



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0051379
(51)^{2022.01} C12P 21/00; C12R 1/89; C12P 7/64; (13) B
C12N 1/12
-

- (21) 1-2023-00739 (22) 22/03/2021
(86) PCT/KR2021/003477 22/03/2021 (87) WO 2022/124482 16/06/2022
(30) 10-2020-0169849 07/12/2020 KR
(45) 25/09/2025 450 (43) 25/09/2023 426A
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
(Ssangnim-dong) 330, Dongho-ro Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea
(72) SHIN, Won Sub (KR); JANG, Sung Hoon (KR); KIM, Ji Young (KR); CHOI, Jung
Woon (KR); KANG, Hae Won (KR); GWAK, Jun Seok (KR).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

- (54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SINH KHỐI CÓ NGUỒN GỐC TỪ VI TẢO
THRAUSTOCHYTRID VÀ SINH KHỐI CÓ NGUỒN GỐC TỪ VI TẢO
THRAUSTOCHYTRID ĐƠN

(21) 1-2023-00739

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sinh khối chứa protein và axit béo omega-3 từ vi tảo đơn, và sinh khối được sản xuất bằng phương pháp này, phương pháp sản xuất sinh khối theo một phương án cung cấp giai đoạn nuôi cấy liên tục với nguồn nitơ để cho phép sản xuất sinh khối có nguồn gốc từ vi tảo đơn có hàm lượng protein và axit béo omega-3 cao, và như vậy, sinh khối được sản xuất bằng phương pháp này có thể được sử dụng hiệu quả làm nguồn vi sinh vật đơn chứa protein và axit béo omega-3.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sinh khối chứa protein và axit béo omega-3 từ vi tảo đơn, và sinh khối được sản xuất bằng phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các axit béo chưa bão hòa là các axit béo có một hoặc nhiều liên kết đôi trong mạch axit béo, và khi các axit béo bao gồm hai hoặc nhiều liên kết đôi, chúng được gọi là các axit béo đa bão hòa (polyunsaturated fatty acid - PUFA). Trong số đó, axit docosahexaenoic (docosahexaenoic acid - DHA) và axit eicosapentaenoic (eicosapentaenoic acid - EPA) là các axit béo omega-3 đại diện, chúng là các axit béo cần thiết cho não, mô mắt và hệ thần kinh. Ngoài ra, chúng được biết là đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của hệ thần kinh, như thị lực và khả năng vận động của tế bào thần kinh ở trẻ sơ sinh, và ngăn ngừa bệnh tim mạch, và là các thành phần phong phú nhất trong lipit cấu trúc của não.

Về mặt công nghiệp, nguồn cung cấp chính các axit béo đa bão hòa như axit béo omega-3 là dầu cá được chiết xuất từ dầu của cá lưng xanh, và bột cá cũng được sử dụng rộng rãi làm nguồn protein trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên, do khó khăn trong việc cung cấp liên tục dầu cá và bột cá, là các sản phẩm khai thác hạn chế, v.v., nên cần phải phát triển nguồn thay thế axit béo omega-3 và protein mà có thể thay thế dầu cá và bột cá.

Gần đây, các nghiên cứu về việc sản xuất axit béo đa bão hòa bằng cách nuôi cấy vi tảo đang được tiến hành. Tuy nhiên, do các nghiên cứu tập trung vào việc nghiên cứu nhằm sản xuất dầu như các axit béo nên nghiên cứu về phương pháp có khả năng sản xuất protein có hàm lượng cao từ vi tảo là không đủ. Theo đó, các tác giả sáng chế đã hoàn thành

sáng chế bằng cách đưa ra phương pháp sản xuất sinh khối chứa axit béo omega-3 và hàm lượng cao của protein từ vi tảo đơn.

Tài liệu của tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

(Tài liệu sáng chế 1) Công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 2016/0208297 A1

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất sinh khối có nguồn gốc từ vi tảo *Thraustochytrid*, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy, trong môi trường, chủng đơn của vi tảo *Thraustochytrid*; và cung cấp liên tục nguồn nitơ trong quá trình nuôi cấy, và sinh khối có nguồn gốc từ vi tảo *Thraustochytrid* đơn, được sản xuất bằng phương pháp này.

Giải pháp kỹ thuật

Mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế cũng có thể được áp dụng cho mỗi phần mô tả và phương án khác. Nói cách khác, tất cả các kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không được hiểu là bị giới hạn ở phần mô tả cụ thể được mô tả dưới đây. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra hoặc xác nhận nhiều dạng tương đương với các khía cạnh cụ thể của sáng chế được mô tả trong sáng chế chỉ bằng cách sử dụng thí nghiệm thông thường. Hơn nữa, các dạng tương đương như vậy được dự định sẽ được bao gồm trong sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sinh khối có nguồn gốc từ vi tảo *Thraustochyrid*, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy, trong môi trường, chủng đơn của vi tảo *Thraustochyrid*; và cung cấp liên tục nguồn nitơ trong quá trình nuôi cấy.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “*Thraustochyrid*” dùng để chỉ vi tảo thuộc bộ *Thraustochytriales*. Vi tảo *Thraustochyrid* có thể là vi tảo thuộc *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp., hoặc *Thraustochytriidae* sp.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “*Thraustochytrium* sp.”, “*Schizochytrium* sp.”, “*Aurantiochytrium* sp.”, hoặc “*Thraustochytriidae* sp.” là một trong các chi thuộc bộ *Thraustochytriales*, họ *Thraustochytriaceae*, và có thể được sử dụng thay thế cho lần lượt các thuật ngữ “chi *Thraustochytrium*”, “chi *Schizochytrium*”, “chi *Aurantiochytrium*”, hoặc “chi *Thraustochytriidae*”.

Hơn nữa, thuật ngữ “vi tảo” dùng để chỉ các sinh vật sống chỉ có thể nhìn thấy qua kính hiển vi vì chúng không thể nhìn thấy bằng mắt thường, trong số các loài thực vật quang hợp bằng chất diệp lục, và sống trôi nổi trong nước và còn được gọi là thực vật phù du.

