



(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) 
1-0021023

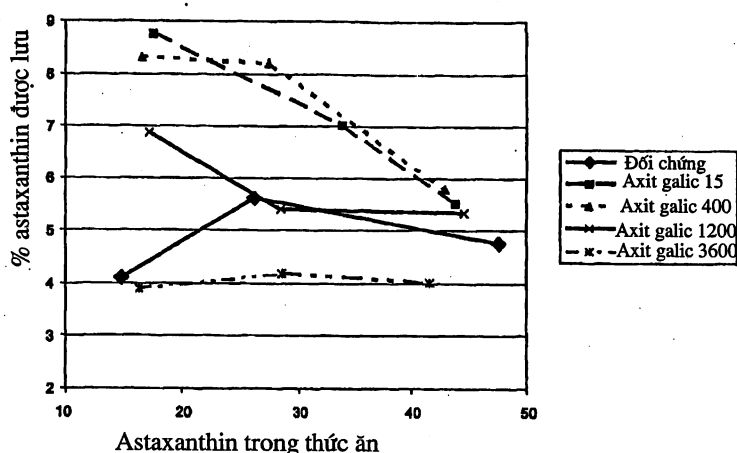
(51)⁷ A23K 20/179, 50/80

(13) B

- (21) 1-2011-03326 (22) 24.06.2010
(86) PCT/NO2010/000248 24.06.2010 (87) WO2010/151147 29.12.2010
(30) 20092428 25.06.2009 NO
(45) 27.05.2019 374 (43) 25.04.2012 289
(73) Nutreco IP Assets B.V. (NL)
Veerstraat 38, NL-5831 JN Boxmeer, The Netherlands
(72) KOPPE, Wolfgang, M. (DE), MOLLER, Niels, Peter (NO), BAARDSEN, Gunvor,
Kristin, Lien (NO)
(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) THỨC ĂN CHO CÁ DẠNG ÉP ĐÙN VÀ PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN SỰ TÍCH TỤ MÀU TRONG THỊT CÁ HỒI

(57) Sáng chế đề cập đến thức ăn cho cá dạng ép đùn chứa lượng nhỏ hơn 10% khối lượng tro, nhiều hơn 20% khối lượng chất béo, nhỏ hơn 20% khối lượng nguyên liệu thô chứa tinh bột, và chất màu được chọn từ nhóm các carotenoit, trong đó thức ăn cho cá này chứa ít nhất một chất chống oxy hóa hòa tan trong nước được chọn từ nhóm bao gồm axit hydroxyxinamic và hydrobenzoic, và chứa tối 40mg chất màu trong 1kg thức ăn, chất màu này được chọn từ nhóm bao gồm astaxanthin và canthaxanthin. Phương pháp cải thiện sự tích tụ màu trong thịt cá hồi bằng cách cho cá ăn thức ăn này cũng được đề xuất.



% astaxanthin được lưu giữ ở các mức astaxanthin và axit galic (ppm) khác nhau trong thức ăn

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thức ăn cho cá hồi. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến thức ăn chứa chất chống oxy hoá hoà tan trong nước được chọn từ nhóm bao gồm axit galic và axit syringic, là các chất có tác dụng làm tăng sự tích tụ màu trong thịt cá hồi.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cá hồi là loài duy nhất trong số các loài cá có khả năng tích tụ carotenoid trong thịt, làm cho bắp thịt của loài cá này có màu đỏ. Cá hồi là loài cá thuộc họ Salmonidae. Ví dụ về loài cá này như cá hồi (*Salmo salar*) và cá hồi biển (*S. trutta trutta*) và cá hồi đại dương như cá hồi bạc (coho) (*Oncorhynchus kisutch*), cá hồi Chinook (*O. tshawytscha*), cá hồi lưng gù (*O. gorbuscha*), cá hồi chum (*O. keta*), cá hồi đỏ (sockeye) (*O. nerka*), cá hồi cầu vòng (*O. mykiss*). Trong cá hồi tự nhiên có hợp chất astaxanthin (3,3'-đihydroxy β,β -caroten-4,4'-đion) thuộc nhóm carotenoid là hợp chất chính khiến cho thịt cá hồi có màu hơi đỏ.

Cá hồi nuôi, bao gồm cá hồi đại dương, cá hồi cầu vòng và cá hồi được cho ăn thức ăn có bổ sung chất màu tự nhiên như carotenoid, cụ thể là astaxanthin nhưng cũng có thể là thaxanthin, hoặc hỗn hợp của hai chất màu này. Cá hồi nuôi đã trở thành thực phẩm thông dụng được tiêu thụ ở nhiều quốc gia. Người tiêu dùng sử dụng màu thịt cá để đánh giá chất lượng sản phẩm. Có mối liên hệ, không tuyến tính, giữa lượng astaxanthin trong thịt cá và cường độ màu và độ bão hoà màu của thịt. Lượng lớn astaxanthin, ví dụ, 6-8mg astaxanthin trên một kg thịt (ppm), sẽ tạo ra màu

đỏ mạnh, trong khi đó lượng nhỏ astaxanthin, ví dụ, 3-4ppm, sẽ tạo ra thịt có màu đỏ nhạt và kém hấp dẫn.

Lượng astaxanthin trong thịt cá hồi là một thông số chất lượng quan trọng đối với người nuôi cá hồi. Như được đề cập, astaxanthin được sử dụng làm chất phụ gia trong thức ăn cho cá. Astaxanthin là một chất phụ gia tương đối đắt tiền, nó chiếm tới 10-20% tổng chi phí của nguyên liệu thô (Torrissen, O. J. (1995), Strategies for salmonid pigmentation, J Appl. Ichtyol, 11: 276-281).

