định của Nghị viện Châu Âu và của Hội đồng 11/10/2003 (COM (2003) 671 final) cho phép bổ sung các hợp chất này vào thực phẩm. Các hợp chất chứa kali nhất định, chẳng hạn như kali xitrat (E 332), kali lactat (E 326), kali orthophosphat (E 340), cũng có thể được bổ sung vào thực phẩm cho mục đích công nghệ. Phương pháp xử lý trứng sống, trưởng thành của cá hoặc động vật giáp xác với các cation kali ở các nồng độ tương thích với tế bào (nồng độ sinh lý, tức là không gây hại đến trứng) và không tạo ra dư lượng, theo sáng chế, cho phép trứng cá muối hoặc các sản phẩm tương tự trứng cá muối được sản xuất đáp ứng tất cả các yêu cầu về chất lượng quốc gia và quốc tế của các cơ quan chức năng, nhà phân phối và người tiêu dùng. Các nghiên cứu về các nồng độ ion nội bào sử dụng phương pháp quang phổ phát xạ (optical emission spectroscopy - OES) trong tế bào chất của trứng ở Alfred Wegener Institute, trong đó kali được sử dụng như là chất mới để liên tục khử cực của màng trứng ngoài, không thể hiện sự thay đổi về nồng độ trong tế bào chất của trứng sau khi xử lý, ngay cả với các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau. Các cation kali được sử dụng theo các phương án về phương pháp nhất định theo sáng chế do đó rõ ràng áp dụng như một chất hỗ trợ chế biến. Chất hỗ trợ chế biến được sử dụng trong chế biến công nghiệp và sản xuất thực phẩm. Chất hỗ trợ chế biến là phụ gia thực phẩm mà được bổ sung vào để tạo điều kiện thuận lợi cho các quá trình kỹ thuật như cắt và lọc. Tuy nhiên, đối với sản phẩm cuối cùng, các chất hỗ trợ chế biến hoàn toàn không được có mặt hoặc chỉ tồn tại với dư lượng (nhỏ) không thể tránh khỏi. Ngược lại với việc thay đổi phụ gia thực phẩm mà cũng phải được công bố trên bao bì, các chất hỗ trợ chế biến phải không còn tác dụng nào trong sản phẩm cuối cùng, điều này có lợi thế đặc biệt. Việc sử dụng chúng phải là không thể tránh khỏi về mặt kỹ thuật, không hiệu quả về mặt kỹ thuật, không gây hại cho sức khỏe và không mùi và không vị. Vì các chất không còn tồn tại hoặc hoạt động trong thực phẩm đã qua xử lý, việc sử dụng chúng không cần phải dán nhãn. Điều này cũng áp dụng cho dư lượng, sản phẩm phản ứng hoặc các lượng dư.

Sẽ được ưu tiên và có lợi thế nếu ít nhất một muối kali, tốt hơn là muối của axit

xitric (kali xitrat E332) và/hoặc muối của axit hydrocloric (kali clorua E508) và/hoặc muối của axit sorbic (kali sorbat E202) được hoà tan trong nước như là chất cho kali để tạo ra thành phần cation. Chất cho kali có nghĩa là hợp chất có kali, mà sau khi nó hoà tan trong nước sẽ cung cấp các cation kali, trong đó nồng độ của nó được xác định bởi nồng độ của hợp chất chứa kali cụ thể và công thức cấu tạo của nó trong nước. Các muối kali được đề cập thậm chí tất cả đều được chấp thuận là phụ gia thực phẩm với mã số E, mặc dù trong các phương pháp nhất định theo sáng chế, chúng chỉ được sử dụng làm chất hỗ trợ chế biến không còn xuất hiện trong sản phẩm cuối cùng và không phải khai báo. Nồng độ của các cation kali trong dung dịch với nước đã khử ion thuận lợi và được ưu tiên là giữa 0,1 mmol/l và 3,0 mmol/l, tốt hơn là 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 0,65 mmol/l, 1,6 mmol/l hoặc 2,0 mmol/l, tốt hơn nữa là 1,0 mmol/l hoặc 1,5 mmol/l theo phương án của sáng chế. Tất cả các biên và giá trị trung gian (số nguyên và không phải số nguyên) cũng phải luôn được bao gồm trong tất cả các phạm vi (cũng như các tham số khác) được thực hiện trong phạm vi của sáng chế. Để tạo ra các nồng độ kali trong nước như được đề cập, nước phải được khử ion. Tuy nhiên, vì các phân tử nước cũng phân ly liên tục trong nước, nên người ta hiểu rằng chỉ có thể đạt được mức độ khử ion bằng các phương tiện kỹ thuật (độ dẫn điện trong nước là giữa 1 μ S và 15 μ S ở 25°C như là phép đo sự khử ion hoá có thể đạt được).

Hơn nữa, thời gian tiếp xúc với kali trong bước tiếp xúc với kali được ưu tiên là thuận lợi là giữa 5 phút và 30 phút, tốt hơn là ở 10 phút, 12 phút, 15 phút, 20 phút hoặc 25 phút. Thời gian tiếp xúc với kali khác trong phạm vi này cũng có thể lựa chọn dễ dàng. Thời gian tiếp xúc lên đến 50 phút hoặc cao hơn thậm chí xảy ra trong xử lý trứng tôm hùm (giáp xác) trưởng thành. Sự tạo ra lớp ổn định đàn hồi mới, mà bao kín màng trứng, đã bắt đầu chỉ một ít giây (lên đến 10 giây) sau khi bắt đầu xử lý. Tuy nhiên, vì không phải toàn bộ trứng phản ứng ngay với sự khử cực liên tục và tạo ra lớp ổn định trong các phần bề mặt màng trứng, thời gian xử lý kéo dài lên đến 10 phút được khuyến cáo để đạt được sự khử cực trong tất cả trứng được xử lý. Khi thời gian xử lý tăng lên, nó di chuyển và được khoanh vùng giữa lớp tế bào vành bên ngoài và lớp phế nang trong toàn bộ màng trứng bao xung quanh trứng. Kết quả là, trứng sống, trưởng thành được ổn định đàn hồi theo sáng chế theo cách mà chúng có thể được ướp muối, đóng gói lại và cấp đông sâu mà không gặp vấn đề gì.

Như một sửa đổi tùy chọn khác, các phương pháp nhất định về phương pháp

theo sáng chế cũng đề xuất bước tiếp xúc với canxi, có thể được thực hiện sau bước tiếp xúc với kali hoặc trước nó. Các thay đổi tương ứng đối với màng trứng xảy ra độc lập với nhau theo cả hai trình tự trong các đặc điểm được mô tả của chúng. Trong bước tiếp xúc với canxi, được ưu tiên và thuận lợi là canxi được hoà tan trong dung dịch khác với nước làm thành phần cation ở nồng độ không làm hư hại trứng sống, trưởng thành (tức là sinh lý), trong đó nước được khử ion trước khi bổ sung chất cho canxi để tạo ra thành phần cation. Trứng sống, trưởng thành được xử lý trong bước tiếp xúc với canxi cho đến khi đạt được sự ổn định cấu trúc mong muốn của màng trứng. Độ ổn định cấu trúc mong muốn có thể được xác định dễ dàng bằng cách tự thử nghiệm (mức độ hiệu ứng plop của trứng). Trong bước tiếp xúc với canxi, được ưu tiên và thích hợp là ít nhất một muối canxi, tốt hơn là canxi xitrat, canxi clorua và/hoặc canxi sorbat, được sử dụng làm chất cho canxi (chất cung cấp canxi, xem định nghĩa về chất cho kali). Các muối canxi được cho phép sử dụng làm phụ gia thực phẩm với các mã số E333 và E509 mà không bị giới hạn về số lượng. Ở Đức, các hình thức đánh vần "Kalium (kali)" và "Calcium" (không phải Kalzium) được chọn để phân biệt tốt hơn việc sử dụng hai loại ion này.

Canxi có mặt sinh lý trong tế bào trứng và thành phần thiết yếu trong quá trình trao đổi chất ở tế bào. Đã được biết đến từ WO 2007/045233 A1, mà đã được đề cập ở trên, rằng canxi clorua được sử dụng để củng cố cấu trúc màng trứng nhờ các protein liên kết ngang không thể đảo ngược trong quá trình kết hợp các phân tử tyrosin. Bên cạnh độ đàn hồi được cải thiện và có thể điều chỉnh của màng trứng, mà về cơ bản là đạt được theo sáng chế, màng trứng vẫn có thể được làm rắn chắc về mặt cơ học nhờ bước tiếp xúc với canxi. Do đó, có thể đạt được sự kết hợp ổn định, tối ưu cho một số loại trứng cá muối và sản phẩm thay thế trứng cá muối nhất định. Điều này đặc biệt có lợi đối với các loại trứng rất lớn không ổn định (đường kính lớn hơn 3,2 mm, ví dụ, trứng từ cá tầm Beluga hoặc cá tầm trắng) hoặc đối với các loại trứng đặc biệt mềm khi chúng đã trưởng thành (lực tối đa nhỏ hơn hoặc bằng 0,3 N cho đến khi chúng vỡ ra trong phép thử độ cứng, ví dụ, trứng từ cá tầm Sterlet). Việc áp dụng cả hai bước xử lý sẽ cho ra trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng có chất lượng cao đối với những loại trứng có vấn đề (kích thước, độ mềm).

Nồng độ của các cation canxi trong dung dịch khác thuận lợi là giữa 0,1 mmol/l và 3,0 mmol/l, tốt hơn là 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 0,8 mmol/l, 1,0 mmol/l, 1,5 mmol/l, 1,6 mmol/l hoặc 2,0 mmol/l. Thời gian tiếp xúc với canxi tốt hơn là giữa 9 phút và 30

phút, tốt hơn là 10 phút, 12,5 phút, 15 phút, 16 phút, 20 phút hoặc 25 phút. Sự lựa chọn thời gian xử lý cần xem xét thực tế là độ bền của màng trứng tăng tỷ lệ thuận với sự tăng thời gian tiếp xúc với canxi cho đến khi đạt đến giá trị giới hạn. Trong tự nhiên, trứng đã được thụ tinh từ cá đạt được màng trứng cứng mạnh sau khoảng thời gian xấp xỉ 60 phút, không còn phù hợp để tiêu thụ. Quá trình này có thể mất đến 24 giờ đối với tôm hùm.

Tham số quy trình quan trọng theo các phương án nhất định về phương pháp theo sáng chế là nhiệt độ của các dung dịch trong đó trứng trưởng thành được xử lý. Đây được cho là sinh lý, có nghĩa là nó không cản trở quá trình tự nhiên trong trứng sống. Theo các phương án nhất định, nhiệt độ của các dung dịch luôn nằm trong phạm vi nhiệt độ để trứng tự nhiên của cá hoặc động vật giáp xác. Điều này đảm bảo rằng quá trình hoạt hoá màng trứng bằng điện gây ra trong bước tiếp xúc với kali được thực hiện một cách đáng tin cậy với sự khử cực bắt đầu từ điện thế nghỉ. Ở nhiệt độ để trứng phi tự nhiên, ví dụ trong cá hoặc động vật giáp xác từ các vùng cực là cao hơn 15°C, không xảy ra hiện tượng hoạt hoá trứng bằng điện và trứng sống, trưởng thành không thể được ổn định bằng điện hoặc bằng enzym. Chúng trở nên bị sẹo hẹp. Điều tương tự cũng áp dụng đối với trứng cá hoặc động vật giáp xác từ các vùng nhiệt đới và hỗn hợp. Nguyên tắc cơ bản là ở nhiệt độ trên 35°C, sự phân ly của dung dịch dẫn đến giảm nghiêm trọng chất lượng trứng.