Theo một phương án cụ thể, vi tảo *Thraustochyrid* có thể là, ví dụ, vi tảo của *Thraustochytriidae* sp. CD01-6003, được lưu giữ với số truy cập KCTC14346BP, hoặc vi tảo của *Schizochytrium* sp. CD01-5004, được lưu giữ với số truy cập KCTC14345BP, nhưng không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sinh khối” dùng để chỉ sinh vật, như thực vật, động vật, vi sinh vật, v.v., mà có thể được sử dụng làm năng lượng hóa học, tức là nguồn năng lượng gồm năng lượng sinh học. Sinh khối về mặt sinh thái cũng đề cập đến khối lượng hoặc lượng năng lượng của sinh vật sống cụ thể thoát ra trong một đơn vị thời gian và không gian. Hơn nữa, mặc dù sinh khối chứa hợp chất được tiết ra bởi tế bào, nó cũng có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào và/hoặc các thành phần nội bào cũng như các nguyên liệu ngoại bào. Theo sáng chế, sinh khối có thể là chính vi tảo *Thraustochytrid*, sản phẩm nuôi cấy của nó, sản phẩm khô của nó, sản phẩm nghiền bột của nó, sản phẩm được sản xuất bằng cách nuôi cấy hoặc lên men vi tảo, hoặc có thể là sản phẩm ngưng tụ của sinh khối hoặc sản phẩm khô của sinh khối, nhưng sinh khối không giới hạn ở đó.

“Sản phẩm nuôi cấy” của vi tảo *Thraustochytrid* dùng để chỉ sản phẩm thu được bằng cách nuôi cấy vi tảo, và cụ thể, có thể là môi trường nuôi cấy chứa vi tảo hoặc môi trường nuôi cấy mà từ đó vi tảo được loại bỏ, nhưng không giới hạn ở đó. “Sản phẩm khô” của sản phẩm nuôi cấy của vi tảo *Thraustochytrid* dùng để chỉ sản phẩm thu được bằng cách loại bỏ hơi ẩm ra khỏi sản phẩm nuôi cấy của vi tảo, ví dụ, ở dạng thân tế bào khô của vi tảo, nhưng không giới hạn ở đó. Hơn nữa, “sản phẩm nghiền bột” của sản phẩm khô dùng để chỉ chung sản phẩm thu được bằng cách nghiền hành tinh sản phẩm khô mà thu được bằng cách loại bỏ hơi ẩm ra khỏi sản phẩm nuôi cấy của vi tảo, ví dụ, ở dạng bột của thân tế bào khô, nhưng không giới hạn ở đó.

Sản phẩm nuôi cấy của vi tảo *Thraustochytrid* có thể được sản xuất theo phương pháp nuôi cấy bao gồm bước cấy vi tảo trong vi tảo môi trường nuôi cấy, và cung cấp liên

tục nguồn nitơ trong quá trình nuôi cấy. Sản phẩm khô của sản phẩm nuôi cấy và sản phẩm nghiền bột của nó có thể được sản xuất theo phương pháp xử lý hoặc làm khô vi tảo hoặc môi trường nuôi cấy, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Đối với phương pháp sản xuất sinh khối, nguồn nitơ có thể được cung cấp từ ngay sau khi cấy vi tảo vào môi trường đến cuối quá trình nuôi cấy.

Hơn nữa, nguồn nitơ có thể được cung cấp liên tục sao cho tổng nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy là 300 ppm hoặc cao hơn. Ví dụ, nguồn nitơ có thể được cung cấp liên tục sao cho tổng nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy được duy trì trong khoảng từ 300 ppm đến 10.000 ppm, từ 300 ppm đến 8.000 ppm, từ 300 ppm đến 5.000 ppm, từ 300 ppm đến 3.000 ppm, từ 300 ppm đến 2.000 ppm, từ 300 ppm đến 1.500 ppm, từ 350 ppm đến 10.000 ppm, từ 350 ppm đến 8.000 ppm, từ 350 ppm đến 5.000 ppm, từ 350 ppm đến 3.000 ppm, từ 350 ppm đến 2.000 ppm, hoặc từ 350 ppm đến 1.500 ppm.

Đối với phương pháp sản xuất sinh khối, môi trường có thể chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ.

Đối với phương pháp sản xuất sinh khối, nguồn nitơ để cung cấp liên tục nguồn nitơ và nguồn nitơ chứa trong môi trường này có thể là i) một hoặc nhiều nguồn nitơ hữu cơ bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm chiết phẩm nấm men, chiết phẩm thịt bò, pepton, và trypton, hoặc ii) một hoặc nhiều nguồn nitơ vô cơ bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm amoni axetat, amoni nitrat, amoni clorua, amoni sulfat, natri nitrat, ure, mononatri glutamat (monosodium glutamate - MSG), và amoniac, nhưng nguồn nitơ không giới hạn ở đó, miễn là nó được sử dụng trong nuôi cấy vi tảo *Thraustochytrid*.

Việc cung cấp liên tục nguồn nitơ có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, cung cấp liên tục môi trường chứa nguồn nitơ vào môi trường nuôi cấy, hoặc cung cấp liên tục khí amoniac vào thiết bị lên men, nơi vi tảo được nuôi cấy, nhưng không giới hạn ở đó. Việc cung cấp liên tục môi trường chứa nguồn nitơ vào môi trường nuôi cấy có thể được thực hiện bằng, ví dụ, phương pháp nuôi cấy nạp liệu theo mẻ, trong đó môi trường được cung cấp gián đoạn, hoặc phương pháp nuôi cấy liên tục, trong đó môi trường được cung cấp liên tục.

Phương pháp có thể còn bao gồm bước cung cấp liên tục nguồn cacbon trong quá trình nuôi cấy. Việc cung cấp liên tục nguồn cacbon có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, cung cấp liên tục môi trường chứa nguồn cacbon vào môi trường nuôi cấy, nhưng không giới hạn ở đó. Việc cung cấp liên tục môi trường chứa nguồn cacbon vào môi trường nuôi cấy có thể được thực hiện bằng, ví dụ, phương pháp nuôi cấy nạp liệu theo mẻ, hoặc phương pháp nuôi cấy liên tục. Việc cung cấp liên tục nguồn cacbon có thể được thực hiện trong khi duy trì nồng độ của nguồn cacbon ở 5% (khối lượng/thể tích) hoặc thấp hơn trong môi trường nuôi cấy.