Mức độ tích tụ, giữ lại hoặc tạo sắc tố có cùng nghĩa ở đây, tức là lượng astaxanthin đo được trong bắp thịt cá hồi. Phương pháp hoá học cho kết quả là số mg astaxanthin trong 1kg bắp thịt cá (khối lượng ướt). Phương pháp này cũng có thể cho kết quả là ppm.

Thấy rằng chỉ tới 15% lượng astaxanthin bổ sung vào trong thức ăn là thực sự được tích tụ trong thịt cá (Torrissen, O. J. 1989, Pigmentation of salmonids: Interactions of astaxanthin and canthaxanthin on pigmentation deposition in rainbow trout, Aquaculture 79: 363-374). Một vấn đề tồn tại từ lâu là làm thế nào để có thể tăng mức tích tụ astaxanthin trong bắp thịt cá hồi, vì chỉ cần mức tăng nhỏ là có thể tiết kiệm đáng kể chi phí mua thức ăn.

Đã có thông báo rằng astaxanthin là cần thiết cho việc sinh tồn và phát triển của cá hồi nhỏ (*S. salar*) và astaxanthin cần được bổ sung vào tất cả các loại thức ăn cho cá với lượng ít nhất là 10mg/kg thức ăn (Torrissen and Christiansen, 1995, Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed different dietary levels of astaxanthin, First feeding fry, Aquaculture Nutrition 1: 189-198). Để tăng lượng antaxanthin trong bắp thịt, điều cần thiết là thức ăn cho cá phải chứa ít nhất 15mg-25mg astaxanthin/kg thức ăn, phụ thuộc vào nhiều yếu tố, kể cả điều kiện nuôi. Thức ăn thương mại cho cá hồi chứa 20mg-70mg astaxanthin/kg thức ăn. Một số cơ quan quản lý

đã quy định giới hạn trên của astaxanthin bổ sung vào thức ăn cho cá là 100ppm.

Trong cá hồi nuôi thương mại, thường áp dụng mức astaxanthin nằm trong khoảng từ 40ppm đến 70ppm khi muốn làm tăng lượng astaxanthin trong bắp thịt cá. Sau khi đạt được mức mong muốn, mức astaxanthin trong thức ăn được giảm tới mức giữ lại. Mức này có thể nằm trong khoảng từ 20ppm đến 30ppm.

Astaxanthin là chất chống oxy hoá có “hiệu ứng làm nguội” mạnh đối với oxy nguyên tử, và astaxanthin có tác dụng mạnh trong việc loại bỏ gốc tự do (Miki 1991, Biological functions and activities of animal carotenoids, Pure Appl. Chem., 63: 141-146). Điều này chỉ ra rằng astaxanthin có vai trò sinh học quan trọng.

Do tầm quan trọng của astaxanthin trong việc đánh giá chất lượng cá hồi và do yếu tố chi phí trong nuôi cá hồi thương mại, đã và đang có nhiều nghiên cứu được thực hiện để nâng cao sự hiểu biết về cơ chế ổn định của astaxanthin trong thức ăn cho cá, quá trình hấp thụ astaxanthin trong ruột, chuyển hoá astaxanthin trong cá và cơ chế tích tụ chất này trong bắp thịt cá. Điều này có thể thấy trong rất nhiều nghiên cứu khác nhau. Biết rằng cơ chế này thay đổi giữa các loài cá hồi khác nhau. Canthaxanthin (β,β -caroten-4,4'-dion) tương ứng với carotenoid tự nhiên được sử dụng như sự chọn lựa hợp lý hơn astaxanthin, nhưng chất này khiến cho thịt cá có màu hơi vàng. Cả hai chất màu này đều thuộc nhóm xanthophyl trong carotenoid. Đã biết rằng khả năng giữ lại canthaxanthin trong thịt cá hồi cầu vồng (*O. mykiss*) là kém hơn so với khả năng giữ lại astaxanthin. Ở cá hồi (*S. salar*) điều này là ngược lại, khả năng giữ lại astaxanthin là kém hơn so với khả năng giữ lại canthaxanthin (Buttle và các đồng tác giả, 2001, The effect of feed pigment type on flesh pigment deposition and colour in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., Aquaculture Research, 32, 103-

111). Do đó, cần phải cẩn thận khi quy đổi kết quả thử nghiệm từ cá hồi cầu vồng sang cá hồi. Ở cá hồi, khả năng giữ lại astaxanthin sẽ giảm khi tăng lượng astaxanthin trong thức ăn (Bjerkeng và các đồng tác giả, 1999, Astaxanthin deposition in fillets of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed two dietary levels of astaxanthin in combination with three levels of α -tocopheryl acetate. Aquaculture Research 30, 637-646), tuy nhiên, tổng lượng astaxanthin trong bắp thịt cá lại tăng khi tăng lượng astaxanthin bổ sung vào. Có nhiều cơ chế khác nhau giải thích điều này, nhưng nó cho thấy rằng kết quả đạt được với mức bổ sung với lượng lớn astaxanthin sẽ không nhất thiết là đúng đối với lượng bổ sung nhỏ. Lượng bổ sung nhỏ có nghĩa là thức ăn chứa 10ppm-30ppm astaxanthin. Lượng trung bình là 40pp-60ppm và lượng lớn là nhiều hơn 60ppm astaxanthin trong thức ăn. Cũng biết rằng lượng chất béo trong thức ăn có vai trò quan trọng đối với việc giữ lại astaxanthin. Astaxanthin hòa tan một phần trong chất béo và khả năng giữ lại sẽ tăng nếu tăng lượng chất béo (Bjerkeng và các đồng tác giả, 1997, Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. Aquaculture 157, 297-309). Thức ăn chứa lượng nhỏ hơn 15% khối lượng chất béo là thức ăn có lượng chất béo rất nhỏ và không phù hợp để làm thức ăn cho cá hồi. Thức ăn chứa 15-20% khối lượng chất béo là thức ăn có lượng chất béo nhỏ. Thức ăn chứa 20-30% khối lượng chất béo là thức ăn có lượng chất béo trung bình. Thức ăn chứa 30-35% khối lượng chất béo là thức ăn có lượng chất béo lớn và thức ăn chứa lượng lớn hơn 35% khối lượng chất béo là thức ăn có lượng chất béo rất lớn. Điều này có nghĩa là kết quả thu được với thức ăn chứa rất ít chất béo không thể áp dụng được cho thức ăn chứa lượng chất béo trung bình, lớn, hoặc rất lớn. Cũng biết rằng vitamin E hòa tan trong chất béo trong một số trường hợp có thể cải thiện khả năng tạo sắc tố ở cá hồi