Để thích nghi với nhiệt độ của các dung dịch với môi trường sống tự nhiên, sáng chế phân chia rộng rãi các vùng sống của cá và động vật giáp xác, mà trứng của chúng có thể được sử dụng, trong thời kỳ sinh sản tự nhiên thành ba đới khí hậu: đới cực (ở các cực), đới ôn đới (giữa đới cực và đới nhiệt đới), đới nhiệt đới (quanh xích đạo). Sáng chế đề xuất và khai thác một cách thuận lợi thực tế là nhiệt độ của dung dịch này (tiếp xúc với kali) và/hoặc của dung dịch khác (tiếp xúc với canxi) được lấy từ một phạm vi nhiệt độ đới cực từ 1°C đến 15°C, tốt hơn là từ 5°C đến 12°C, đặc biệt tốt ở 10°C, phạm vi nhiệt độ ôn đới từ 10 đến 20°C, tốt hơn là 15°C, đặc biệt tốt ở 12°C, hoặc phạm vi nhiệt độ nhiệt đới giữa 20°C và 29°C, tốt hơn là 27°C, đặc biệt tốt là 21°C. Sáng chế tốt hơn là tránh các nhiệt độ dẫn đến sự thay đổi-thoái hóa, chết tế bào-của trứng, như trường hợp, ví dụ, với phương pháp thanh trùng bằng cách đun nóng đến nhiệt độ trên 40°C. Sáng chế tốt hơn là tránh điều này tại bất kỳ thời điểm nào trong quy trình.

Vì các nồng độ cation được sử dụng trong các phương án nhất định về phương

pháp theo sáng chế kích hoạt các phản ứng sinh lý cụ thể ở động vật với bản chất điện (tiếp xúc với kali) và bản chất trao đổi chất (tiếp xúc với canxi) và do đó ảnh hưởng đến quá trình xử lý dẫn đến sản phẩm cuối cùng ổn định có thể ăn được, luôn phải giả định rằng nước đã khử ion có trong dung dịch để đạt được nồng độ chính xác của các cation hoạt động bằng điện (kali) hoặc chuyển hóa (canxi) (tích điện dương). Do đó, có thể đạt được về mặt kỹ thuật và do đó được ưu tiên và thuận lợi nếu nước đã khử ion ở 25°C có độ dẫn điện giữa 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ và 15 $\mu\text{S}/\text{cm}$, tốt hơn là 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ hoặc thấp hơn, đặc biệt ưu tiên hơn là 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Nước uống và nước giếng, tùy thuộc vào nguồn khu vực, gồm có thành phần rất khác nhau đối với các ion khác nhau, mà thậm chí có thể có tác dụng đối kháng đối với sự trao đổi chất của tế bào trong một số trường hợp nhất định. Khi nhiệt độ là 25°C, độ dẫn điện của nước tinh khiết, ví dụ, là 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, nước đã khử ion là 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$, nước mưa là 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ hoặc nước uống là 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Để có thể thu được các kết quả có thể tái lập, điều quan trọng là phải biết nước đã khử ion về độ dẫn điện của nó.

Vì các tế bào sống ở dạng tế bào trứng trưởng thành có thể hoạt hóa được xử lý với các phương án nhất định về phương pháp theo sáng chế, nên điều quan trọng là, trong số những thứ khác, các dịch dung dịch phải được điều chỉnh cho phù hợp với sự trao đổi chất của các tế bào sao cho các quá trình trao đổi chất diễn ra trong phương pháp này cũng có thể diễn ra. Do đó được ưu tiên và thuận lợi nếu dung dịch này và/hoặc dung dịch khác có độ pH (sinh lý, không gây bất lợi cho cơ thể sống) giữa 6,8 và 8,0, tốt hơn là giữa 7,0 và 7,9, đặc biệt tốt là 7,2 hoặc 7,4 hoặc 7,5. Cụ thể, pH được điều chỉnh trong dung dịch có liên quan đến phản ứng trao đổi chất chậm trong bước tiếp xúc với canxi. Vì các quá trình được xúc tác bởi enzym trong tế bào được điều chỉnh nhiều bởi độ pH, nên độ pH nội bào trong bước tiếp xúc với kali (quá trình điện) cũng được kiểm tra. Tuy nhiên, độ pH trong tế bào chất của trứng được xử lý bằng các chất gốc kali khác nhau ở các nồng độ và thời lượng khác nhau về cơ bản không thay đổi trong độ pH tối ưu giữa 7 và 8 và cho thấy các sự khác biệt riêng biệt được kỳ vọng trong trường hợp cá và động vật giáp xác riêng biệt.

Theo các phương án theo sáng chế, các bước tiếp xúc khác nhau được sử dụng để ổn định màng trứng ngoại sinh của trứng sống, trưởng thành (đàn hồi và cấu trúc tùy chọn). Do đó, trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối đã sẵn sàng cho việc xử lý tiếp theo, như ướp muối và đóng gói. Trong quá trình rụng trứng, trứng rụng sống

và trưởng thành được đẩy ra khỏi các tế bào nang trứng sao cho không còn bám dính mô thừa của mạch máu hoặc tế nang trứng, mà vi khuẩn hoặc nấm có thể sinh sống trên đó. Do đó, trứng rụng thu hoạch được có độ tinh khiết cao và do đó có điều kiện tốt nhất cho thời hạn sử dụng lâu dài. Điều này được đảm bảo một cách đáng tin cậy nếu, sau bước tiếp xúc cuối cùng được thực hiện để bảo quản và tăng cường hương vị, việc ướp muối nhẹ được thực hiện với từ 2,0% đến 3,8%, tốt hơn là 3,5%, natri clorua tương ứng liên quan đến một lượng trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối. Tốt hơn là natri clorua không chứa các chất cho kali và canxi, như được chứa, ví dụ, trong các chất trợ nhỏ giọt, vì điều này ngăn chặn những thay đổi không kiểm soát được trong màng trứng do ướp muối. Trứng cá muối từ trứng cá tầm được ướp muối khô với muối nói chung đơn giản (natri clorua NaCl), việc ướp muối ướt thường được thực hiện khi trứng từ các loại cá khác được chế biến thành các sản phẩm tương tự trứng cá muối như trứng cá hồi và trứng cá hồi vân muối. Việc ướp muối trong khu vực được chỉ định, mà có thể được thực hiện tùy chọn theo sáng chế, là quy trình ướp muối rất nhẹ, cũng được biết đến là "malossol", đây là dấu hiệu rõ ràng của chất lượng cao. Việc thanh trùng hoặc làm nóng đến nhiệt độ 60°C và cao hơn tốt hơn là được loại bỏ hoàn toàn đối với trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối được yêu cầu bảo hộ theo sáng chế, vì điều này là không cần thiết và sẽ chỉ làm tổn hại đến chất lượng của sản phẩm và các đặc tính cảm quan của nó. Kết quả của việc ướp muối malossol, trứng cá muối hoặc các sản phẩm tương tự trứng cá muối được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế có thời hạn sử dụng tối thiểu ít nhất là từ 9 đến 12 tháng nếu được bảo quản ở -2°C. Nó không bị đóng băng trong quá trình này do ướp muối nhẹ.

Sự cải tiến hơn nữa về chất lượng của trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối được sản xuất đạt được từ các phương án nhất định theo sáng chế là nếu, theo phương án cải biến khác, lưu trữ trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối trong hộp thủy tinh kín khí trong vài tháng, tốt hơn là từ một đến ba tháng, được thực hiện một cách ưu tiên và thuận lợi sau khi bảo quản và tăng cường hương vị. Trứng cá muối "chín" qua quá trình lưu trữ và tùy thuộc vào độ chín, độ ngon được tăng cường. Tuy nhiên, sự chín này được nhìn nhận theo nghĩa là sự phát triển thêm về hương vị (như với phô mát, ví dụ) và không liên quan gì đến "mức độ trưởng thành" của trứng trưởng thành được sử dụng theo sáng chế theo nghĩa phát triển sinh học. Ở đây, sự trưởng thành đề cập đến khả năng thụ tinh và do đó dẫn đến trạng thái phát triển của

trứng sống. Khi trứng cá muối chín liên quan đến hương vị, nó được bảo quản trong hộp thủy tinh, mà có đủ không gian cho trứng cá chín, vì nó không được ép (như trong trường hợp đóng gói trong lon có nắp đậy bằng kim loại) và do đó giữ lại các loại dầu có hương vị đậm đà. Vì vậy, trứng cá muối được đóng gói trong bao gói thủy tinh theo các phương án nhất định của sáng chế không bị nhầm lẫn với trứng cá muối được thanh trùng, cũng thường được đóng gói trong bao gói thủy tinh. Hơn nữa, việc lưu trữ trong lọ thủy tinh thân thiện môi trường tránh được mùi vị kim loại thường bị chỉ trích của trứng cá muối thông thường mà được đóng gói trong các thùng chứa bằng kim loại.

Theo phương án cải biên khác về quy trình, tốt hơn và thuận lợi là thực hiện cấp đông trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối nhiệt độ trong phạm vi giữa -20°C đến -15°C , tốt hơn là ở nhiệt độ -18°C , sau khi bảo quản và tăng cường hương vị hoặc lưu trữ và làm chín hương vị. Lý tưởng là trứng cá muối chín về mặt hương vị để dùng cho con người đến độ chín mong muốn của khách hàng và được đông lạnh tươi sau 14 ngày sau khi sản xuất hoặc sau tối đa 3-4 tháng để làm chín. Trứng cá muối được cấp đông trong hộp thủy tinh 500 g trước khi đóng gói lại hoặc sau khi đóng gói lại cho khách hàng cuối cùng trong các hũ thủy tinh 30 g, 50 g, 125 g, 250 g hoặc 500 g (có thể lên đến 1000 g) mà có thể hút chân không. Trứng cá muối thu được từ hoạt động giết mổ thông thường không thể được cấp đông. Mặc dù trứng cá muối đã thanh trùng và làm nóng có thể được cấp đông, chúng thể hiện sự giảm chất lượng mạnh do xử lý nhiệt. Khả năng cấp đông trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối theo sáng chế cho phép tiếp thị trứng cá muối tối ưu mà điều này đáp ứng nhu cầu hiện nay đối với thực phẩm thông thường. Việc tiếp thị cho đến nay đã gặp hạn chế do các nhiệt độ vận chuyển và lưu trữ là từ -2°C đến -4°C , mà cần phải được tuân thủ nghiêm ngặt, vì những điều này không được duy trì bởi hầu hết các nhà cung cấp. Do đó, trứng cá muối thu được thông thường được xử lý hoặc thanh trùng bằng các chất bảo quản có hại, chẳng hạn như hàn the, để bảo quản ít nhất trong khoảng thời gian 12 tháng và lâu hơn. Tuy nhiên, trứng cá muối được sản xuất với các phương án theo sáng chế có thể đơn giản là được cấp đông và do đó được bảo quản và giữ tươi trong một thời gian dài hơn. Các thí nghiệm đã chỉ ra rằng trứng cá muối đã đông từ từ trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ $+4^{\circ}\text{C}$ đến $+7^{\circ}\text{C}$ không bị mất mùi vị hoặc kết cấu.

Theo các phương án nhất định theo sáng chế, trứng được xử lý trong bể dung dịch (dung dịch nước, dung dịch với nước). Trứng được thêm vào và để trong bể dung

dịch cho đến khi - tùy thuộc vào loại trứng được sử dụng-đạt được mức độ ổn định mong muốn (đàn hồi và có thể là cả cấu trúc). Sau đó, chỉ cần lấy trứng ra khỏi bể. Để ngăn chặn sự ổn định hơn nữa không mong muốn một cách đáng tin cậy sau khi bị loại bỏ bởi các cation trong dung dịch dính, theo các phương án nhất định theo sáng chế, tốt nhất và thuận lợi là, theo phương án cải biến tiếp theo về phương pháp, nếu việc loại bỏ các cation được đưa vào tương ứng ra khỏi trứng trưởng thành được thực hiện sau khi đạt được độ ổn định đàn hồi (và tùy chọn cấu trúc) mong muốn, nhúng (nhúng một thời gian ngắn) trứng sống, trưởng thành trong dung dịch nước muối (dung dịch nước muối sinh lý) mà không gây hại chúng. Điều này là để rửa sạch các cation và ngay lập tức chấm dứt các quá trình ổn định mà chúng gây ra. Mức độ ổn định (mong muốn) của màng trứng đạt được cho đến nay được bảo tồn một cách đáng tin cậy ở trạng thái cuối cùng.