Nguồn cacbon để cung cấp liên tục nguồn cacbon và nguồn cacbon chứa trong môi trường này có thể là một hoặc nhiều nguồn bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, fructoza, maltoza, galactoza, mannoza, sucroza, arabinoza, xyloza, và glyxerol, nhưng nguồn cacbon không giới hạn ở đó, miễn là nó được sử dụng trong nuôi cấy vi tảo *Thraustochytrid*.

Môi trường có thể còn chứa nguồn phospho, các hợp chất vô cơ, axit amin và/hoặc vitamin thích hợp, v.v., được sử dụng để nuôi cấy vi tảo *Thraustochytrid*. Ví dụ, các nguồn phospho có thể bao gồm kali dihydro phosphat, dikali hydro phosphat, muối chứa natri tương ứng, v.v., riêng lẻ hoặc trong hỗn hợp, nhưng không giới hạn ở đó.

Việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong 95 giờ hoặc thấp hơn. Ví dụ, việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong 30 giờ đến 95 giờ, 35 giờ đến 95 giờ, 40 giờ đến 95 giờ, 45 giờ đến 95 giờ, 30 giờ đến 90 giờ, 35 giờ đến 90 giờ, 40 giờ đến 90 giờ, hoặc 45 giờ đến 90 giờ.

Việc nuôi cấy có thể được thực hiện ở 20°C đến 35°C. Ví dụ, việc nuôi cấy có thể được thực hiện ở 25°C đến 35°C, 20°C đến 30°C, hoặc 25°C đến 30°C, nhưng không giới hạn ở đó.

Hơn nữa, trong quá trình nuôi cấy, để duy trì trạng thái hiếu khí của sản phẩm nuôi cấy, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào sản phẩm nuôi cấy, hoặc để duy trì trạng thái kỵ khí hoặc không hiếu khí, khí có thể không được bơm vào, hoặc khí nitơ, hydro, hoặc cacbon dioxid có thể được bơm vào, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong khi điều chỉnh độ pH, ví dụ, thực hiện việc điều chỉnh độ pH để duy trì độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 9,0, độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 9,0, độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 9,0, độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 9,0, độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 8,0, độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0, độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 8,0, hoặc độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0

bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sulfuric), nhưng không giới hạn ở đó.

Phương pháp sản xuất sinh khối có thể còn bao gồm bước thu hồi sinh khối từ chủng, sản phẩm nuôi cấy của chủng, sản phẩm khô của sản phẩm nuôi cấy, hoặc sản phẩm nghiền bột của sản phẩm khô.

Việc thu hồi sinh khối có thể thu nhập sinh khối mong muốn bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, phương pháp ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, HPLC, v.v., có thể được sử dụng. Quá trình tinh chế cũng có thể bao gồm.

Sinh khối được sản xuất bằng phương pháp sản xuất nêu trên có thể chứa 50% khối lượng hoặc cao hơn của protein và 37% khối lượng hoặc thấp hơn của chất béo, tính theo tổng khối lượng của sinh khối. Sinh khối có thể chứa, ví dụ, từ 50% khối lượng đến 80% khối lượng, từ 50% khối lượng đến 75% khối lượng, từ 50% khối lượng đến 70% khối lượng, từ 55% khối lượng đến 80% khối lượng, từ 55% khối lượng đến 75% khối lượng, hoặc từ 55% khối lượng đến 70% khối lượng của protein; và từ 5% khối lượng đến 37% khối lượng, từ 5% khối lượng đến 35% khối lượng, từ 5% khối lượng đến 30% khối lượng, từ 5% khối lượng đến 25% khối lượng, từ 10% khối lượng đến 37% khối lượng, từ 10% khối lượng đến 35% khối lượng, từ 10% khối lượng đến 30% khối lượng, từ 10% khối lượng đến 25% khối lượng, từ 15% khối lượng đến 37% khối lượng, từ 15% khối lượng đến 35% khối lượng, từ 15% khối lượng đến 30% khối lượng, hoặc từ 15% khối lượng đến 25% khối lượng của chất béo.

Sinh khối được sản xuất bằng phương pháp sản xuất nêu trên có thể chứa 50% khối lượng hoặc cao hơn của protein và axit béo omega-3, tính theo tổng khối lượng của sinh khối. Axit béo omega-3 có thể chứa một hoặc nhiều axit docosahexaenoic (DHA) và axit eicosapentaenoic (EPA) bất kỳ.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “DHA” là chất bao gồm các axit béo đa bão hòa, được đại diện bởi Công thức $C_{22}H_{32}O_2$, và thuộc axit béo omega-3, cùng với axit α -linolenic (α -linolenic acid - ALA) và EPA, và tên thường gọi của nó là axit xervonic, và nó cũng có thể được viết tắt là 22:6 n-3.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “EPA” là chất bao gồm các axit béo đa bão hòa, được đại diện bởi Công thức $C_{20}H_{30}O_2$, và thuộc axit béo omega-3, cùng với ALA và DHA, và cũng có thể được viết tắt là 20:5 n-3.

Đối với sinh khối chứa 50% khối lượng hoặc cao hơn của protein và axit béo omega-3, sinh khối có thể chứa từ 3% khối lượng đến 30% khối lượng, từ 3% khối lượng đến 25% khối lượng, từ 3% khối lượng đến 20% khối lượng, hoặc từ 3% khối lượng đến 15% khối lượng của axit béo omega-3, tính theo tổng khối lượng của sinh khối. Hơn nữa, sinh khối có thể chứa từ 15% khối lượng đến 60% khối lượng, từ 15% khối lượng đến 55% khối lượng, hoặc từ 15% khối lượng đến 50% khối lượng của axit béo omega-3, tính theo khối lượng của tổng axit béo.

Các khía cạnh khác đề xuất sinh khối có nguồn gốc từ vi tảo *Thraustochytrid* đơn, được sản xuất bằng phương pháp sản xuất sinh khối, phương pháp này bao gồm bước nuôi

cây, trong môi trường, chủng vi tảo *Thraustochytrid* đơn; và cung cấp liên tục nguồn nito trong quá trình nuôi cấy.

Phương pháp sản xuất sinh khối là giống như được mô tả trên đây.