(Bjerkeng và các đồng tác giả 1999, Astaxanthin deposition in fillets of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed two dietary levels of astaxanthin in combination with three levels of α -tocopheryl acetate, Aquaculture Research 30, 637-646; Christiansen và các đồng tác giả, 1993, Effects of polyunsaturated fatty acids and vitamin E on flesh pigmentation in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Fish nutrition in practice, Biarritz, June 24-27, 1991, Ed. INRA Les Colloques, n° 61).

Mùa và/hoặc thời gian ở biển trong vòng đời có vai trò quan trọng đối với việc tăng tốc quá trình tạo sắc tố. Điều này được Torrissen và các đồng tác giả đề cập vào năm 1995, Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period, Aquacult. Nutr. 1:77-84, Nordgarden và các đồng tác giả., 2003 Seasonal changes in selected muscle quality parameters in Atlantic salmon, (*Salmo salar* L.) reared under natural and continuous light, Aquacul Nutr. 9: 161-168 and Ytrestøyl và các đồng tác giả, 2008, Utilisation of astaxanthin in Atlantic salmon from seawater transfer to slaughter. XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. June 1-5'th. Các tài liệu này đã chỉ ra rằng tốc độ sinh trưởng có tầm quan trọng đối với việc giữ lại astaxanthin và nhiệt độ nước biển phần nào cũng có vai trò đối với việc giữ lại nồng độ astaxanthin trong huyết tương.

Thông thường lượng astaxanthin trong cá hồi sẽ tăng khi trọng lượng cá hồi tăng. Điều này được đề cập trong nghiên cứu của Torrissen và các đồng tác giả, 1995, Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period, Aquacult, Nutr. 1:77-84 and Torrissen & Naevdal, 1998, Pigmentation of salmonids - variation in flesh carotenoids of Atlantic salmon, Aquaculture 101, 305-310.

Với nghĩa nguyên gốc và rộng nhất, ép đùn nghĩa là tạo ra vật thể có biến dạng mặt cắt ngang cố định. Việc này được thực hiện bằng cách kéo hoặc ép nguyên liệu để định hình qua lỗ khuôn có mặt cắt ngang mong muốn. Trong công nghiệp thực phẩm và công nghiệp chế biến thức ăn chăn nuôi, đặc biệt trong công nghiệp chế biến thức ăn cho cá, thuật ngữ ép đùn được sử dụng theo nghĩa hẹp hơn. Trong các ngành công nghiệp này sử dụng thiết bị ép đùn kiểu vít một trục hoặc thiết bị ép đùn kiểu vít hai trục. Nguyên liệu được ép đùn là hỗn hợp của nguyên liệu thô gồm protein, tinh bột thô, chất béo ví dụ, dưới dạng dầu, và nước. Nước có thể được bổ sung vào hỗn hợp dưới dạng nước hoặc hơi nước. Ngoài ra, hỗn hợp này có thể bao gồm chất khoáng và vitamin và có thể là chất màu. Hỗn hợp này có thể được làm nóng sơ bộ trong thiết bị xử lý sơ bộ, ở đó việc làm nóng được thực hiện bằng cách bổ sung hơi nước vào hỗn hợp. Hơi nước và nước cũng có thể được bổ sung vào hỗn hợp bên trong thiết bị ép đùn. Trong chính thiết bị ép đùn, hỗn hợp giống như bột nhão được ép bằng trục về phía đoạn thắt lại ở đầu ra của thiết bị ép đùn và đi qua khuôn ép ở đó hỗn hợp này được tạo hình để có tiết diện ngang mong muốn. Bên ngoài khuôn ép thường là dao quay để cắt dài đi ra từ lỗ ép thành các đoạn với chiều dài mong muốn. Nói chung, áp suất bên ngoài khuôn ép bằng áp suất xung quanh. Sản phẩm thu được sau quá trình ép đùn như vậy được gọi là viên ép đùn. Do áp suất được tạo ra bên trong thiết bị ép đùn và do việc bổ sung hơi nước vào hỗn hợp nên bên trong hỗn hợp này nhiệt độ lên tới trên 100°C và áp suất cao hơn áp suất khí quyển trước khi hỗn hợp này được ép ra bên ngoài qua các lỗ ép. Quá trình ép đùn này cũng được gọi là quá trình nấu ép đùn.