Trứng sống, trưởng thành được sử dụng trong các phương án nhất định theo sáng chế là có thể thụ tinh nhưng không được thụ tinh. Chúng thường không được làm ướt bằng nước và có hàm lượng kali tự nhiên trong tế bào chất của trứng. Trứng sống như thế có thể hoặc là được giải phóng từ tuyến sinh dục vào khoang bụng của cá và được thu hoạch từ đó qua lỗ sinh dục. Điều này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách để trứng tự nhiên, bằng cách vắt trứng (xoay bóp khoang bụng từ bên ngoài) hoặc bằng cách sử dụng ống thông mà qua đó trứng chảy ra hoặc được hút ra khỏi khoang bụng. Trứng được giải phóng ra từ tuyến sinh dục vào khoang bụng được gọi là trứng rụng (độ trưởng thành cấp 5), chúng vẫn được bao bọc bởi chất dịch buồng trứng nhầy nhụa. Để tránh sự tạo ra lớp dính trên trứng khi tiếp xúc với nước, dịch buồng trứng được rửa sạch bằng dung dịch nước muối sinh lý trước khi bắt đầu xử lý. Trứng rụng có thể thu được từ động vật sống, đặc biệt là quá trình rụng liên tục. Tuy nhiên, trứng sống, trưởng thành ở độ trưởng thành cấp 3 hoặc 4 cũng có thể được sử dụng theo sáng chế, mà được lấy từ động vật chết trong tuyến sinh dục và sau đó phân lập. Một cái nhìn tổng quan về các mức độ trưởng thành khác nhau của cá tuyết được đưa ra trong công trình do I. G. Katsiadaki và đồng sự công bố: "Assessment of quality of cod roes and relationship between quality and maturity stage" (J. Sci Food Agric 79:1249-1259 (1999)) có thể được tìm thấy cụ thể trong bảng 1. Định nghĩa bằng số về mức độ trưởng thành có thể thực hiện được với sự trợ giúp của "chỉ số phân cực". Điều này được tính toán từ tỷ số khoảng cách giữa nhân tế bào và màng tế bào với đường kính của băng giữa cực động vật và thực vật (nửa trục lớn). Do đó, theo phương án tiếp theo của sáng chế, được ưu

tiên và thuận lợi là khi xử lý trứng sống, độ trưởng thành của cá hoặc động vật bảo vệ với chỉ số phân cực PI là $0,05 \leq PI \leq 0,15$, tốt hơn là $0,05 \leq PI \leq 0,12$. Trứng có PI này đặc biệt thích hợp để thu hoạch để xử lý theo sáng chế. Thông tin thêm về chỉ số phân cực PI của trứng có thể được tìm thấy, ví dụ, trong hướng dẫn chăn nuôi cá tầm (ấn phẩm FAO Ankara 2011 Tài liệu kỹ thuật về Thủy sản và Nuôi trồng Thủy sản 570 (Fisheries and Aquaculture Technical Paper 570), "Sturgeon Hatchery Practises and Management for Release - Guidelines").

Phương pháp được yêu cầu bảo hộ theo sáng chế có thể được sử dụng để xử lý trứng sống, trưởng thành của cá và động vật giáp xác (tên khoa học Crustacea), các loài có trứng có cấu trúc cơ bản được đòi hỏi theo sáng chế (có nhiều hơn hai lớp trong màng trứng) và thích hợp để tiêu thụ ở dạng trứng cá muối hoặc các sản phẩm tương tự trứng cá muối. Tốt hơn và thuận lợi là xử lý trứng sống, trưởng thành từ cá hoặc động vật giáp xác được đánh bắt tự nhiên hoặc từ cơ sở nuôi trồng thủy sản, mà đã được rụng và thu được bằng cách vớt hoặc thu hoạch đích khác như dùng ống thông. Để làm điều đó, ví dụ, các động vật được dự kiến thả lại vào tự nhiên, như từ dự án thả lại động vật, cũng có thể được thu hoạch. Số tiền thu được từ việc bán trứng cá muối và các sản phẩm tương tự trứng cá muối sau đó có thể được trả lại cho các biện pháp dự trữ. Được ưu tiên và đặc biệt thuận lợi là nếu, theo các phương án nhất định theo sáng chế, trứng sống, trưởng thành của cá có xương sống trong và gần đây tự nhiên, tốt hơn là các loài cá tầm sống, được xử lý. Các phương án theo sáng chế sau đó cũng có thể được sử dụng để sản xuất trứng cá muối (chính hãng) với chất lượng cao nhất. Các sản phẩm tương tự trứng cá muối khác từ tôm hùm hoặc các khác động vật giáp xác, ví dụ, tôm càng xanh, cũng có thể được sản xuất với chất lượng cao nhất với các phương án về phương pháp theo sáng chế. Hơn nữa, các loại trứng rất lớn (đường kính trên 3,2 mm) hoặc mềm, không ổn định (kết cấu trong phép thử độ cứng dưới 0,3 N, mà trên mức này trứng sẽ bị vỡ) có thể được xử lý một cách thuận lợi và ưu tiên, vì các phương án về phương pháp theo sáng chế cũng có thể tùy chọn bao gồm hai bước tiếp xúc với cả sự ổn định đàn hồi (kích thích bằng điện) và cấu trúc (kích thích bằng enzym) của màng trứng.

Cuối cùng, các phương án theo sáng chế cũng bao gồm các sản phẩm khác từ trứng sống, trưởng thành của cá hoặc động vật giáp xác, mà có thể được sản xuất không chỉ với phương pháp được yêu cầu bảo hộ mà còn với các phương án khác. Các sản phẩm khác biệt ở chỗ lớp ổn định đàn hồi ở dạng lớp trong suốt ái toan với các

glucosaminoglycan được kết hợp được tạo ra bổ sung trong màng trứng. Tuy nhiên, trong trường hợp này, trứng sống là chưa được thụ tinh, mà giải thích cho việc tại sao lớp ổn định đàn hồi không xuất hiện trong tự nhiên. Theo các phương án nhất định theo sáng chế, lớp ổn định đàn hồi nằm giữa lớp tế bào vành bên trong và lớp phế nang, tốt hơn là giữa lớp tế bào vành bên ngoài và lớp phế nang. Do đó, nó có thể xuất hiện chỉ trong trường hợp trứng sống với kết cấu nhiều hơn hai lớp của màng trứng. Ví dụ, nhím biển chỉ có chính xác hai lớp trong màng trứng. Lớp ổn định mới này là trong suốt, giống như gel và đàn hồi và có thể được nhuộm màu đỏ về mặt mô học với eosin và màu xanh lam với alcian. Trong quá trình sản xuất sử dụng các phương án nhất định theo sáng chế, đặc điểm khác biệt của nó là bị ảnh hưởng bởi nồng độ cation kali được sử dụng trong bước tiếp xúc với kali và vị trí của nó bị ảnh hưởng bởi thời gian tiếp xúc với kali.

Để loại bỏ dịch buồng trứng, trứng sống, trưởng thành được xử lý với dung dịch nước muối mà không gây hại cho trứng trước xử lý. Được ưu tiên và thuận lợi là dung dịch này là dung dịch nước muối sinh lý. Hơn nữa, được ưu tiên và thuận lợi nếu dung dịch nước muối được tạo ra là dung dịch nước muối từ 0,6 phần trăm đến 1,0 phần trăm, tốt hơn nữa là dung dịch nước muối 0,9 phần trăm. Ví dụ, để chuẩn bị dung dịch nước muối 0,9 phần trăm, 9 g natri clorua (NaCl) được hoà tan vào mỗi 1 lít nước được sử dụng. Nồng độ này tương ứng với nồng độ tồn tại tự nhiên trong các cơ quan của con người, do đó, nó được gọi là dung dịch nước muối "sinh lý".

Các phương án nhất định theo sáng chế còn đề cập đến trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối của trứng trưởng thành, chưa được thụ tinh của các động vật thủy sinh, khác biệt ở chỗ liên kết ngang không thể đảo ngược của các sợi protein bởi các phân tử tyrosin kết hợp được hình thành bổ sung trong màng trứng. Liên kết ngang không thể đảo ngược này nằm trong lớp tế bào vành bên trong và lớp tế bào vành bên ngoài của trứng sống của cá hoặc động vật giáp xác. Liên kết ngang không thể đảo ngược dẫn đến sự ổn định cấu trúc bổ sung của màng trứng. Cùng với sự ổn định đàn hồi đang có, sáng chế cũng có thể được sử dụng để xử lý các loại trứng đặc biệt lớn hoặc mềm. Trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối có thể được sản xuất theo các phương án theo sáng chế, trong đó độ ổn định kết cấu trong màng trứng phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc với canxi và nồng độ các cation canxi trong bước tiếp xúc với canxi. Các phương pháp khác để sản xuất trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối có bản chất giống như việc tạo liên kết ngang protein không thể đảo ngược

trong màng trứng cũng có thể áp dụng được. Các phương án khác về phương pháp và sản phẩm theo sáng chế có thể được tìm thấy trong phần mô tả chi tiết sau đây liên quan đến các phương án ví dụ, nhưng không giới hạn phạm vi của sáng chế ở các phương án ví dụ này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Trong phần mô tả sau đây, phương pháp sản xuất trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối từ trứng sống, trưởng thành của các động vật thủy sinh và các sản phẩm đó theo sáng chế và các cải biến có lợi của chúng nhằm mục đích hiểu hơn về sáng chế được giải thích thêm nhờ các ví dụ phụ thuộc và các hình vẽ. Trong đó:

Các hình vẽ Fig.1A, Fig.1B, Fig.1C là các hình ảnh SEM để so sánh trứng sống ở trạng thái chưa trưởng thành và ở trạng thái trưởng thành (giải pháp kỹ thuật đã biết),

Fig.2 là bảng thứ nhất thể hiện các trị số đo của độ dày màng trứng trong quá trình xử lý trứng sống, trưởng thành từ cá tầm Siberi,

Fig.3 là bảng thứ hai thể hiện các trị số đo của độ dày màng trứng trong quá trình xử lý trứng sống, trưởng thành từ cá tầm Beluga,

Các hình vẽ Fig.4A, Fig.4B, Fig.4C, Fig.4D là các hình ảnh SEM của loạt xử lý để tạo ra lớp ổn định của trứng sống, trưởng thành được xử lý khác nhau của cá tầm với sự xử lý bằng cation kali so với việc xử lý kép với các cation kali và canxi cũng như khi xử lý với các cation canxi riêng,

Các hình vẽ Fig.5A, Fig.5B, Fig.5C, Fig.5D là các hình ảnh TEM của kết cấu của các màng của màng trứng với sự tạo ra lớp ổn định (SS) mới giữa lớp tế bào vành bên ngoài (ZRE) và lớp phôi nang (AL),

Các hình vẽ Fig.6A, Fig.6B, Fig.6C, Fig.6D là các hình ảnh TEM của các hạt trứng cá tầm trưởng thành chưa được xử lý và được xử lý khác (chỉ có các cation kali, xử lý kép với kali và các cation canxi, chỉ có các cation canxi),

Các hình vẽ Fig.7A, Fig.7B, Fig.7C, Fig.7D là các hình ảnh hiển vi quang học của trứng trưởng thành chưa được xử lý của cá tầm và trứng sống, trưởng thành từ cá tầm Siberi được xử lý với các ion kali.