Sinh khối có thể chứa 50% khối lượng hoặc cao hơn của protein và 37% khối lượng hoặc thấp hơn của chất béo, tính theo tổng khối lượng của sinh khối. Sinh khối có thể chứa, ví dụ, từ 50% khối lượng đến 80% khối lượng, từ 50% khối lượng đến 75% khối lượng, từ 50% khối lượng đến 70% khối lượng, từ 55% khối lượng đến 80% khối lượng, từ 55% khối lượng đến 75% khối lượng, hoặc từ 55% khối lượng đến 70% khối lượng của protein; và từ 5% khối lượng đến 37% khối lượng, từ 5% khối lượng đến 35% khối lượng, từ 5% khối lượng đến 30% khối lượng, từ 5% khối lượng đến 25% khối lượng, từ 10% khối lượng đến 37% khối lượng, từ 10% khối lượng đến 35% khối lượng, từ 10% khối lượng đến 30% khối lượng, từ 10% khối lượng đến 25% khối lượng, từ 15% khối lượng đến 37% khối lượng, từ 15% khối lượng đến 35% khối lượng, từ 15% khối lượng đến 30% khối lượng, hoặc từ 15% khối lượng đến 25% khối lượng của chất béo.

Sinh khối có thể chứa, ví dụ, 50% khối lượng hoặc cao hơn của protein và axit béo omega-3, tính theo tổng khối lượng của sinh khối, trong đó axit béo omega-3 có thể chứa một hoặc nhiều DHA và EPA bất kỳ.

Đối với sinh khối chứa 50% khối lượng hoặc cao hơn của protein và axit béo omega-3, sinh khối có thể chứa từ 3% khối lượng đến 30% khối lượng, từ 3% khối lượng đến 25% khối lượng, từ 3% khối lượng đến 20% khối lượng, hoặc từ 3% khối lượng đến 15% khối lượng của axit béo omega-3, tính theo tổng khối lượng của sinh khối. Hơn nữa, sinh khối

có thể chứa từ 15% khối lượng đến 60% khối lượng, từ 15% khối lượng đến 55% khối lượng, hoặc từ 15% khối lượng đến 50% khối lượng của axit béo omega-3, tính theo khối lượng của tổng axit béo.

Các khía cạnh khác nữa đề xuất chế phẩm chứa sinh khối có nguồn gốc từ vi tảo *Thraustochytrid* đơn, hoặc sản phẩm ngưng tụ hoặc sản phẩm khô của sinh khối, được sản xuất bằng phương pháp sản xuất sinh khối, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy, trong môi trường, chủng vi tảo *Thraustochytrid* đơn; và cung cấp liên tục nguồn nitơ trong quá trình nuôi cấy.

Phương pháp sản xuất sinh khối và sinh khối có nguồn gốc từ vi tảo *Thraustochytrid* đơn là giống như được mô tả trên đây.

Chất cô đặc hoặc sản phẩm khô của sinh khối có thể được sản xuất theo phương pháp xử lý, cô đặc, hoặc làm khô sinh khối vi sinh, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chế phẩm có thể ở dạng dung dịch, bột, hoặc huyền phù, nhưng không giới hạn ở đó. Chế phẩm có thể là, ví dụ, chế phẩm thực phẩm, chế phẩm thức ăn chăn nuôi, hoặc chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chế phẩm thức ăn chăn nuôi” dùng để chỉ thức ăn chăn nuôi dùng cho động vật. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi dùng để chỉ nguyên liệu cung cấp chất dinh dưỡng hữu cơ hoặc vô cơ cần thiết để duy trì đời sống của động vật, hoặc sản xuất thịt, sữa, v.v. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể còn bao gồm các chất dinh dưỡng cần thiết để duy trì đời sống của động vật, hoặc sản xuất thịt, sữa, v.v. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể được chế biến thành nhiều loại thức ăn chăn nuôi khác nhau đã biết trong

lĩnh vực kỹ thuật này, và cụ thể là, có thể bao gồm thức ăn chăn nuôi cô đặc, thức ăn chăn nuôi thô, và/hoặc thức ăn chăn nuôi chuyên dụng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất phụ gia thức ăn chăn nuôi” dùng để chỉ nguyên liệu được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi nhằm mục đích tạo ra các hiệu quả khác nhau như bổ sung chất dinh dưỡng, ngăn ngừa giảm cân, cải thiện khả năng sử dụng xenluloza tiêu hóa trong thức ăn, cải thiện chất lượng sữa, ngăn ngừa sự rối loạn sinh sản, cải thiện tỷ lệ thụ thai, và ngăn ngừa căng thẳng do nhiệt độ cao trong mùa hè. Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế tương ứng với thức ăn chăn nuôi bổ sung theo luật quản lý thức ăn chăn nuôi, và có thể còn bao gồm chế phẩm khoáng, như natri hydro cacbonat, bentonit, magie oxit, khoáng chất phức hợp, v.v., chế phẩm khoáng là khoáng vi lượng, như kẽm, đồng, coban, selen, v.v., chế phẩm vitamin, như caroten, vitamin A, vitamin D, vitamin E, axit nicotinic, phức hợp vitamin B, v.v., chế phẩm axit amin được bảo vệ, như methionin, lysin, v.v., chế phẩm axit béo được bảo vệ, như muối canxi của axit béo, v.v., chế phẩm vi khuẩn sống, như vi khuẩn có lợi (vi khuẩn axit lactic), môi trường nuôi cấy nấm men, hoặc các sản phẩm lên men nấm mốc, v.v., chế phẩm nấm men, v.v.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chế phẩm thực phẩm” bao gồm tất cả các loại thực phẩm như thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung dinh dưỡng, thực phẩm có lợi cho sức khỏe và chất phụ gia thực phẩm. Chế phẩm thực phẩm nêu trên có thể được điều chế ở nhiều dạng khác nhau theo các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm các loại cây trồng, như lúa mì nghiền hoặc nghiền nhỏ, yến mạch, lúa mạch, ngô và gạo; thức ăn chăn nuôi chứa protein thực vật, ví dụ, thức ăn chăn nuôi chủ yếu chứa đậu nành và hoa hướng dương; thức ăn chăn nuôi chứa protein động vật, như bột máu, bột thịt, bột xương và bột cá; đường và các sản phẩm từ sữa, ví dụ, các thành phần khô khác nhau bao gồm bột sữa và bột whey, và có thể còn bao gồm chất bổ sung dinh dưỡng, chất tăng cường tiêu hóa và hấp thu, chất thúc đẩy sinh trưởng, v.v.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho động vật một mình hoặc kết hợp với các chất phụ gia thức ăn chăn nuôi khác trong chất mang ăn được. Hơn nữa, chế phẩm có thể là chất bón thúc, có thể được trộn trực tiếp với thức ăn chăn nuôi, hoặc có thể được dùng dễ dàng cho động vật như các dạng liều lượng dùng qua đường miệng riêng biệt với thức ăn chăn nuôi. Khi được dùng riêng biệt với thức ăn chăn nuôi, chế phẩm có thể được kết hợp với chất mang ăn được được dụng và được điều chế thành chế phẩm giải phóng ngay hoặc chế phẩm giải phóng kéo dài, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất mang ăn được có thể là dạng rắn hoặc lỏng, ví dụ, tinh bột ngô, đường sữa, sucroza, vảy đậu nành, dầu đậu phộng, dầu ô liu, dầu mè, và propylen glycol. Khi chất mang rắn được sử dụng, chế phẩm có thể ở dạng viên nén, viên nang, bột, viên ngậm dẹp hoặc viên ngậm hình thoi, hoặc có thể là chất bón thúc không phân tán. Khi chất mang lỏng được sử dụng, chế phẩm có thể có dạng viên nang gelatin mềm, xi-rô, hỗn dịch, nhũ tương hoặc dung dịch.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa, ví dụ, chất bảo quản, chất làm ổn định, chất thấm ướt, chất nhũ hóa, chất bảo quản lạnh, tá dược, v.v. Chất bảo quản lạnh có thể là một

hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, trehaloza, maltodextrin, sữa bột gầy và tinh bột.

Chất bảo quản, chất làm ổn định, hoặc tá dược có thể chứa trong chế phẩm với lượng hữu hiệu đủ để làm giảm sự hư hỏng của vi tảo *Thraustochytrid* chứa trong chế phẩm. Hơn nữa, chất bảo quản lạnh có thể chứa trong chế phẩm với lượng hữu hiệu đủ để làm giảm sự hư hỏng của vi tảo *Thraustochytrid* chứa trong chế phẩm khi chế phẩm ở trạng thái khô.

Chế phẩm có thể được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi bằng cách nhúng, phun hoặc trộn để sử dụng.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được áp dụng cho chế độ ăn uống của các động vật khác nhau như động vật có vú, chim, cá, động vật giáp xác, động vật chân đầu, bò sát và lưỡng cư. Ví dụ, động vật có vú có thể bao gồm lợn, bò, cừu, dê, động vật gặm nhấm trong phòng thí nghiệm, động vật nuôi, v.v., chim có thể bao gồm gia cầm, có thể bao gồm gà, gà tây, vịt, ngỗng, gà lôi, chim cút, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Hơn nữa, cá có thể bao gồm cá nuôi thương phẩm và cá giống, cá cảnh, v.v., và các loài giáp xác có thể bao gồm tôm, hàu, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Chế phẩm cũng có thể được áp dụng để làm thức ăn cho luân trùng, là một loài động vật phù du.

Hiệu quả có lợi

Theo phương pháp sản xuất sinh khối theo một khía cạnh, có thể sản xuất sinh khối có nguồn gốc từ vi tảo đơn, chứa hàm lượng cao của protein và axit béo omega-3, bằng cách cung cấp liên tục nguồn nitơ trong quy trình nuôi cấy. Sinh khối được sản xuất bằng

phương pháp này có thể được sử dụng làm nguồn vi sinh vật duy nhất của protein và axit béo omega-3.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn có dựa vào các phương án được lấy làm ví dụ. Tuy nhiên, các phương án được lấy làm ví dụ này chỉ nhằm minh họa cho một hoặc nhiều phương án cụ thể, và phạm vi của sáng chế được giới hạn ở các phương án được lấy làm ví dụ này.

Ví dụ 1. Kiểm tra lượng sản xuất của chất béo và protein theo phương pháp nuôi cấy vi tảo của *Thraustochytriidae* sp.

1-1. Chuẩn bị và gieo mầm môi trường nuôi cấy chứa vi tảo

Vi tảo của *Thraustochytriidae* sp. CD01-6003 (Số truy cập: KCTC14346BP) được gieo mầm trong môi trường MJW01 vô trùng (30 g/L glucoza, 3,0 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L Na_2SO_4 , 1,0 g/L NaCl , 9,0 g/L chiết phẩm nấm men, 1,0 g/L $\text{MSG} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L NaNO_3 , 0,1 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L K_2HPO_4 , 0,5 g/L CaCl_2 , và 10 mL/L dung dịch phối trộn vitamin), và được nuôi cấy trong bình dung tích 250 mL trong các điều kiện từ 20°C đến 35°C và từ 100 vòng/phút đến 300 vòng/phút trong 10 giờ đến 30 giờ.

1-2. Môi trường nuôi cấy chính

1-2-1. Ví dụ so sánh (1)

Môi trường nuôi cấy mầm được chuẩn bị trong Ví dụ 1-1 được phân tán trong thiết bị lên men dung tích 5 L chứa môi trường MJW01 vô trùng được bổ sung 6 g/L amoni sulfat ($(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$) và 5 g/L chiết phẩm nấm men làm nguồn nitơ, và được nuôi cấy trong

các điều kiện từ 20°C đến 35°C, từ 100 vòng/phút đến 500 vòng/phút, và từ 0,5 vvm đến 1,5 vvm trong tổng 101 giờ cho đến khi thể tích của môi trường nuôi cấy trong thiết bị lên men đạt đến 2,8 L. Ngay sau khi bắt đầu nuôi cấy với nguồn nitơ bổ sung, khí amoniac được cung cấp liên tục vào thiết bị lên men trong 14 giờ sao cho tổng nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy là 300 ppm hoặc cao hơn, và sau đó việc cung cấp khí amoniac được dừng lại. Trong toàn bộ quy trình nuôi cấy, nguyên liệu chứa nguồn cacbon được cung cấp liên tục sao cho nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường nuôi cấy được duy trì dưới 5%.

1-2-2. Ví dụ (1)

Việc nuôi cấy được thực hiện theo cách giống như trong mục 1-2-1 trong tổng 86 giờ, chỉ khác là trong toàn bộ quy trình nuôi cấy, khí amoniac được cung cấp liên tục vào thiết bị lên men sao cho tổng nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy là 300 ppm hoặc cao hơn.