Quá trình nấu ép đùn nguyên liệu chứa tinh bột buộc các hạt tinh bột phình ra khiến cho tinh thể tinh bột trong hạt tinh bột được giải phóng và có thể nở ra. Quá trình này được gọi là quá trình gelatin hóa tinh bột. Các

phân tử tinh bột sẽ tạo thành mạng lưới giúp liên kết viên ép đùn với nhau. Cụ thể, trong thức ăn cho cá lấy thịt, nguyên liệu thô chứa tinh bột được bổ sung vào do khả năng liên kết của chúng trong thức ăn thành phẩm. Thức ăn tự nhiên cho cá lấy thịt không chứa tinh bột. Cá lấy thịt có lượng nhỏ enzym có thể chuyển hoá tinh bột thành đường tiêu hóa được. Việc nấu tinh bột làm cho nó dễ được tiêu hóa hơn. Điều này một phần là do tinh bột không còn ở dạng tinh thể, thô, và một phần quá trình nấu bắt đầu phân rã tinh bột thành các đơn vị đường nhỏ hơn, mà dễ dàng được tiêu hóa.

Tác dụng khác của quá trình nấu ép đùn lên nguyên liệu thô chứa protein, hydrat cacbon và chất béo là tạo ra dạng phức và kết dính có thể có cả hai tác dụng tốt hoặc xấu đến sự tiêu hóa hỗn hợp này.

Tác dụng khác nữa của quá trình nấu ép đùn là viên ép đùn trở nên xốp. Sở dĩ như vậy là do sự chênh lệch áp suất và chênh lệch nhiệt độ trên lỗ ép. Nước trong viên ép đùn nở ra ngay lập tức và được giải phóng thành hơi để lại cấu trúc xốp trong viên ép đùn này. Cấu trúc xốp này có thể được nạp đầy bằng dầu ở bước cuối. Thức ăn thu được sau khi ép đùn chứa 18-30% nước. Sau quá trình ép đùn thức ăn này được cho qua bước làm khô và tiếp đó qua bước phủ dầu. Sản phẩm cuối cùng chứa 10% nước hoặc ít hơn sẽ ổn định trong bảo quản các thức ăn này do hoạt tính của nước là quá thấp, sự sinh trưởng của nấm và mốc cũng được ngăn ngừa và tránh được sự thối hỏng do vi khuẩn. Sau quá trình phủ dầu, thức ăn được làm nguội và đóng gói.

Dưới đây, ép đùn có nghĩa là nấu ép đùn bằng cách sử dụng thiết bị ép kiểu vít một trục hoặc thiết bị ép kiểu vít hai trục. Thức ăn ép đùn có nghĩa là thức ăn được sản xuất bằng cách nấu ép đùn bằng cách sử dụng thiết bị ép kiểu vít một trục hoặc thiết bị ép kiểu vít hai trục.

Thức ăn ép có nghĩa là thức ăn được sản xuất bằng cách ép thức ăn. Quá trình này khác với quá trình ép đùn ở một số bước. Quá trình này sử

dụng nước và hơi nước với lượng nhỏ hơn. Hỗn hợp thức ăn được ép qua khuôn ép vòng từ trong ra ngoài nhờ con lăn quay bên trong khuôn ép vòng. Nhiệt độ và áp suất của quá trình này là thấp hơn quá trình ép đùn, và sản phẩm thì không xốp. Quá trình này khiến tinh bột không dễ được tiêu hóa như sau quá trình ép đùn. Thức ăn ép sẽ chứa lượng nhỏ hơn 10% nước sau quá trình ép và phủ dầu bất kỳ. Quá trình này không cần bước làm khô thức ăn ép. Thức ăn được làm nguội trước khi đóng gói.

Thức ăn chế biến cho cá có nghĩa là thức ăn chứa một hoặc nhiều nguồn protein như, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein có nguồn gốc từ biển như bột cá và bột của loài nhuyễn thể, protein có nguồn gốc thực vật như bột đậu tương, bột hạt cải, gluten lúa mì, gluten ngũ cốc, bột hạt lupin, bột hạt đậu Hà Lan, bột hạt hướng dương và bột gạo, và phế thải ở lò mổ như máu động vật, bột xương, bột lông và bột gà. Bằng cách trộn các nguồn protein khác nhau, mỗi nguồn có thành phần axit amin riêng, trong chừng mực nhất định có thể tạo ra được thành phần axit amin mong muốn trong thức ăn cho phù hợp cho từng loài cá.

Thức ăn chế biến còn chứa dầu cá và/hoặc dầu thực vật như dầu hạt cải và dầu đậu tương làm nguồn cung cấp năng lượng. Thức ăn chế biến cũng chứa chất kết dính, thường ở dạng nguyên liệu thô giàu tinh bột, như lúa mì hoặc bột lúa mì, bột khoai tây, gạo, bột gạo, bột đậu Hà Lan, bột đậu hoặc bột sắn để tạo ra thức ăn có độ dài mong muốn và tạo độ ổn định.

Thức ăn chế biến còn chứa chất khoáng và vitamin cần thiết để giúp cá sinh trưởng và có sức khỏe tốt. Thức ăn còn chứa các chất phụ gia khác như chất màu, để đạt được một số mục đích.

Thức ăn chế biến cho cá là thức ăn hỗn hợp trong đó tỷ lệ giữa protein, chất béo, hydrat cacbon, vitamin, chất khoáng và chất phụ gia bất kỳ khác được tính toán tối ưu nhất để phù hợp với nhu cầu dinh dưỡng của

các loài cá dựa trên độ tuổi của nó. Nói chung là việc cho ăn được thực hiện với chỉ một loại thức ăn và với mỗi loại thức ăn là đủ chất dinh dưỡng.