Các hình vẽ Fig.8A, Fig.8B, Fig.8C, Fig.8D là các hình ảnh hiển vi quang học của trứng sống, trưởng thành của cá tầm Siberi được xử lý với các cation canxi và của

trứng sống, trưởng thành được xử lý với các cation kali và với các cation canxi, và

Fig.9A và Fig.9B là các hình ảnh SEM và hình ảnh hiển vi quang học của kết cấu màng trứng của cá tầm Beluga sau khi xử lý trứng sống, trưởng thành với các cation kali và canxi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Đã biết từ các nghiên cứu về mối quan hệ giữa trọng lượng và/hoặc tuổi của các loài cá tầm và kích thước của hạt trứng cá muối hoặc số lượng trứng cá muối thu hoạch được mà đường kính dạng trứng và do đó chất lượng của trứng cá muối tăng theo trọng lượng và/hoặc tuổi của cá tầm. Hơn nữa, số lượng trứng cá muối thu hoạch được tăng lên cùng với sự tăng trọng lượng và tuổi của cá tầm tăng lên và do đó thành công về mặt thương mại. Các loài cá tầm chưa trưởng thành sinh dục trong môi trường tự nhiên cho đến tuổi từ 12 đến 26 tuổi, tùy thuộc vào loài. Hầu hết các loài cá tầm đều trải qua giai đoạn sinh trưởng cho đến khi chúng đẻ trứng lần đầu tiên ở biển hoặc ở các cửa sông và sau đó di cư vào các vùng ven sông để tìm bãi đẻ của chúng trên mặt đất đá trong nước ngọt. Ngoài ra, trong nuôi trồng thủy sản, các loài cá tầm cần khoảng từ 5 đến 16 năm, tùy thuộc vào loài cá tầm, để đạt đến độ trưởng thành sinh dục đầu tiên và do đó thu hoạch trứng muối cá đầu tiên. Trong nuôi trồng thủy sản, việc thu hoạch trứng cá lặp đi lặp lại từ những con cá cái còn sống trong nhiều năm cho thấy rằng việc nuôi cá thân thiện với động vật với chế độ cho ăn tối ưu và mật độ thả thấp và luôn hợp lý về mặt kinh tế và sinh thái do chúng trưởng thành sinh dục muộn và tuổi thọ cao. Có thể dễ dàng sản xuất trứng cá muối ở quy mô tấn đang thu hút về mặt kinh tế trong quy trình phối hợp từ thu hoạch và xử lý trứng vớt được đến trứng cá muối. Các biện pháp nâng cấp phù hợp có thể đạt được sản lượng hàng ngày là 80 kg trở lên tùy thuộc nhiều vào độ tuổi của cá và lượng trứng cá muối đi kèm với nó.

Các phương án nhất định theo sáng chế sử dụng trứng sống, trưởng thành đã được làm sạch trước đó với dung dịch nước muối sinh lý. Đây là trứng rụng trước đó được ép ra khỏi tuyến sinh dục bởi các sợi cơ mịn của tế bào nang do giai đoạn trưởng thành của chúng (giai đoạn sẵn sàng rụng trứng và khả năng thụ tinh), quá trình được biết đến là rụng trứng. Trứng rụng được giải phóng vào các ống nang và khoang bụng của cá và không có cận tế bào và các chất bã khác. Sau đó chúng có thể được đưa ra ngoài cơ thể cá bằng cách xoa bóp vùng bụng mà không ảnh hưởng đến tính mạng của

cá. Bề mặt trứng hoàn toàn sạch sẽ không để lại hốc lõm hoặc nếp nhăn nào có thể dẫn đến sự xâm nhập của vi khuẩn hoặc nấm, dẫn đến thời hạn sử dụng dài cho trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối. Không nhất thiết phải sử dụng các phương pháp bảo quản như hàn the, chất gây hại cho sức khỏe con người. Các hình vẽ Fig.1A, Fig.1B, và Fig.1C thể hiện các hình ảnh hiển vi quét điện tử (scanning electron microscope - SEM) của trứng sống và quá trình rụng trứng theo giải pháp kỹ thuật đã biết. Fig.1A thể hiện tế bào trứng chưa trưởng thành với các tế bào nang như được tìm thấy trong trứng cá muối thông thường từ cá tầm bị giết thịt. Fig.1B thể hiện sự rụng trứng tại chỗ và giải phóng tế bào trứng trưởng thành từ tế bào nang bao quanh. Fig.1C thể hiện trứng cá tầm sống, trưởng thành hoàn toàn nhẵn và sạch.

Theo phương án ví dụ với trứng sống, trưởng thành sau khi rụng, tiến trình phương pháp khả thi theo phương án của sáng chế được giải thích chi tiết hơn dưới đây với một số bước bổ sung tùy chọn:

- Vắt trứng sống từ cá tầm cái sống ở giai đoạn đã trưởng thành V sau khi hòa tan các túi tinh,
- Vận chuyển ngay trứng sống vắt được cùng với dịch buồng trứng đến phòng thí nghiệm trứng cá muối (tránh phần lớn thời gian chờ đợi, thời gian chờ đợi không thể tránh khỏi được đặt trên băng và trong điều kiện không có oxy bằng cách bao phủ buồng trứng bằng màng nhựa không thấm khí),
- Rửa kỹ ngay trứng sống trong dung dịch nước muối sinh lý 0,9 phần trăm đến khi dịch buồng trứng được loại bỏ hoàn toàn,
- Thực hiện bước tiếp xúc với kali:
 - Chuẩn bị dung dịch chứa cation kali nồng độ từ 0,1 đến 2 millimol từ kali xitrat trong nước đã khử ion có độ dẫn điện là 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (ở nhiệt độ 25°C) và nhiệt độ trong phạm vi nhiệt độ vùng cực 10°C,
 - Đưa trứng sống, trưởng thành vào dung dịch trong thời gian tiếp xúc với kali là 10 phút và
 - Lấy trứng đã xử lý ra khỏi dung dịch; và
- Nhúng sơ trứng đã xử lý vào trong dung dịch nước muối sinh lý 0,9 phần trăm.

Cũng có thể thực hiện các phương pháp chiết khác cho trứng trưởng thành. Thậm

chí với sử dụng trứng sống, trưởng thành được lấy từ động vật vừa mới giết mổ, máu và mỡ cá phải được rửa sạch hoặc trứng thậm chí phải được cạo xát để tách khỏi đường sinh dục, điều tốt hơn là có thể đạt được nhờ xử lý sơ bộ với dung dịch nước muối sinh lý. Bằng cách ngâm, độ đàn hồi và đường kính của lớp ổn định có thể được kiểm soát thêm (tức là ngoài sự lựa chọn thời gian tiếp xúc). Do sự ảnh hưởng điện của các cation kali được đưa vào, việc xử lý được mô tả ảnh hưởng đến sự tạo ra lớp ổn định đàn hồi trong suốt giữa lớp tế bào vành bên ngoài và lớp phôi nang trong màng trứng. Trong trứng ở điều kiện bình thường và mềm, việc xử lý với bước tiếp xúc với kali là đủ. Tuy nhiên, với trứng đặc biệt lớn, mềm hoặc nhạy cảm của một số loài cá tầm, ví dụ *Huso huso*, *Acipenser transmontanus* hoặc *Acipenser ruthenus* được sử dụng, bước tiếp xúc với canxi cũng có thể được thực hiện tiếp sau (hoặc được thực hiện trước):

- Thực hiện bổ sung bước tiếp xúc với canxi:
 - Chuẩn bị dung dịch chứa các cation canxi nồng độ từ 0,5 đến 2 millimol của canxi clorua trong nước đã khử ion có độ dẫn điện là 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (ở nhiệt độ 25°C) và nhiệt độ nằm trong phạm vi nhiệt độ vùng cực là 10°C,
 - Đưa trứng sống, trưởng thành vào dung dịch khác trong thời gian tiếp xúc với canxi là 12 phút, và
 - Lấy trứng đã xử lý ra khỏi dung dịch khác đó, và
- Ngâm sơ trứng đã xử lý vào dung dịch nước muối sinh lý 0,9 phần trăm.

Ngoài lớp ổn định đàn hồi từ bước tiếp xúc với kali, bước này cũng tạo ra liên kết ngang protein kết cấu của màng trứng mà có trong cá và động vật giáp xác trong các lớp tế bào vành bên trong và tế bào vành bên ngoài hiện có của màng trứng. Liên kết ngang protetin kết cấu bổ sung này của màng trứng bởi các gốc tyrosin tạo nên độ cứng đàn hồi cho trứng đặc biệt lớn và mềm hoặc nhạy cảm – bên cạnh độ đàn hồi từ bước tiếp xúc với kali. Việc ngâm tùy chọn cũng được sử dụng ở đây để kiểm soát bổ sung. Sản phẩm thu được là trứng cá muối (chính thức) từ trứng sống, trưởng thành, mà sau đó có thể được chế biến thêm như sau:

- Trộn trứng cá muối với natri clorua NaCl khô (các chất hỗ trợ nhỏ giọt không chứa K^+ và Ca^{++}) (3,5 g/100 g trứng cá muối, 3,5%), mà tương ứng với việc ướp muối malossol để bảo quản,
- Nạp trứng cá muối được ướp muối nhẹ và các bình chứa thủy tinh, tốt hơn là lọ

thủy tinh 500 g, và bịt kín chân không kín khí bình chứa với nắp ren và dán nhãn,

- Lưu trữ các bình chứa thủy tinh ở nhiệt độ -2°C trong thời gian từ 2 đến 4 tháng để làm chín thêm trứng cá muối và tùy chọn

- Cấp đông trứng cá muối tươi hoặc trứng cá muối đã chín theo yêu cầu của người tiêu dùng trong các bình chứa thủy tinh ở nhiệt độ -18°C .

Trứng sống, trưởng thành được xử lý trong bước tiếp xúc với kali tạo ra khu vực hoàn toàn mới do sự xử lý: lớp ổn định SS, mà lớp này đàn hồi và trong suốt (trương tự gel). Lớp ổn định SS có thể dễ dàng được nhuộm màu để phát hiện. Lớp này nằm giữa lớp phế nang AL và lớp tế bào vành bên ngoài ZRE và cho đến nay vẫn chưa được mô tả trong bất kỳ tài liệu nào. Tham khảo phần Giới thiệu mô tả với bảng chú giải thuật ngữ Siddique tương ứng cho cấu trúc của trứng cá và động vật giáp xác.

Bảng trên Fig.2 dựa trên các phép đo đường kính (tính bằng μm) của màng trứng ngoại bào trên trứng trưởng thành của cá tầm Siberi trên cơ sở cắt lạnh có độ dày lớp không đổi ($10\ \mu\text{m}$) bằng cách sử dụng phép phân tích hình ảnh được điều khiển bằng máy tính (Zeiss) dưới ảnh hưởng của các biện pháp xử lý khác nhau để ổn định màng trứng. Bảng này thể hiện sự hình thành của lớp ổn định SS mới và đường kính của các lớp hiện có (ZRI, ZRE, AL) của màng trứng đang được xử lý với các nồng độ bổ sung khác nhau tính bằng mmol/l của riêng các cation kali K^{+} (từ kali xitrat) và kết hợp với cation canxi Ca^{++} (từ canxi clorua) trong các bước tiếp xúc khác nhau theo sáng chế. Trứng sống, trưởng thành từ cá tầm Siberi *Acipenser baerii* được xử lý. Ngoài các từ viết tắt đã được giải thích ở trên và trong trường hợp của Siddique, Mv có nghĩa là trị số trung bình, và Std có nghĩa là độ lệch chuẩn. Các trị số đã cho là các trị số cho lớp ổn định đàn hồi SS mới. Ngoài ra, tham chiếu đến tình trạng kỹ thuật theo WO 2007/045233 A1 được đề cập trên.