1-2-3. Ví dụ (2)

Việc nuôi cấy được thực hiện theo cách giống như trong mục 1-2-1 trong tổng 75 giờ, chỉ khác là trong toàn bộ quy trình nuôi cấy, khí amoniac được cung cấp liên tục vào thiết bị lên men sao cho tổng nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy là 300 ppm hoặc cao hơn, và chỉ có 18 g/L amoni sulfat dưới dạng nguồn nitơ được bổ sung vào môi trường MJW01 vô trùng.

1-2-4. Ví dụ (3)

Việc nuôi cấy được thực hiện theo cách giống như trong mục 1-2-1 trong tổng 55 giờ, chỉ khác là trong toàn bộ quy trình nuôi cấy, khí amoniac được cung cấp liên tục vào thiết bị lên men sao cho tổng nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy là 300 ppm hoặc cao hơn, và 10 g/L amoni sulfat dưới dạng nguồn nitơ được bổ sung tiếp vào thức ăn chăn nuôi chứa nguồn cacbon.

1-2-5. Ví dụ (4)

Việc nuôi cấy được thực hiện theo cách giống như trong mục 1-2-1 trong tổng 92 giờ, chỉ khác là trong toàn bộ quy trình nuôi cấy, khí amoniac được cung cấp liên tục vào thiết bị lên men sao cho tổng nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy là 300 ppm hoặc cao hơn, chỉ có 6 g/L amoni sulfat dưới dạng nguồn nitơ được bổ sung vào môi trường MJW01 vô trùng, và 12 g/L amoni sulfat dưới dạng nguồn nitơ được bổ sung tiếp vào thức ăn chăn nuôi chứa nguồn cacbon.

1-3. Phân tích hàm lượng chất béo

Mỗi môi trường nuôi cấy vi tảo đã nuôi cấy trong mục 1-2-1 đến 1-2-5 được thu thập và ly tâm. Sau đó, các tế bào thu được được rửa bằng PBS ba lần, và làm khô ở 60°C trong 16 giờ. Phản ứng thủy phân được để ở 80°C bằng cách bổ sung dung dịch axit clohydric 8,3 M vào 2 g tế bào khô. Sau đó, 30 mL etyl ete và 20 mL ete dầu mỏ được bổ sung vào sản phẩm phản ứng, và trộn trong 30 giây và việc ly tâm được thực hiện lặp lại ba lần hoặc nhiều hơn. Lớp dung môi đã tách được chuyển vào bình đáy tròn đã được cân trước, và sau đó được làm khô trong đồ chứa mà từ đó dung môi và hơi ẩm còn lại được loại bỏ, thông qua việc thổi khí nitơ (N₂). Tổng hàm lượng dầu được tính toán bằng cách

đo khối lượng của dầu còn lại sau khi làm khô dung môi. Hàm lượng của axit béo omega-3 (DHA và EPA) trong dầu được đo bằng sắc ký khí sau khi được xử lý sơ bộ bằng NaOH metanol 0,5 N và trifloboran metanol 14% ($\text{BF}_3\text{-MeOH}$).

Bảng 1

Điều kiện	Tổng axit béo/sinh khối (%)	EPA/tổng axit béo (%)	DHA/tổng axit béo (%)	Omega-3/tổng axit béo (%)	EPA/sinh khối (%)	DHA/sinh khối (%)	Omega-3/sinh khối (%)
Ví dụ so sánh (1)	43,42	0,49	10,06	10,55	0,21	4,37	4,58
Ví dụ (1)	28,90	2,96	24,39	27,35	0,86	7,05	7,90
Ví dụ (2)	14,97	2,54	26,58	29,12	0,38	3,98	4,36
Ví dụ (3)	26,13	0,86	16,75	17,61	0,22	4,38	4,60
Ví dụ (4)	17,91	2,71	36,12	38,83	0,49	6,47	6,95

Kết quả là, như được thể hiện trong Bảng 1, hàm lượng sinh khối của tổng axit béo (TFA) được giảm nhiều hơn trong các Ví dụ (1) đến (4), trong đó việc nuôi cấy được thực hiện trong khi cung cấp liên tục nguồn nitơ, khi so sánh với Ví dụ so sánh (1). Tuy nhiên, hàm lượng EPA, DHA, và omega-3 trong tổng axit béo trong các Ví dụ (1) đến (4) là tương đương hoặc cao hơn so với hàm lượng này của Ví dụ so sánh (1).

1-4. Phân tích hàm lượng protein

Đối với mỗi 0,5 g đến 1 g tế bào khô thu được theo cách giống như trong mục 1-3, hàm lượng nitơ trong mẫu được phân tích định lượng bằng cách sử dụng thiết bị phân tích nguyên tố. Tỷ lệ khối lượng (% TN) của nitơ có mặt trong mỗi mẫu được nhân với 6,25 và được tính là tổng hàm lượng protein trong mẫu.

Bảng 2

Điều kiện	Tổng protein/sinh khối (%)
Ví dụ so sánh (1)	Lên đến khoảng 43,58 *
Ví dụ (1)	Lên đến khoảng 58,10 *
Ví dụ (2)	55,7
Ví dụ (3)	58,0
Ví dụ (4)	57,5

(* : ước tính)

Kết quả là, như được thể hiện trong Bảng 2, tất cả các Ví dụ (2) đến (4) đã cho thấy tổng hàm lượng protein là 55% hoặc cao hơn, và Ví dụ (1) đã cho thấy tổng hàm lượng axit béo là 28,9%, như được đo trong mục 1-3. Xem xét rằng sinh khối vi tảo nói chung có hàm lượng hydrat cacbon nằm trong khoảng từ 2% đến khoảng 3%, và hàm lượng tro nằm trong khoảng từ 8% đến khoảng 10%, có thể ước tính được rằng tổng hàm lượng protein có thể đạt lên đến khoảng 58,10%. Ngoài ra, Ví dụ so sánh (1) đã cho thấy tổng hàm lượng axit béo là 43,42%, như được đo trong mục 1-3, ước tính rằng tổng hàm lượng protein tối đa chỉ là khoảng 43,58%. Các kết quả này đã xác nhận rằng khi vi tảo được nuôi cấy trong điều kiện cung cấp liên tục nguồn nitơ, protein có thể được tạo ra với hàm lượng cao là 55% hoặc cao hơn.