Thức ăn chế biến khô có nghĩa là thức ăn thuộc loại ép hoặc ép đùn.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng có thể có các điều kiện dẫn đến sai số giữa giá trị mong muốn của thành phần thức ăn trong công thức pha chế và giá trị thực của thành phần trong thức ăn chế biến. Do đó, mức độ sấy thức ăn quá ít hoặc quá nhiều trong quy trình sản xuất sẽ dẫn đến một số thành phần khác bị “loãng” hoặc “đặc” tương ứng. Tương tự, việc bổ sung quá nhiều dầu hoặc quá ít dầu vào thức ăn khô sẽ dẫn đến các thành phần khác bị “loãng” hoặc “đặc” tương ứng. Một vài thành phần thức ăn nhạy cảm, như astaxanthin, có thể bị phân hủy một phần trong quá trình sản xuất, ví dụ trong bước ép đùn hoặc trong bước sấy khô. Điều này được gọi là tổn hao quy trình. Ngoài ra, lượng thành phần thức ăn nhạy cảm có thể bị giảm trong bảo quản thức ăn, gọi là tổn hao bảo quản. Trong quá trình chế biến khẩu phần thức ăn cho cá trong các điều kiện như vậy, cần phải bổ sung astaxanthin với lượng nhiều hơn lượng mong muốn. Khi phân tích astaxanthin trong thức ăn cho cá, có thể nhận thấy rằng giá trị thực có thể thấp hơn hoặc cao hơn giá trị được công bố. Do đó, khi thức ăn cho cá công bố là chứa 10ppm astaxanthin, thì điều này có nghĩa là giá trị thực của nó có thể nhỏ hơn 10ppm, và tương tự khi thức ăn công bố là chứa 40ppm astaxanthin, thì giá trị thực của nó có thể lớn hơn 40ppm astaxanthin. Sai số âm, chẳng hạn “nhỏ hơn”, có thể lớn hơn sai số dương.

Polyphenol là nhóm lớn và phức tạp các chất có nguồn gốc tự nhiên được tìm thấy trong thực vật. Trong phần dưới đây sự phân loại theo Belitz và Grosch (1999) trong Food Chemistry, 764-775. Springer, second edition, được sử dụng làm cơ sở. Các tác giả này phân loại chất phenol thành:

- 1) Axit hydroxyxinamic, axit hydroxycoumarin và axit hydroxybenzoic.
Lưu ý rằng có thể sử dụng thuật ngữ axit phenol carboxyl chung cho ba nhóm này;
- 2) Flavan-3-ol (chaterin), flavan-3,4-ol và proanthoxyaniđin (gọi ngắn gọn là chất tanin);
- 3) anthoxyaniđin;
- 4) flavanon; và
- 5) flavon và flavonol

Lưu ý rằng các nhóm 2-5 được gộp lại thành một nhóm lớn có tên là flavonoid.

Axit frulic (axit 3-(4-hydroxy-3-metoxyphecol)prop-2-enoic) thuộc nhóm axit hydroxyxinamic. Axit galic (axit 3,4,5-hydroxybenzoic) và axit syringic (axit 4-hydroxy-3,5-đimethoxybenzoic) thuộc nhóm axit hydroxybenzoic.

Patent EP 1284101 bộc lộ việc sử dụng lượng polyphenol thuộc nhóm flavonoid, cụ thể hơn là proanthoxyaniđin, kết hợp với carotenoid trong thức ăn cho cá để cải thiện màu ở da và thịt cá. Tốt hơn là thức ăn này chứa 0,004%-0,02% khối lượng astaxanthin. Giá trị này bằng 40mg-200mg astaxanthin trong 1kg thức ăn, tương đương với 40ppm-200ppm. Trong một ví dụ, cá hồi cầu vồng được ăn trong 2 tháng thức ăn chứa 60% bột cá, 24% bột lúa mì, 10% bánh khô dầu đậu tương và 6% các thành phần khác bao gồm chất béo và canxi phosphat. Chuyên gia trong lĩnh vực dinh dưỡng cho cá với sự trợ giúp của bảng dinh dưỡng chuẩn sẽ xác định được rằng thức ăn này có chứa các thành phần chính sau 46%-47% protein, 13%-15% chất béo, 9,2%-9,4% tro và xấp xỉ 1,8% chất xơ nếu các giá trị của đậu tương béo toàn phần hoặc bột đậu tương đã chiết được sử dụng cho bánh khô dầu đậu tương. Trong bảng 2 của tài liệu này cũng bộc lộ rằng chế phẩm chứa các thành phần chính nằm trong giới hạn sau đây: protein thô > 46%, chất béo thô > 12%, và tro thô < 17%. Astaxanthin với lượng 80ppm

được bổ sung vào thức ăn này. Trong thức ăn thực nghiệm, 0,1% sản phẩm thương mại KPA-F từ Kikoman K.K cũng được bổ sung thêm. Tài liệu đó cũng đề cập rằng sản phẩm này chứa 16% proantoxyanidin. Trong công bố số WO2001/095747 bộc lộ rằng proantoxyanidin trong sản phẩm này thường được chiết từ hạt nho. Cuối quá trình thử nghiệm, lượng astaxanthin trong bắp thịt xác định được bằng 6,57ppm trong nhóm có bổ sung astaxanthin và 8,25ppm trong nhóm có bổ sung protoxyanidin.

Trong ví dụ khác, cá được cho là ăn sản phẩm thương mại Tennen Shiageyou 5p do Nippon Haigoou Shiryo K.K cung cấp. Hỗn hợp thức ăn này chứa 54% bột cá, 39% lúa mì và bã đậu tương, 5% cám gạo và 2% canxi phosphat, muối và canthaxanthin. Các thành chính của thức ăn này là protein thô > 46%, chất béo thô > 7% và tro < 13%.

Lượng astaxanthin trong thức ăn này không được ghi rõ, nhưng có thể coi là bằng với lượng có trong ví dụ 1, chẳng hạn 80ppm. Lượng proantoxyanidin là 160ppm.