Việc kiểm soát chất lượng sau khi xử lý đã cho thấy rằng chỉ ở các nồng độ cation kali ở mức $1\ \text{mmol/l}$ và $1,5\ \text{mmol/l}$, mới đạt được độ dày màng trứng ít nhất là $12\ \mu\text{m}$ và sản phẩm trung gian được tạo ra mà làm mất độ nhớt dính và đủ chắc để chế biến trứng cá muối thêm. Hơn nữa, việc kiểm soát này đã cho thấy thời gian xử lý tốt hơn là 10 phút là hợp lý để tất cả trứng sống trong dịch có phản ứng chuyển hóa. Có thể đạt được lượng xử lý là 2,5 kg trứng cá muối (trong xấp xỉ 25 l dung dịch) trong một đơn vị xử lý. Việc kiểm tra cảm quan trứng cá muối sau khi xử lý với các cation kali

theo sáng chế cho thấy rằng kết cấu đàn hồi của trứng cá muối của cá tầm Siberi không thể hiện bất kỳ sự khác biệt nào ở các mức thay đổi nồng độ giữa 1 mmol/l và 1,5 mmol/l. Mặt khác, trứng được xử lý trong dung dịch với các nồng độ cation kali là khác nhau về kết cấu và chỉ có một số ít trứng ổn định, trong khi trứng chưa được xử lý rất mềm và dễ vỡ. Theo các thử nghiệm cảm quan được thực hiện, việc xử lý với hai bước tiếp xúc (các cation kali và canxi) dẫn đến sản phẩm cứng, giòn, cũng được gọi là "siêu plop" trong trường hợp trứng của cá tầm Siberi.

Bảng trên Fig.3 thể hiện sự có mặt và đường kính (tính bằng μm) của các lớp của màng trứng ngoại bào với các phương pháp xử lý khác nhau theo sáng chế của trứng lớn, sống từ cá tầm *Huso huso Beluga*. Trong quá trình xử lý trứng cá muối này với các cation kali (từ kali xitrat), sự tạo ra lớp ổn định SS ái toan mới trong màng trứng ngoại bào cũng đã được quan sát thấy, màng này cũng nằm giữa ZRE và AL. Các thử nghiệm cảm quan được thực hiện trên trứng lớn của cá tầm beluga cho thấy rằng việc xử lý kép với các cation kali và canxi sẽ cho kết quả tối ưu về kết cấu của trứng sống, trưởng thành dễ vỡ.

Các hình vẽ Fig.4A, Fig.4B, Fig.4C, và Fig.4D thể hiện các hình ảnh SEM về sự thay đổi cấu trúc của màng trứng ngoại bào của trứng sống, trưởng thành, qua ví dụ về cá tầm Siberi dưới các phương pháp xử lý khác nhau. Hai độ phóng đại được hiển thị: bên trái 6000x và bên phải (cắt trích) 12000x. Các phương pháp xử lý luôn được thực hiện trên trứng sống, mà được cấp đông sốc nhiệt trong hexan ở nhiệt độ -80°C để tạo ra sự cắt lạnh mô học để duy trì trạng thái ban đầu của nó.

Trên Fig.4A, trong trứng trưởng thành chưa được xử lý, các vùng của màng trứng không có sự phân tách rõ ràng với nhau (giải pháp kỹ thuật đã biết).

Trên Fig.4B, dưới sự ảnh hưởng của kali 0,5 mmol/l, lớp ổn định mới SS đã được tạo ra giữa lớp tế bào vành bên ngoài ZRE và lớp phế nang AL, trong khi lớp tế bào vành bên trong ZRI và lớp tế bào vành bên ngoài ZRE thể hiện kết cấu protein lỏng lẻo không đổi như trong trứng chưa được xử lý.

Trên Fig.4C, việc xử lý kép liên tiếp của trứng với các cation kali và canxi cho thấy cả hai đặc điểm hình thái đặc trưng trong SEM, cụ thể là lớp ổn định SS thu được nhờ xử lý kali và việc xoắn và liên kết ngang của các sợi protein trong lớp tế bào vành bên trong ZRI và lớp tế bào vành bên ngoài ZRE, mà là đặc trưng của việc xử lý

bằng canxi, khi so sánh với Fig.4D.

Trên Fig.4D, việc xử lý riêng bằng canxi dẫn đến việc xoắn mạnh và liên kết ngang của các sợi protein lỏng lẻo trong lớp tế bào vành bên trong ZRI và lớp tế bào vành bên ngoài ZRE (giải pháp kỹ thuật đã biết), khi so sánh với Fig.4A và Fig.4B mà không được xử lý bằng canxi.

Các hình vẽ Fig.5A, Fig.5B, Fig.5C, Fig.5D thể hiện các hình ảnh hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscope images -TEM, độ phóng đại 3000 lần) của kết cấu nhiều lớp của màng trứng của trứng cá tầm trưởng thành trong quá trình xử lý với các cation kali nồng độ 1,0 mmol/l. Fig.5A thể hiện lớp tế bào vành bên trong ZRI với các sợi mờ đục, lỏng lẻo tách ra từ lớp tế bào vành bên ngoài ZRE do lớp mặt ngoài EP (hiện tượng chỉ có thể được xác định về mặt siêu kết cấu). Lớp tế bào vành bên ngoài ZRE được đặc trưng bởi mạng lưới dạng sợi gồm các sợi dài. Fig.5B thể hiện sự hình thành siêu cấu trúc của lớp ổn định SS mới với kết cấu hạt mịn trực tiếp giữa lớp tế bào vành bên ngoài ZRE và – theo Fig.5C – lớp phế nang AL, mà được thấm vào lớp ngoài vi của màng trứng – theo Fig.5D – nhờ các ống dẫn nhỏ (các ống dẫn, kênh dẫn nhỏ). Các phép phân tích siêu cấu trúc xác nhận rằng việc xử lý với các cation kali (1,0 mmol/l) theo các phương pháp nhất định của sáng chế dẫn đến sự tạo ra lớp ổn định SS mới chưa từng biết trước đây với kết cấu vô định hình và nằm giữa lớp tế bào vành bên ngoài ZRE và lớp phế nang AL ở cá và động vật giáp xác.

Các hình vẽ Fig.6A, Fig.6B, Fig.6C, và Fig.6D thể hiện các hình ảnh TEM (độ phóng đại 3000 lần) của các hạt vỏ CG trong tế bào chất của trứng ngoại vi trong phạm vi màng sinh chất của trứng cá trưởng thành, trong đó Fig.6A thể hiện trứng chưa được xử lý (giải pháp kỹ thuật đã biết), Fig.6B thể hiện trứng đã được xử lý với các cation kali, Fig.6C thể hiện trứng đã được xử lý với các cation kali và canxi và Fig.6D thể hiện trứng đã được xử lý chỉ với các cation canxi (giải pháp kỹ thuật đã biết).

Các hạt vỏ là các cơ quan tế bào bài tiết (các vùng phân định theo cấu trúc) được tìm thấy trong trứng và liên kết chặt chẽ với việc thụ tinh. Các hạt vỏ chứa các enzym như peroxidaza và các yếu tố cấu trúc để tạo liên kết ngang tyrosin của lớp tế bào vành bên trong ZRI và lớp tế bào vành bên ngoài ZRE. Như được phân tích bởi TEM dưới sự ảnh hưởng của các biện pháp xử lý khác nhau, sự đáp ứng vỏ và sự thải các chất bên trong của nó được kích hoạt nhờ sự xử lý với các cation canxi. Quy trình

giống như thế cũng xảy ra trong hiện tượng thụ tinh tự nhiên bởi sóng canxi gây ra bởi tinh trùng trong tế bào chất của màng trứng. Trong trứng chưa được xử lý (Fig.6A), các hạt vỏ CG với sự nguồn cấp enzym của chúng có thể nhận biết rõ ràng như là các túi lớn, tròn (bọt) trong tế bào chất ngoại vi của trứng, mà vùng này cũng chứa các yếu tố cấu trúc. Tương tự như vậy, các hạt vỏ CG cũng có mặt không thay đổi trong quá trình xử lý riêng với kali theo sáng chế (Fig.6B). Tuy nhiên, sự vận chuyển túi này một cách mạnh mẽ có thể quan sát thấy trong màng trứng từ tế bào chất của trứng vào màng trứng không bào. Trên Fig.6A và Fig.6B, lòng đỏ trứng được đánh dấu với chữ cái D. Trong xử lý kép với các cation kali và canxi (Fig.6C), cả hai hiện tượng phóng chất bên trong của các hạt vỏ CG (mũi tên) và sự tạo ra lớp ổn định SS mới đều xảy ra. Việc xử lý với riêng các cation canxi (Fig.6D) chỉ dẫn đến đáp ứng vỏ, trong đó các chất được phóng vào màng trứng không bào và việc tạo liên kết ngang nhờ enzym của lớp tế bào vành bên trong ZRI và lớp tế bào vành bên ngoài ZRE được khởi tạo nhờ các gốc tyrosin. Các không bào trống V vẫn còn trong tế bào chất của trứng.

Đối với việc sàng lọc chẩn đoán các kết quả cắt lạnh đối với ảnh hưởng của kali theo sáng chế, trên Fig.7A và Fig.7B, các hình ảnh hiển vi quang học (độ phóng đại gấp 400 lần) của sóng chưa được xử lý của cá tầm *Siberi Acipenser baerii* theo giải pháp kỹ thuật đã biết được thể hiện. Ảnh bên trái theo Fig.7A thể hiện sự nhuộm HE (nhuộm hematoxylin-eosin), ảnh bên phải theo Fig.7B thể hiện sự nhuộm màu xanh alcian. Thử nghiệm này nhuộm màu các glucosaminoglycan GAG, hyaluron và fibrin. Có thể thấy rằng màu xanh alcian không có trong các lớp khác nhau của màng trứng nhưng lại hiện diện rõ ràng trong tế bào chất noãn hoàng OP. Các lớp riêng lẻ được đặc trưng theo các phương án nêu trên và được đánh dấu độ dày của chúng bằng các mũi tên kép.

Mặt khác, Fig.7C và Fig.7D, thể hiện các hình ảnh của các kết quả cắt lạnh của trứng sống, trưởng thành ở trạng thái rụng trứng của cá tầm *Siberi Acipenser baerii* được xử lý với phương pháp tiếp xúc với kali được yêu cầu bảo hộ theo sáng chế. Trứng được xử lý với nồng độ 1,5 mmol/l của các cation kali (từ kali xitrat). Sự xuất hiện lớp ổn định SS mới giữa lớp tế bào vành bên ngoài ZRE và lớp phế nang AL trong màng trứng ngoại bào là đáng chú ý. Ảnh bên trái theo Fig.7C thể hiện rằng lớp ổn định SS mới này đặc biệt ái toan sau khi nhuộm với eosin. Ảnh bên phải theo Fig.7D thể hiện rằng lớp ổn định SS mới đặc biệt giàu GAG sau khi nhuộm với màu xanh alcian. Tính đàn hồi đặc biệt có lợi của lớp ổn định SS mới có thể được bắt nguồn từ

đó.

Đối với sàng lọc chẩn đoán của các kết quả cắt lạnh đối với ảnh hưởng của riêng canxi và ảnh hưởng của việc xử lý kép bởi các cation kali và canxi, Fig.8A và Fig.8B thể hiện các hình ảnh từ giải pháp kỹ thuật biết của các kết quả cắt lạnh của trứng trưởng thành của cá tầm Siberi *Acipenser baerii* được xử lý với phương pháp theo tài liệu WO 2007/045233 A1, được phóng đại 400 lần. Ảnh chụp bên trái theo Fig.8A thể hiện kết quả nhuộm HE (nhuộm hematoxylin-eosin), Ảnh chụp bên phải theo Fig.8B thể hiện kết quả nhuộm màu xanh alcian. Trứng rụng của cá tầm Siberi được xử lý. Ảnh chụp bên trái theo Fig.8A với nhuộm HE thể hiện các sợi protein được liên kết ngang bởi các phân tử tyrosin trong lớp tế bào vành bên trong ZRI và lớp tế bào vành bên ngoài ZRE. Sự phân tách giữa hai khu vực này có thể được quan sát thấy. Việc tạo liên kết ngang dẫn đến sự ổn định kết cấu của màng trứng. Trong ảnh chụp bên phải theo Fig.8B với nhuộm màu xanh alcian, có thể thấy rằng lớp tế bào vành bên trong ZRI và lớp tế bào vành bên ngoài ZRE chỉ được nhuộm rất yếu, mà dẫn đến có ít GAG và độ đàn hồi thấp, trong khi đó trong tế bào chất noãn hoàng OP, sự nhuộm màu mạnh cho thấy có rất nhiều GAG.