Ví dụ 2. Kiểm tra lượng sản xuất của chất béo và protein theo phương pháp nuôi cấy vi tảo của *Schizochytrium* sp.

2-1. Chuẩn bị và gieo mầm môi trường nuôi cấy của vi tảo

Gieo mầm môi trường nuôi cấy của vi tảo của *Schizochytrium* sp. CD01-5004 (Số truy cập: KCTC14345BP) được thực hiện theo cách giống như trong Ví dụ 1-1.

2-2. Môi trường nuôi cấy chính

2-2-1. Ví dụ so sánh (2)

Môi trường nuôi cấy mầm được chuẩn bị trong Ví dụ 2-1 được phân tán trong thiết bị lên men dung tích 5 L chứa môi trường MJW01 vô trùng, và được nuôi cấy trong các điều kiện từ 20°C đến 35°C, 100 vòng/phút đến 500 vòng/phút, và 0,5 vvm đến 1,5 vvm trong tổng 105 giờ cho đến khi thể tích của môi trường nuôi cấy trong thiết bị lên men đạt

đến 2,8 L. Ngay sau khi bắt đầu nuôi cấy với nguồn nitơ bổ sung, khí amoniac được cung cấp liên tục vào thiết bị lên men trong 10 giờ sao cho tổng nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy là 300 ppm hoặc cao hơn, và sau đó việc cung cấp khí amoniac được dừng lại. Trong toàn bộ quy trình nuôi cấy, nguyên liệu chứa nguồn cacbon được cung cấp liên tục sao cho nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường nuôi cấy được duy trì dưới 5%.

2-2-2. Ví dụ (5)

Việc nuôi cấy được thực hiện theo cách giống như trong mục 2-2-1 trong tổng 84 giờ, chỉ khác là trong toàn bộ quy trình nuôi cấy, khí amoniac được cung cấp liên tục vào thiết bị lên men sao cho tổng nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy là 300 ppm hoặc cao hơn, và 6 g/L amoni sulfat và 10 g/L chiết phẩm nấm men làm nguồn nitơ được bổ sung tiếp vào môi trường MJW01 vô trùng.

2-2-3. Ví dụ (6)

Việc nuôi cấy được thực hiện theo cách giống như trong mục 2-2-2, chỉ khác là việc nuôi cấy được thực hiện trong tổng 53 giờ.

2-2-4. Ví dụ (7) và (8)

Việc nuôi cấy được thực hiện theo cách giống như trong mục 2-2-2, chỉ khác là việc nuôi cấy được thực hiện trong tổng 50 giờ.

2-2-5. Ví dụ (9)

Việc nuôi cấy được thực hiện theo cách giống như trong mục 2-2-2, chỉ khác là việc nuôi cấy được thực hiện trong tổng 47 giờ.

2-2-6. Ví dụ (10)

Việc nuôi cấy được thực hiện theo cách giống như trong mục 2-2-2 trong tổng 47 giờ, chỉ khác là 5 g/L MSG làm nguồn nitơ được bổ sung tiếp vào môi trường MJW01 vô trùng.

2-3. Phân tích hàm lượng chất béo

Mỗi môi trường nuôi cấy vi tảo đã nuôi cấy trong mục 2-2-1 đến 2-2-6 được thu thập, và hàm lượng chất béo của chúng được phân tích theo cách giống như trong Ví dụ 1-3.

Bảng 3

Điều kiện	Tổng axit béo/sinh khối (%)	EPA/tổng axit béo (%)	DHA/tổng axit béo (%)	Omega-3/tổng axit béo (%)	EPA/sinh khối (%)	DHA/sinh khối (%)	Omega-3/sinh khối (%)
Ví dụ so sánh (2)	41,91	2,53	39,18	41,71	1,06	16,42	17,48
Ví dụ (5)	24,39	4,25	42,92	47,17	1,04	10,47	11,50
Ví dụ (6)	20,12	3,90	37,81	41,70	0,78	7,60	8,39
Ví dụ (7)	20,95	3,68	39,54	43,22	0,77	8,28	9,05
Ví dụ (8)	19,99	4,50	38,84	43,34	0,90	7,76	8,66
Ví dụ (9)	24,90	3,98	39,27	43,25	0,99	9,78	10,77
Ví dụ (10)	25,04	5,07	42,02	47,09	1,27	10,52	11,79

Kết quả là, như được thể hiện trong Bảng 3, hàm lượng sinh khối của tổng axit béo (TFA) được giảm nhiều hơn trong các Ví dụ (5) đến (10), trong đó việc nuôi cấy được thực hiện trong khi cung cấp liên tục nguồn nitơ, khi so sánh với Ví dụ so sánh (2). Tuy nhiên, hàm lượng EPA, DHA, và omega-3 trong tổng axit béo trong các Ví dụ (5) đến (10) là tương đương hoặc cao hơn so với hàm lượng này của Ví dụ so sánh (2).

2-4. Phân tích hàm lượng protein

Mỗi môi trường nuôi cấy vi tảo đã nuôi cấy trong mục 2-2-1 đến 2-2-6 được thu thập, và hàm lượng protein của chúng được phân tích theo cách giống như trong Ví dụ 1-4.

Bảng 4

Điều kiện	Tổng protein/sinh khối (%)
Ví dụ so sánh (2)	Lên đến khoảng 45,1*
Ví dụ (5)	62,4
Ví dụ (6)	64,9
Ví dụ (7)	65,6
Ví dụ (8)	66,3
Ví dụ (9)	60,7
Ví dụ (10)	58,7

(* : ước tính)

Kết quả là, như được thể hiện trong Bảng 4, tất cả các Ví dụ (5) đến (10) đã cho thấy tổng hàm lượng protein là 58% hoặc cao hơn, và Ví dụ so sánh (2) đã cho thấy tổng hàm lượng axit béo là 41,91%, như được đo trong mục 2-3. Xem xét rằng sinh khối vi tảo nói chung có hàm lượng hydrat cacbon nằm trong khoảng từ 2% đến khoảng 3%, và hàm lượng tro nằm trong khoảng từ 8% đến khoảng 10%, có thể ước tính được rằng tổng hàm lượng protein có thể đạt lên đến khoảng 45,1%. Các kết quả này đã xác nhận rằng khi vi tảo được nuôi cấy trong điều kiện cung cấp liên tục nguồn nitơ, protein có thể được tạo ra với hàm lượng cao là 58% hoặc cao hơn.