JP 8332052 mô tả việc sử dụng hỗn hợp flavanol và axit kojic để ổn định màu trong thịt cá, thực phẩm tốt cho sức khỏe, và thức ăn cho cá. Tài liệu này không mô tả việc sử dụng hỗn hợp astaxanthin, flavanol và axit kojic trong thức ăn cho cá, có thể làm tăng khả năng giữ lại astaxanthin trong bắp thịt cá, và từ tài liệu này người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này không thể dự đoán được tác dụng như vậy.

JP2006-50901-A, WO 2004/006687 đề cập đến thức ăn, bao gồm thức ăn cho cá, chứa carotenoit, gồm astaxanthin, phenol propanoid, bao gồm axit ferulic và axit phytic. Tài liệu này cũng mô tả hỗn hợp này có tác dụng tốt trong việc ổn định astaxanthin trong thức ăn. Tài liệu này không mô tả việc thức ăn này có thể dùng cho cá. Từ tài liệu này người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này không thể dự đoán được việc sử

dụng axit ferulic hoặc kết hợp với các chất phụ gia khác có thể làm tăng khả năng giữ lại astaxanthin trong bắp thịt cá.

JP2005-176799-A đề cập đến thức ăn cho cá chứa astaxanthin và axit ferulic và gama-oryzanol. Tài liệu này cũng mô tả hỗn hợp axit ferulic và gama-oryzanol có tác dụng như là chất ổn định đối với astaxanthin trong thức ăn cho cá như được thể hiện trong bảng 6. Tài liệu này cũng cho biết rằng hỗn hợp này có ảnh hưởng có lợi lên màu da cá vằn biển khi thức ăn chứa 60ppm astaxanthin. Đa số ảnh hưởng này là do các chất phụ gia đã ngăn hoặc giảm quá trình tạo ra melamin, khiến cho màu sáng hơn. Phân tích hóa học da cá cho thấy lượng astaxanthin tăng xấp xỉ 10% khi dùng hỗn hợp chứa 50% axit ferulic và 100ppm axit ferulic như được thể hiện trong bảng 4. Việc bổ sung chỉ 100ppm axit ferulic không làm tăng lượng astaxanthin, và 1000ppm axit ferulic làm tăng ít lượng astaxanthin. Từ tài liệu này người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này không thể dự đoán tác dụng của việc sử dụng axit ferulic có thể làm tăng khả năng giữ lại astaxanthin trong bắp thịt cá.

JP 2002 218940 đề cập đến dung dịch chứa axit galic để làm ổn định màu sắc của lát cá sau khi đã được làm thịt, đông lạnh và rã đông.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là để khắc phục và giảm bớt ít nhất là các nhược điểm của các giải pháp kỹ thuật đã biết.

Mục đích của sáng chế đạt được bởi giải pháp được bộc lộ trong phần mô tả dưới đây và trong yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện tỷ lệ giữ lại astaxanthin trong bắp thịt cá so với lượng astaxanthin bổ sung vào trong thức ăn ở ba mức astaxanthin khác

nhau kết hợp với bốn mức axit galic khác nhau trong thức ăn và so với thức ăn không có axit galic;

Fig.2 là đồ thị thể hiện tỷ lệ giữ lại astaxanthin trong bắp thịt cá so với lượng astaxanthin bổ sung vào trong thức ăn ở hai mức astaxanthin khác nhau trong thức ăn đối chứng và thức ăn chứa mức axit ferulic thấp và trung bình; và

Fig.3 là đồ thị thể hiện tỷ lệ giữ lại astaxanthin trong bắp thịt cá so với lượng astaxanthin bổ sung vào trong thức ăn ở hai mức astaxanthin khác nhau trong thức ăn đối chứng và thức ăn chứa lượng axit syringic thấp hoặc trung bình.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế là đề xuất thức ăn cho cá dạng ép đùn chứa lượng nhỏ hơn 10% khối lượng tro, nhiều hơn 20% khối lượng chất béo, nhỏ hơn 20% khối lượng nguyên liệu thô chứa tinh bột, và astaxanthin. Thức ăn cho cá này chứa ít nhất một chất chống oxy hóa hòa tan trong nước được chọn từ nhóm bao gồm axit galic (axit 3,4,5-hydroxybenzoic) và axit syringic (axit 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic), trong đó chất chống oxy hóa hòa tan trong nước có mặt với hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 75ppm hoặc với hàm lượng nằm trong khoảng từ 76 đến 750ppm tính theo tổng khối lượng của thức ăn. thức ăn cho cá này chứa astaxanthin với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 40mg trong 1kg thức ăn.

Chất màu này có thể là astaxanthin tự nhiên, đặc biệt là astaxanthin tổng hợp. Chất màu này có thể được chọn từ nhóm bao gồm astaxanthin tự nhiên và astaxanthin tổng hợp.

Thức ăn cho cá này cũng có thể chứa nhiều hơn 25% chất béo. Điều này có lợi đối với thức ăn cho cá hồi. Theo phương án khác, thức ăn cho cá

này có thể chứa nhiều hơn 30% chất béo và theo phương án khác nữa chứa nhiều hơn 33% chất béo.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng khả năng giữ lại astaxanthin trong thịt cá hồi bằng cách cho cá hồi tươi ăn thức ăn này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là các ví dụ theo các phương án ưu tiên được minh họa trong các hình vẽ kèm theo.

Ví dụ 1

Thử nghiệm được tiến hành trên cá hồi (*S. salar*) trong thời gian 5,5 tháng từ ngày 11/11 đến ngày 5/5. Thử nghiệm được tiến hành trong bể có đường kính 1m. Bể được đổ đầy nước biển và nhiệt độ nước biển được giữ trong khoảng từ 8°C đến 12°C trong thời gian thử nghiệm. Có 34-35 cá thể cá trong mỗi bể. Khối lượng trung bình ban đầu là 118g. Nhóm đối chứng gồm ba bể, trong khi mỗi nhóm thử nghiệm gồm một bể.