Trên Fig.8C và Fig.8D, các ảnh chụp của các kết quả cắt lạnh của trứng rụng, sống được xử lý theo phương pháp được yêu cầu bảo hộ được thể hiện, mà trong đó trứng đã được xử lý trong bước tiếp xúc với canxi bổ sung vào phương pháp theo WO 2007/045233 A1. Trứng rụng, trưởng thành của cá tầm Siberi *Acipenser baerii* được xử lý với các cation kali ở nồng độ 1,5 mmol/l (từ kali xitrat) trong bước tiếp xúc với kali và với các cation canxi ở nồng độ 1,6 mmol/l (từ canxi clorua) trong bước tiếp xúc với canxi. Ngoài việc tạo liên kết ngang làm cứng màng trứng được thể hiện trên các ảnh chụp theo Fig.8A và Fig.8B, lớp ổn định trong suốt SS mới với chức năng ổn định hóa màng trứng của nó cũng có thể được quan sát thấy trên các ảnh chụp theo Fig.8C và Fig.8D. Trứng sống, trưởng thành đã xử lý của cá tầm Siberi nhờ đó được ổn định hóa cả về độ đàn hồi (nhờ các GAG) và về kết cấu (nhờ việc tạo liên kết ngang protein) và tạo ra trứng cá muối tuyệt vời.

Fig.9A thể hiện hình ảnh SEM đặc trưng (độ phóng đại 12000 lần) của màng trứng của trứng rụng, trưởng thành, sống từ cá tầm Beluga *Huso huso* sau khi xử lý kép theo sáng chế. Fig.9B thể hiện hình ảnh hiển vi quang học (độ phóng đại 400 lần) của màng trứng của trứng rụng, trưởng thành từ cá tầm Beluga *Huso huso* sau khi xử lý kép theo sáng chế. Cả hai hình ảnh thể hiện lớp ổn định SS mới và việc tạo liên kết

ngang của lớp tế bào vành bên trong ZRI và lớp tế bào vành bên ngoài ZRE. Hơn nữa, đáng chú ý là trứng của *Huso huso* có lớp phế nang AL cực kỳ đặc biệt với các không bào V lớn. Việc sàng lọc các kết quả cắt lạnh với nhuộm H&E xác nhận rằng sự tạo ra lớp ổn định đàn hồi SS mới với một bước tiếp xúc với cation kali và việc tạo liên kết ngang protein bổ sung trong màng trứng với hai bước tiếp xúc với các cation kali và canxi.

Danh sách các dấu hiệu chỉ dẫn

AL	Lớp phế nang
Ca ⁺⁺	Các cation canxi
CG	Các hạt vỏ
CYT	Tế bào chất (OP)
D	Lòng đỏ
EP	Lớp mặt ngoài
K ⁺	Các cation kali
Mv	Trị số trung bình
OP	Tế bào chất noãn hoàng (tế bào chất của trứng)
pAL	Lớp phế nang (về phía ngoại vi của màng trứng)
PO	Màng sinh chất của tế bào chất (tế bào trứng)
SS	Lớp ổn định
Std	Độ lệch chuẩn
V	Không bào
ZRI	Lớp tế bào vành bên trong
ZRE	Lớp tế bào vành bên ngoài

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối từ trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng của cá hoặc động vật giáp xác, với màng trứng có ba lớp hoặc nhiều hơn, trong đó trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng ở trạng thái có thể thụ tinh nhưng chưa được thụ tinh và có hàm lượng kali tự nhiên trong tế bào chất của trứng, phương pháp bao gồm:

xử lý trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng bằng dung dịch nước muối 0,6% đến 1,0% để loại bỏ chất dịch buồng trứng và sau đó, trong bước tiếp xúc với kali, bằng hóa chất chứa kali có tác dụng ổn định màng trứng của trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng, trong đó ở bước tiếp xúc với kali, hóa chất chứa kali bao gồm kali được hòa tan trong nước đã khử ion với nồng độ cation kali nằm trong khoảng từ 0,1 mmol/l đến 3,0 mmol/l, trong đó trước khi bổ sung chất cho kali để tạo thành các cation kali, nước đã khử ion có nhiệt độ nằm trong phạm vi nhiệt độ sinh sản tự nhiên của cá và động vật giáp xác nằm trong khoảng từ 1°C đến 29°C, và trong đó trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng được xử lý trong hóa chất chứa kali có thời gian tiếp xúc với kali từ 5 phút đến 30 phút,

và cuối cùng, nhúng trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng vào trong dung dịch nước muối 0,6% đến 1,0%.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất cho kali được sử dụng là ít nhất một muối kali, và trong đó ít nhất một muối kali là muối của axit citric, muối của axit hydrocloric, muối của axit sorbic, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nồng độ của các cation kali trong hóa chất chứa kali là 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 0,65 mmol/l, 1,6 mmol/l hoặc 2,0 mmol/l.

4. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nồng độ của các cation kali trong hóa chất chứa kali là 1,0 mmol/l hoặc 1,5 mmol/l.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó thời gian tiếp xúc với kali trong bước tiếp xúc với kali là 10 phút, 12 phút, 15 phút, 20 phút hoặc 25 phút.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó nhiệt độ của hóa chất chứa kali trong bước tiếp xúc với kali là phạm vi nhiệt độ đới cực giữa 1°C và 15°C, hoặc giữa 5°C và 12°C, trong phạm vi nhiệt độ ôn đới giữa 10 và 20°C, hoặc

trong phạm vi nhiệt độ nhiệt đới giữa 20°C và 29°C.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó nhiệt độ của hóa chất chứa kali trong bước tiếp xúc với kali là phạm vi nhiệt độ đới cực là 10°C.

8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó nhiệt độ của hóa chất chứa kali trong bước tiếp xúc với kali là phạm vi nhiệt độ ôn đới là 15°C hoặc 12°C.

9. Phương pháp theo điểm 6, trong đó nhiệt độ của hóa chất chứa kali trong bước tiếp xúc với kali là phạm vi nhiệt độ nhiệt đới là 27°C hoặc 21°C.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó hóa chất chứa kali trong bước tiếp xúc với kali có độ pH giữa 6,8 và 8,0, hoặc giữa 7,0 hoặc 7,9.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó hóa chất chứa kali trong bước tiếp xúc với kali có độ pH là 7,2, 7,4 hoặc 7,5.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11,

còn bao gồm bước tiếp xúc với canxi trong hóa chất chứa canxi, trong đó chất cho canxi được hòa tan trong nước đã khử ion để cung cấp nồng độ canxi cation nằm trong khoảng từ 0,1 mmol/l đến 3 mmol/l, trong đó trước khi bổ sung chất cho canxi cho sự hình thành các cation canxi, nước đã khử ion ở nhiệt độ giữa 1°C và 29°C, nằm trong phạm vi nhiệt độ sinh sản tự nhiên của cá và động vật giáp xác, và trong đó trứng sống, trứng rụng được xử lý trong hóa chất chứa canxi có thời gian tiếp xúc với canxi từ 9 phút đến 30 phút,

trong đó bước tiếp xúc với canxi được thực hiện trước bước tiếp xúc với kali hoặc sau bước tiếp xúc với kali nhưng trước khi thực hiện bước nhúng trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng trong dung dịch nước muối 0,6% đến 1,0%.

13. Phương pháp theo điểm 12,

trong đó chất cho canxi được sử dụng là canxi xitrat, canxi clorua và/hoặc canxi sorbat, hoặc bất kỳ tổ hợp nào của chúng.

14. Phương pháp theo điểm 12 hoặc điểm 13,

trong đó nồng độ của các cation canxi trong hóa chất chứa canxi trong bước tiếp xúc với canxi là 0,5 mmol/l, 0,8 mmol/l, 1,0 mmol/l, 1,5 mmol/l, 1,6 mmol/l hoặc 2,0 mmol/l.

15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 14, trong đó thời gian tiếp xúc với canxi ở bước tiếp xúc với canxi là 10 phút, 12,5 phút, 15 phút, 16 phút, 20 phút hoặc 25 phút.

16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 15,

trong đó nhiệt độ của hóa chất chứa canxi trong bước tiếp xúc với canxi nằm trong phạm vi nhiệt độ đối cực giữa 1°C và 15°C , hoặc giữa 5°C và 12°C , nằm trong phạm vi nhiệt độ ôn đới giữa 10°C và 20°C , hoặc nằm trong phạm vi nhiệt độ nhiệt đới giữa 20°C và 29°C .

17. Phương pháp theo điểm 16,

trong đó nhiệt độ của hóa chất chứa canxi trong bước tiếp xúc với canxi nằm trong phạm vi nhiệt độ đối cực là 10°C , nằm trong phạm vi nhiệt độ ôn đới là 15°C hoặc 12°C , hoặc nằm trong phạm vi nhiệt độ nhiệt đới là 27°C hoặc 21°C .

18. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 17,

trong đó hóa chất chứa canxi trong bước tiếp xúc với canxi có độ pH giữa 6,8 và 8,0, giữa 7,0 và 7,9, hoặc có độ pH là 7,2, 7,4 hoặc 7,5.

19. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 18,

trong đó nước đã khử ion có độ dẫn điện ở 25°C là giữa $1\ \mu\text{S}/\text{cm}$ và $15\ \mu\text{S}/\text{cm}$.

20. Phương pháp theo điểm 19,

trong đó nước đã khử ion có độ dẫn điện là $1\ \mu\text{S}/\text{cm}$.

21. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 20,

trong đó hóa chất chứa canxi có độ pH giữa 7,0 và 7,9.

22. Phương pháp theo điểm 21,

trong đó hóa chất chứa canxi có độ pH là 7,2, 7,4 hoặc 7,5.

23. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22,

trong đó sau bước tiếp xúc cuối cùng để bảo quản và tăng cường hương vị, bước ướp muối nhẹ được thực hiện, dựa trên lượng trứng cá muối hoặc sản phẩm thay thế trứng cá muối, với từ 2,0% đến 3,8% natri clorua, trong đó natri clorua không có các chất cho kali và canxi.

24. Phương pháp theo điểm 23,

trong đó bước ướp muối nhẹ được thực hiện, dựa trên lượng trứng cá muối hoặc sản phẩm thay thế trứng cá muối, với 3,5% natri clorua, trong đó natri clorua không có các chất cho kali và canxi.

25. Phương pháp theo điểm 23 hoặc 24,

trong đó sau bước bảo quản và tăng cường hương vị hoặc lưu trữ, trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối được cấp đông ở nhiệt độ nằm trong phạm vi giữa -20°C và -15°C .

26. Phương pháp theo điểm 25,

trong đó trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối được cấp đông ở -18°C .

27. Phương pháp theo điểm 23 hoặc 24,

sau bước bảo quản và tăng cường hương vị, bước lưu trữ trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối trong hộp thủy tinh kín trong một đến ba tháng được thực hiện, ở nhiệt độ giữa -2°C và -4°C .

28. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 27,

trong đó trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng của cá hoặc động vật giáp xác được xử lý với chỉ số phân cực (PI) là $0,05 \leq \text{PI} \leq 0,15$.

29. Phương pháp theo điểm 28,

trong đó chỉ số phân cực (PI) là $0,05 \leq \text{PI} \leq 0,12$.

30. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 29,

trong đó trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng của cá hoặc động vật giáp xác từ đánh bắt tự nhiên hoặc từ trang trại nuôi trồng thủy sản, mà đã được thu hoạch ở trạng thái được rụng từ buồng trứng bằng cách đẻ trứng hoặc vắt trứng, được xử lý.