2-5. Phân tích hàm lượng axit amin và chế phẩm

Môi trường nuôi cấy vi tảo của Ví dụ (10) đã nuôi cấy trong mục 2-2-6 được thu thập, và tế bào khô thu được theo cách tương tự như trong mục 1-3, và 0,5 g đến 1 g tế bào khô được đưa vào thủy phân bằng axit. Sau đó, chất thu được được đưa vào sắc ký lỏng, và tổng hàm lượng axit amin và hàm lượng của các axit amin riêng lẻ được phân tích. Nồng độ của các axit amin riêng lẻ trong mẫu được chuẩn hóa đến lượng tế bào khô được sử dụng để tính toán hàm lượng (%) của các axit amin riêng lẻ tính theo tổng khối lượng của tế bào khô, và tổng hàm lượng axit amin (%) tính theo tổng khối lượng của tế bào khô được tính toán bằng cách tính tổng hàm lượng của tất cả các axit amin được phát hiện.

Bảng 5

	Hàm lượng trong sinh khối (%)		Hàm lượng trong sinh khối (%)		Hàm lượng trong sinh khối (%)
Tổng axit amin	43,09	Alanin	2,50	Tyrosin	1,24
Axit aspartic	3,62	Xystein	0,56	Phenylalanin	1,63
Threonin	1,80	Valin	2,06	Lysin	2,27
Serin	2,02	Methionin	0,82	Histidin	0,78
Glutamat	12,47	IsoLeuxin	1,36	Arginin	6,11
Glyxin	0,00	Leuxin	2,77	Prolin	1,07

Bảng 6

	Hàm lượng trong tổng axit amin (%)		Hàm lượng trong tổng axit amin (%)		Hàm lượng trong tổng axit amin (%)
Tổng axit amin	100,00	Alanin	5,81	Tyrosin	2,88

Axit aspartic	8,39	Xystein	1,30	Phenylalanin	3,79
Threonin	4,18	Valin	4,78	Lysin	5,27
Serin	4,69	Methionin	1,90	Histidin	1,82
Glutamat	28,93	IsoLeuxin	3,15	Arginin	14,19
Glyxin	0,00	Leuxin	6,43	Prolin	2,48

Kết quả là, như được thể hiện trong các Bảng 5 và 6, Ví dụ (10), trong đó vi tảo được nuôi cấy trong các điều kiện cung cấp liên tục nguồn nitơ, đã cho thấy tổng hàm lượng protein là 43,09% trong sinh khối, và có hàm lượng glutamat cao nhất giữa các axit amin riêng lẻ, và tỷ lệ hàm lượng giữa glutamat và arginin của nó là 2,04.

Cần hiểu rằng các phương án được mô tả ở đây chỉ nên được xem xét theo nghĩa mô tả và không nhằm mục đích giới hạn. Các phần mô tả về các dấu hiệu hoặc khía cạnh trong mỗi phương án thường được xem là có sẵn cho các dấu hiệu hoặc khía cạnh tương tự khác trong các phương án khác. Mặc dù một hoặc nhiều phương án đã được mô tả có dựa vào các hình vẽ, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các thay đổi khác nhau về hình thức và chi tiết có thể được thực hiện trong đó mà không đi chệch khỏi tinh thần và phạm vi của bản mô tả như được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất sinh khối có nguồn gốc từ vi tảo *Thraustochytrid*, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy, chủng vi tảo *Thraustochytrid* đơn trong môi trường chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ; và

cung cấp liên tục nguồn nitơ bổ sung trong quá trình nuôi cấy sao cho tổng nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy là 300 ppm hoặc cao hơn,

trong đó nguồn nitơ được cung cấp từ ngay sau khi cấy vi tảo vào môi trường đến cuối quá trình nuôi cấy.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nguồn nitơ là i) một hoặc nhiều nguồn nitơ hữu cơ bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm chiết phẩm nấm men, chiết phẩm thịt bò, pepton, và trypton, hoặc ii) một hoặc nhiều nguồn nitơ vô cơ bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm amoni axetat, amoni nitrat, amoni clorua, amoni sulfat, natri nitrat, ure, mononatri glutamat (MSG), và amoniac.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nguồn cacbon là một hoặc nhiều nguồn bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, fructoza, maltoza, galactoza, mannoza, sucroza, arabinoza, xyloza, và glyxerol.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi tảo *Thraustochytrid* là vi tảo của *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp., hoặc *Thraustochytriidae* sp.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu hồi sinh khối từ chủng, sản phẩm nuôi cấy của chủng, sản phẩm khô của sản phẩm nuôi cấy, hoặc sản phẩm nghiền bột của sản phẩm khô.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sinh khối chứa 50% khối lượng hoặc cao hơn của protein và 37% khối lượng hoặc thấp hơn của chất béo, tính theo tổng khối lượng của sinh khối.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sinh khối chứa 50% khối lượng hoặc cao hơn của protein, và axit béo omega-3, tính theo tổng khối lượng của sinh khối.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó axit béo omega-3 bao gồm một hoặc nhiều axit docosahexaenoic (DHA) và axit eicosapentaenoic (EPA) bất kỳ.
9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó sinh khối chứa trong khoảng từ 15% khối lượng đến 60% khối lượng của axit béo omega-3, tính theo khối lượng của tổng axit béo.
10. Sinh khối có nguồn gốc từ vi tảo *Thraustochytrid* đơn, được sản xuất bằng phương pháp sản xuất sinh khối theo điểm 1.
11. Sinh khối theo điểm 10, trong đó sinh khối chứa 50% khối lượng hoặc cao hơn của protein và 37% khối lượng hoặc thấp hơn của chất béo, tính theo tổng khối lượng của sinh khối.
12. Sinh khối theo điểm 10, trong đó sinh khối chứa 50% khối lượng hoặc cao hơn của protein và axit béo omega-3, tính theo tổng khối lượng của sinh khối.
13. Sinh khối theo điểm 12, trong đó axit béo omega-3 bao gồm một hoặc nhiều axit docosahexaenoic và axit eicosapentaenoic bất kỳ.
14. Sinh khối theo điểm 12, trong đó sinh khối chứa trong khoảng từ 15% khối lượng đến 60% khối lượng của axit béo omega-3, tính theo khối lượng của tổng axit béo.