Bảng 1 cho biết thành phần của thức ăn đối chứng.

Bảng 1

Thành phần của thức ăn đối chứng, được chế biến để chứa 15ppm, 30ppm và 45ppm astaxanthin

Nguyên liệu thô	Hàm lượng (%)
Nồng độ protein đậu tương, Imcopa	15,9
Lúa mì	16,2
Gluten lúa mì	7,1
Bột cá, South American LT	38,2
dầu cá, nordic	22,4
Betafin	0,042
Lutavit C Aquastab 35 %	0,014

Hỗn hợp chất khoáng	0,1
Hỗn hợp vitamin	0,1
Carophyll Pink ¹⁾	0,015; 0,030; 0,045

¹⁾ chứa ít nhất 10% astaxanthin tinh khiết

Thức ăn chứa các thành phần chủ yếu sau:

protein 43,5%; chất béo 27,7%; nước 7,8% và tro 8,0%.

Tạo ra thức ăn chế biến có ba mức astaxanthin khác nhau là 15, 30 và 45 mg astaxanthin/kg tương ứng, để dùng làm cả thức ăn đối chứng lẫn thức ăn thử nghiệm, bằng cách bổ sung lượng Carophyll Pink khác nhau vào hỗn hợp bột trước giai đoạn ép đùn.

Bổ sung axit galic vào hỗn hợp bột có công thức chế biến giống như thức ăn đối chứng để làm thức ăn thử nghiệm. Axit galic được bổ sung theo bốn mức vào thức ăn thử nghiệm, tương ứng là mức thấp, mức trung bình, mức cao và mức rất cao. Mức thấp là mức có lượng axit galic từ 10ppm đến 75ppm, trong ví dụ là 15ppm; mức trung bình là mức có lượng axit galic từ 76ppm đến 750ppm, trong ví dụ là 400ppm; mức cao là mức có lượng axit galic từ 751ppm đến 1200ppm, và mức rất cao là mức có lượng axit galic trên 1500ppm, trong ví dụ là 3600 ppm.

Ở thời điểm kết thúc thử nghiệm, cá hồi có khối lượng trung bình là 557g. SGR là từ 0,84%/d đến 0,89%/d. Lạng cá lấy phần philê và phân tích để xác định astaxanthin hai lần trên mỗi mẫu. Astaxanthin được phân tích bằng HPLC theo phương pháp được phát triển bởi Roche có cải biến. Kết quả được thể hiện trên Fig.1.

Như được thể hiện trên Fig.1, tỷ lệ giữ lại astaxanthin là hầu như không đổi khi lượng astaxanthin thay đổi trong khoảng từ 15ppm đến 40ppm trong thức ăn đối chứng. Đã biết rằng tỷ lệ giữ lại astaxanthin giảm xuống khi tăng lượng astaxanthin, đặc biệt là từ mức 40ppm trở lên (Ytrestøy và các đồng tác giả, 2008, Utilisation of astaxanthin in Atlantic

salmon from seawater transfer to slaughter, XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. June 1-5'th). Kết quả cho thấy rằng việc bổ sung axit galic với lượng cao tác động xấu đến tỷ lệ giữ lại astaxanthin. Việc bổ sung axit galic với lượng rất cao làm cho tỷ lệ giữ lại astaxanthin kém hơn so với ở các lượng thử nghiệm khác. Điều này có thể là do axit galic ở mức này có tác dụng giống như chất tiền oxy hóa. Hiện tượng này đã được mô tả trong Edwin N. Frankel, 2007, Antioxidants in Food and Biology, The Oily Press, 2007.

Thử nghiệm cho thấy điều bất ngờ là việc bổ sung axit galic ở mức thấp nhất cũng cho tác động tốt như mức trung bình trong việc giữ lại tỷ lệ astaxanthin. Rõ ràng rằng tác động này là lớn nhất ở mức astaxanthin thấp trong thức ăn do có sự khác nhau không nhiều trong tỷ lệ giữ lại khi lượng astaxanthin trong thức ăn xấp xỉ 40ppm. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, tác giả sáng chế này cho rằng kết quả quan sát được có thể là do chất chống oxy hóa được bổ sung đã làm giảm nhu cầu astaxanthin hoặc thay thế một vài chức năng sinh học của astaxanthin trong việc giữ lại chức năng mà astaxanthin có thể có mức astaxanthin thấp hơn.

Thử nghiệm cho biết rằng tỷ lệ giữ lại astaxanthin tăng đáng kể ở mức astaxanthin thấp trong thức ăn. Lượng astaxanthin 15ppm-20ppm trong thức ăn được tin là mức giữ lại, tức là lượng astaxanthin giữ lại trong bắp thịt cá khi nó lớn. Lượng 20ppm-70ppm được tin là mức tạo màu, tức là lượng astaxanthin thêm trong bắp thịt cá khi lớn và do đó làm cho thịt trở lên đỏ hơn. Bằng cách áp dụng sáng chế này lượng astaxanthin trong thức ăn có thể được giảm để giữ lại mức sắc tố trong bắp thịt. Bằng cách áp dụng sáng chế này, cũng có thể sử dụng astaxanthin trong thức ăn chăn nuôi với mức bình thường để cải thiện màu hơi đỏ trong bắp thịt. Cả hai cách áp dụng này sẽ giúp tiết kiệm chi phí cho chất màu.