31. Phương pháp theo điểm 30,

trong đó trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng được thu hoạch từ cá nhiều xương nguyên thủy hoặc gần đây, hoặc của động vật giáp xác.

32. Phương pháp theo điểm 31,

trong đó trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng được thu hoạch từ loài cá tầm.

33. Phương pháp theo điểm 31,

trong đó trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng được thu hoạch từ tôm hùm.

34. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 33,

trong đó trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng rất lớn với kích thước hạt bằng hoặc lớn hơn 3,2 mm về đường kính, được xử lý.

35. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 34,

trong đó trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng mềm, không ổn định có khả năng chịu tải cho đến khi vỡ thấp hơn hoặc bằng 0,3 N được xử lý.

36. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 34,

trong đó dung dịch nước muối là dung dịch nước muối 0,9%.

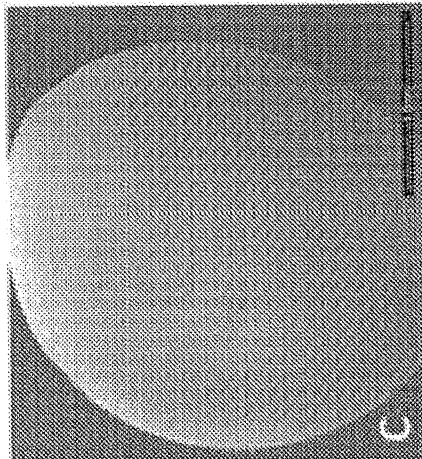
37. Trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối từ trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng từ cá hoặc động vật giáp xác, với màng trứng có ba lớp hoặc nhiều hơn, ba lớp hoặc nhiều hơn này bao gồm lớp tế bào vành bên trong (ZRI), lớp tế bào vành bên ngoài (ZRE), và lớp phế nang (AL), trong đó trứng sống, trứng trưởng thành, trứng rụng ở trạng thái có thể thụ tinh nhưng chưa được thụ tinh và có hàm lượng kali tự nhiên trong tế bào chất của trứng,

trong đó lớp ổn định đàn hồi (SL) được tạo ra trong màng trứng giữa lớp tế bào vành bên trong (ZRI) và lớp phế nang (AL), hoặc giữa lớp tế bào vành bên ngoài (ZRE) và lớp phế nang (AL), và trong đó SL đàn hồi là lớp tăng bạch cầu ái toan và trong suốt với glucosaminoglycan được kết hợp.

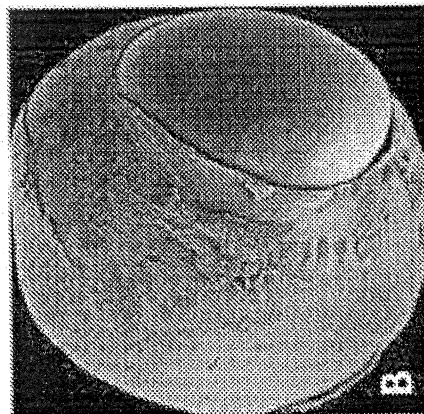
38. Trứng cá muối hoặc sản phẩm tương tự trứng cá muối theo điểm 37,

trong đó, liên kết ngang không thể đảo ngược của các sợi protein bởi các phân tử tyrosin kết hợp được hình thành bổ sung trong màng trứng trong lớp tế bào vành bên trong (ZRI) và trong lớp tế bào vành bên ngoài (ZRE).

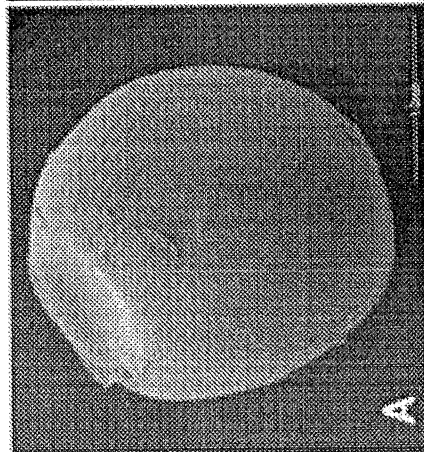
1/9

**Fig.1C**

Giải pháp kỹ thuật
đã biết

**Fig.1B**

Giải pháp kỹ thuật
đã biết

**Fig.1A**

Giải pháp kỹ thuật
đã biết

2/9

Các lớp của màng trứng	ZRI Mw	ZRI Std	ZRE Mw	ZRE Std	SS Mw	SS Std	AL Mw	AL Std
Đối chứng chứa được xử lý	21,2	6,0	32,9	7,5	0,0	0,0	64,2	9,6
K ⁺ từ kali xitrat								
K ⁺ 0,1 mmol/l	18,0	5,5	24,8	4,7	6,3	0,6	72,2	16,4
K ⁺ 0,5 mmol/l	20,5	5,3	28,9	5,3	6,9	1,0	97,4	29,7
K ⁺ 1,0 mmol/l	18,8	4,4	19,0	3,0	12,6	1,5	77,3	3,7
K ⁺ 1,5 mmol/l	17,5	2,5	27,7	5,8	12,5	3,7	73,2	13,5
K ⁺ 0,5 mmol/l + Ca ⁺⁺ 0,8 mmol/l	17,3	1,8	27,3	3,8	12,0	1,9	67,4	8,9
WO 2007/045233 A1								
Ca ⁺⁺ 0,4 mmol/l	16,7	4,7	27,7	5,1	0,0	0,0	92,0	17,6
Ca ⁺⁺ 0,8 mmol/l	21,0	3,9	27,0	6,4	0,0	0,0	92,4	25,3

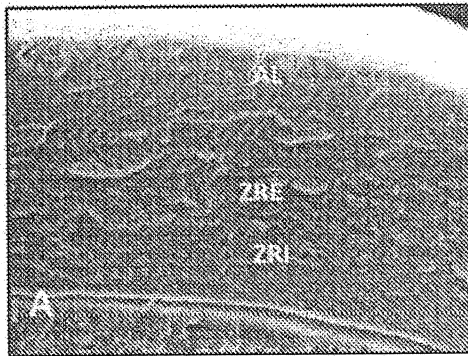
Fig. 2

3/9

Các lớp của màng trứng	ZRI Mw	ZRI Std	ZRE Mw	ZRE Std	SS Mw	SS Std	AL Mw	AL Std
Đối chứng chưa được xử lý	12,6	1,9	9,8	1,7	0,0	0,0	37,6	5,9
K ⁺ từ kali xitrat								
K ⁺ 0,5 mmol/l	15,7	0,4	15,0	2,4	13,2	1,8	61,8	9,2
K ⁺ 0,65 mmol/l	17,0	3,2	13,8	2,4	17,0	2,1	60,0	8,2
K ⁺ 0,65 mmol/l + Ca ⁺⁺ 1,6 mmol/l	13,1	1,5	12,0	2,4	10,7	0,0	53,5	9,2

Fig.3

4/9



Giải pháp kỹ thuật
đã biết

Fig.4A

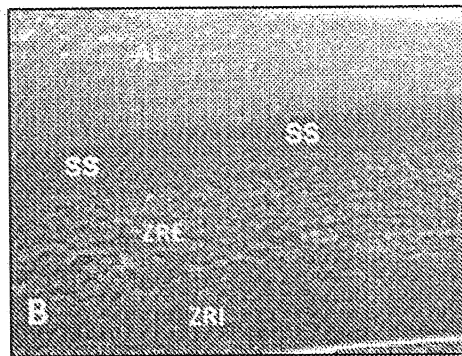
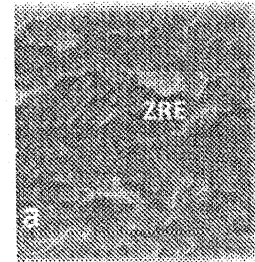


Fig.4B

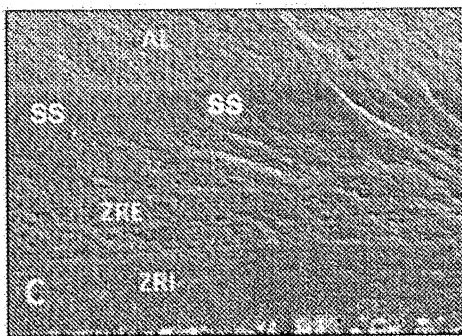
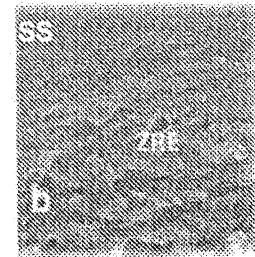
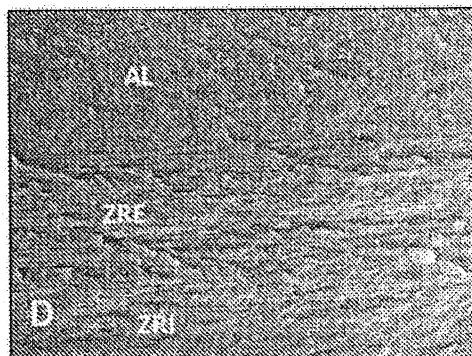
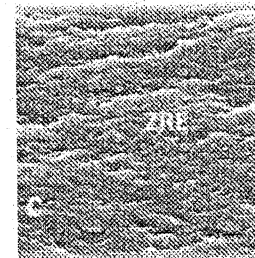
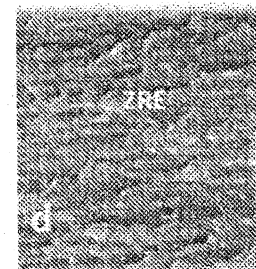


Fig.4C



Giải pháp kỹ thuật
đã biết

Fig.4D



5/9

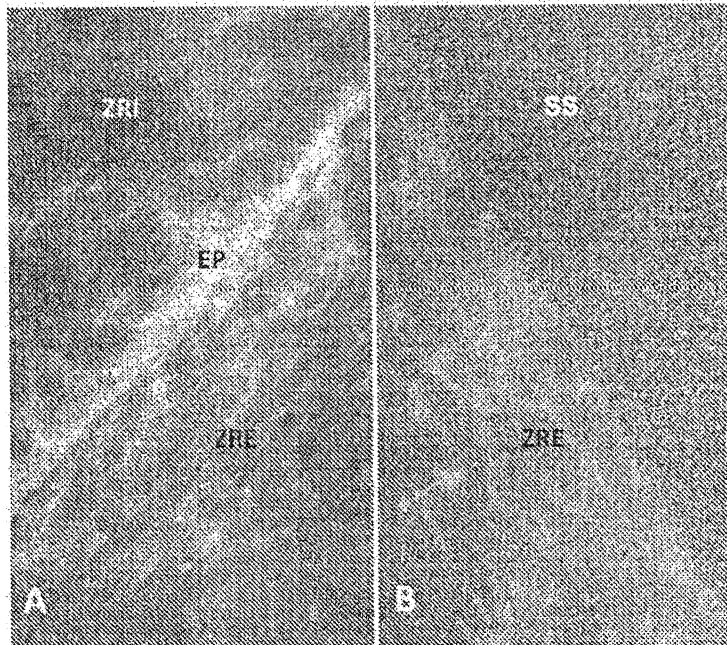


Fig.5A

Fig.5B

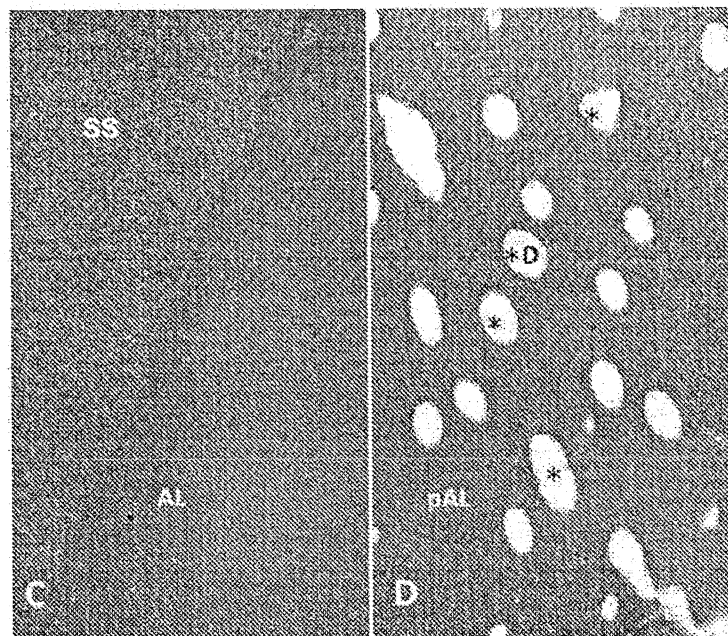


Fig.5C

Fig.5D

6/9

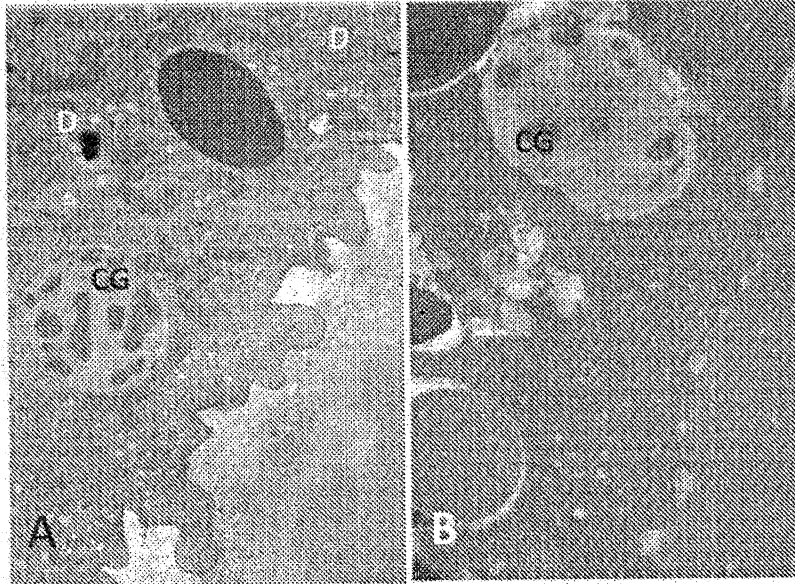


Fig. 6A Giải pháp kỹ thuật đã biết

Fig. 6B

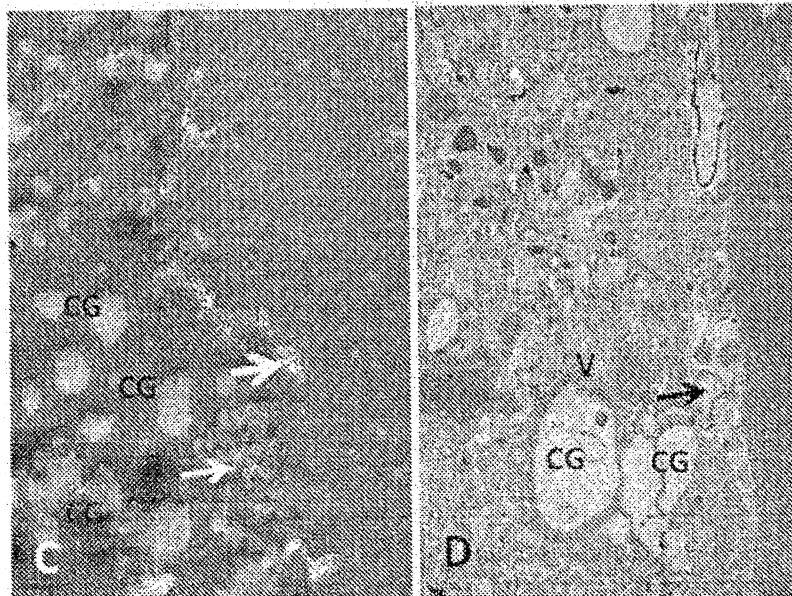


Fig. 6C

Giải pháp kỹ thuật đã biết

Fig. 6D

7/9

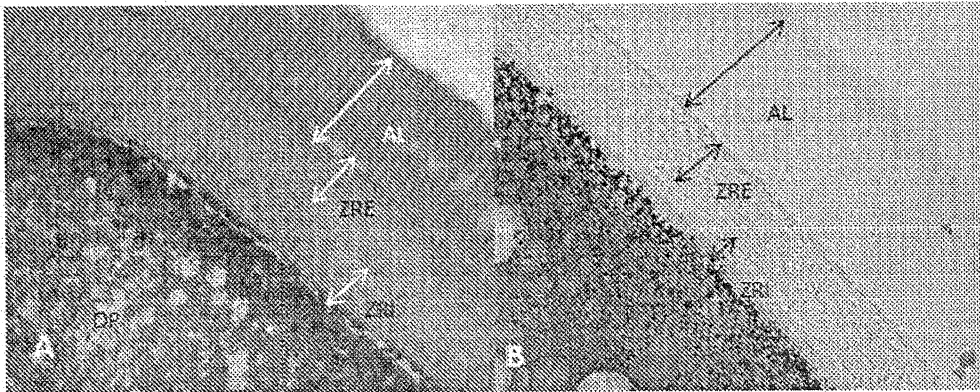


Fig.7A Giải pháp kỹ thuật đã biết

Giải pháp kỹ thuật đã biết

Fig.7B

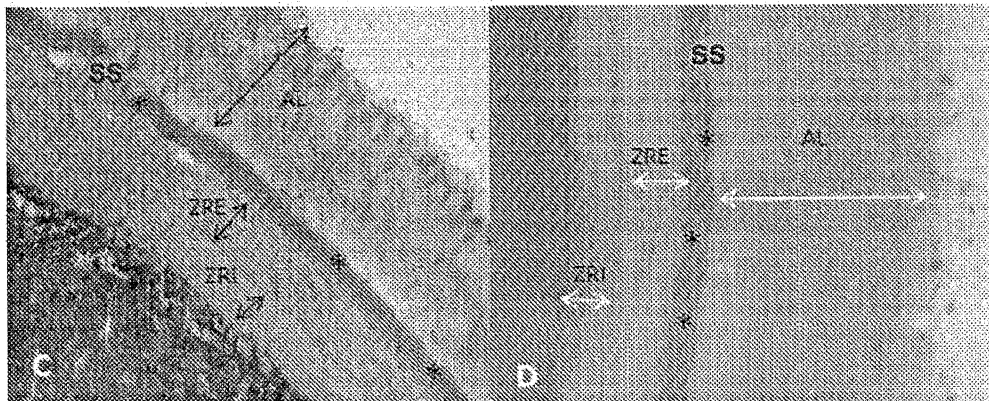


Fig.7C

Fig.7D

8/9

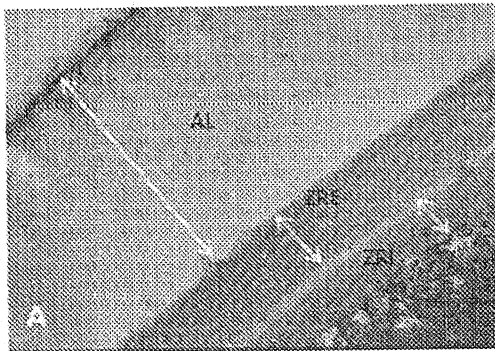


Fig.8A Giải pháp kỹ thuật
đã biết

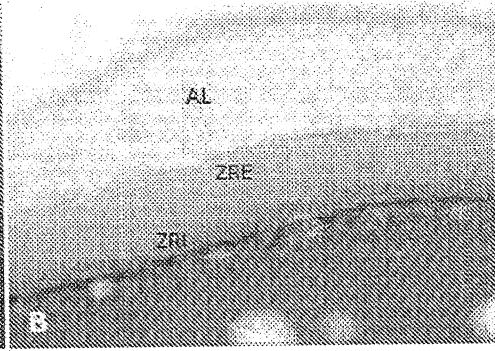


Fig.8B Giải pháp kỹ thuật
đã biết

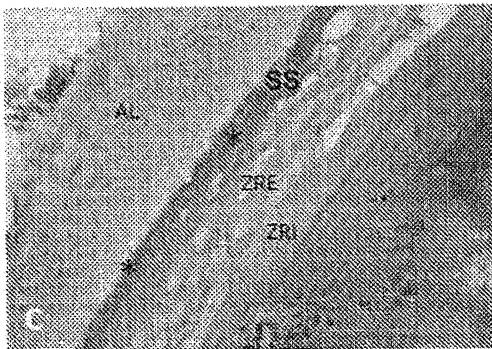


Fig.8C

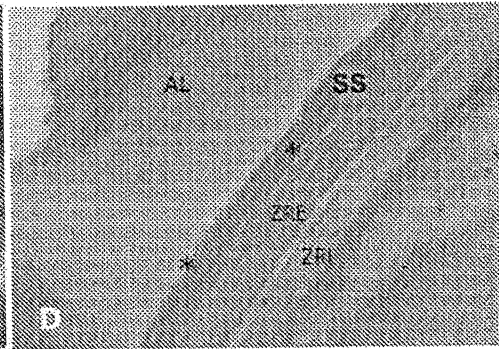


Fig.8D

9/9

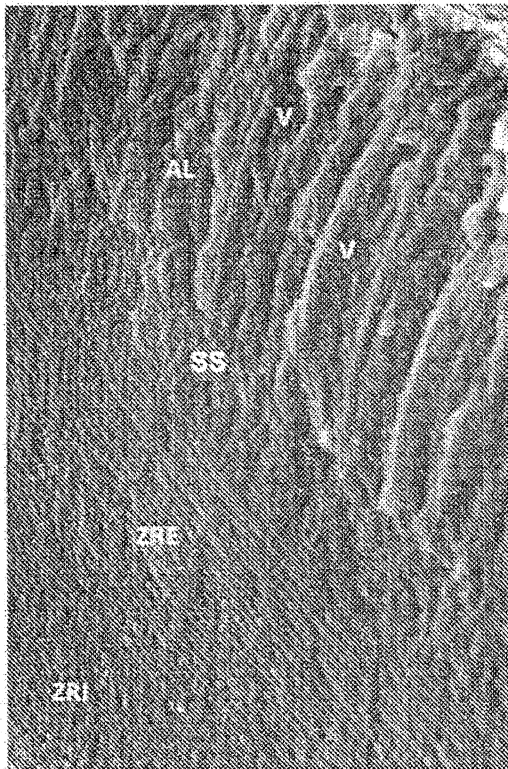


Fig.9A

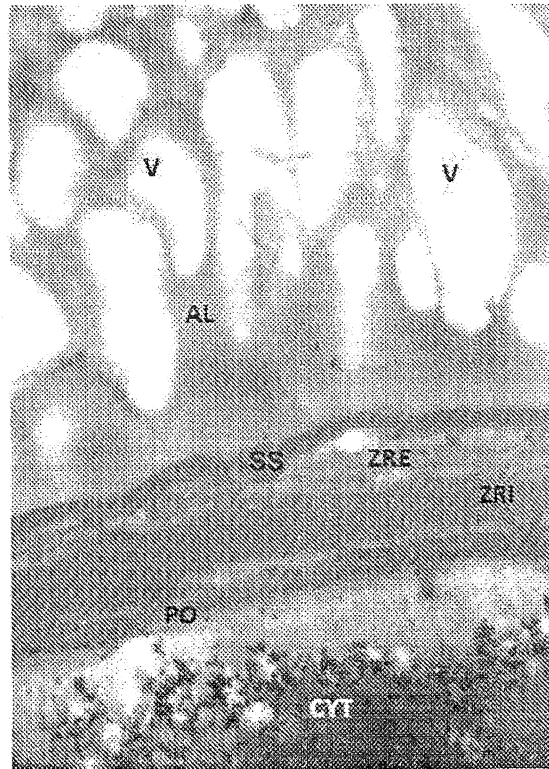


Fig.9B