Ví dụ 2

Thử nghiệm được thực hiện với cá hồi (*S. salar*) từ ngày 04/05 đến ngày 20/08. Thử nghiệm được tiến hành trong bể có đường kính 1m. Bể được đổ đầy nước biển và nhiệt độ nước biển được giữ trong khoảng từ 8,3°C đến 11,8°C trong quá trình thử nghiệm. Có 30 cá thể cá trong mỗi bể và khối lượng cá ban đầu là 0,2kg. Nhóm đối chứng gồm 2 bể được cho ăn theo chế độ ăn thường ngày, trong khi nhóm thử nghiệm gồm một bể được cho ăn thức ăn có bổ sung axit ferulic ở mức trung bình và 2 bể được cho ăn thức ăn theo chế độ ăn thường ngày có bổ sung axit ferulic ở mức thấp.

Bảng 2

Hỗn hợp thức ăn chế biến đối chứng chứa 20ppm và 40ppm astaxanthin

Nguyên liệu thô	Hàm lượng (%)
Lúa mì	13,7
Gluten lúa mì	10,9
Bột cá, South American LT	38,0
Sản phẩm cô protein đậu tương, Imcopa	13,4
Dầu các, nordic	23,7
Chất khoáng và vitamin	0,3
Carophyll Pink ¹⁾	0,020; 0,040

¹⁾ chứa tối thiểu 10% astaxanthin tinh khiết

Thức ăn có các thành phần chính sau: protein 44,5%; chất béo 28,2%; nước 7,6% và chất tro 7,2%.

Thức ăn thử nghiệm có hỗn hợp giống như trong bảng 2 và ngoài ra bổ sung axit ferulic dưới dạng bột khô vào hỗn hợp bột trước khi ép đùn. Axit ferulic được bổ sung ở 2 mức: mức thấp và mức trung bình, trong đó các mức này được xác định như trong ví dụ 1.

Mỗi thức ăn được chế biến với 2 mức astaxanthin, 20mg/kg và 40 mg/kg.

Khi kết thúc thử nghiệm, cá có khối lượng trung bình là 0,7kg. Sự phát triển của cá như vậy là đáp ứng kỳ vọng ở chỗ hệ số biến đổi thức ăn là từ 0,84 đến 0,88, trong khi SGR là từ 1,10%/d đến 1,21%/d. Lạng cá lấy phân philê và phân tích để xác định lượng astaxanthin. 30 cá thể cá từ mỗi bể được phân tích riêng bằng NIR. Kết quả được thể hiện trên Fig.2. Fig.2 thể hiện giá trị nồng độ astaxanthin thực trong các thức ăn khác nhau.

Như kỳ vọng, thử nghiệm cho thấy rằng lượng astaxanthin tăng trong bắp thịt khi tăng lượng astaxanthin trong thức ăn trong khoảng thời gian bổ sung này. Việc bổ sung axit ferulic ở mức thấp có tác dụng có lợi đến tỷ lệ giữ lại astaxanthin khi thức ăn chứa lượng nhỏ hơn 20ppm astaxanthin. Việc bổ sung axit ferulic ở mức trung bình có tác dụng có lợi đến tỷ lệ giữ lại astaxanthin khi thức ăn chứa nhiều hơn 30ppm astaxanthin.

Ví dụ 3

Thử nghiệm được thực hiện với cá hồi (*S. salar*) từ ngày 04/05 đến ngày 20/08. Thử nghiệm được tiến hành trong bể có đường kính 1m. Bể được đổ đầy nước biển và nhiệt độ nước biển được giữ trong khoảng từ 8,3°C đến 11,8°C trong quá trình thử nghiệm. Có 30 cá thể cá trong mỗi bể và khối lượng cá ban đầu là 0,2kg. Nhóm đối chứng gồm 2 bể theo chế độ ăn thường ngày, trong khi nhóm thử nghiệm gồm một bể cho ăn thức ăn có bổ sung axit syringic ở mức trung bình và 2 bể theo chế độ ăn thường ngày có bổ sung axit syringic ở mức thấp.

Trong bảng 3 là thành phần thức ăn đối chứng.

Bảng 3

Hỗn hợp thức ăn đối chứng được chế biến để chứa 20ppm và 40ppm astaxanthin

Nguyên liệu thô	Hàm lượng (%)
Lúa mì	13,7
Gluten lúa mì	10,9
Bột cá, South American LT	38,0
Sản phẩm cô protein đậu tương, Imcopa	13,4
Dầu các, nordic	23,7
Chất khoáng và vitamin	0,3
Carophyll Pink ¹⁾	0,020; 0,040

¹⁾ chứa tối thiểu 10% astaxanthin tinh khiết

Thức ăn chứa các thành phần chính sau: protein 44,3%; chất béo 28,4%; nước 7,5% và tro 7,2%.

Bổ sung axit syringic dưới dạng bột khô vào hỗn hợp thức ăn đối chứng trước khi ép đùn. Axit syringic được bổ sung ở 2 mức: mức thấp và mức trung bình, trong đó các mức được xác định như trong ví dụ 1.

Mỗi thức ăn được chế biến với 2 mức astaxanthin: 20mg/kg và 40mg/kg.

Khi kết thúc thử nghiệm cá có khối lượng trung bình là 0,7kg. Sự phát triển của cá như vậy là đáp ứng kỳ vọng, hệ số biến đổi thức ăn là từ 0,84 đến 0,88, trong khi đó SGR là từ 1,10%/d đến 1,21%/d. Lạng cá lấy phần philê và phân tích để xác định lượng astaxanthin (30 cá thể cá từ mỗi bể được phân tích riêng bằng NIR). Kết quả được thể hiện trên Fig.3. Fig.3 thể hiện các giá trị thực nồng độ astaxanthin trong các thức ăn khác nhau thu được bằng phân tích này.

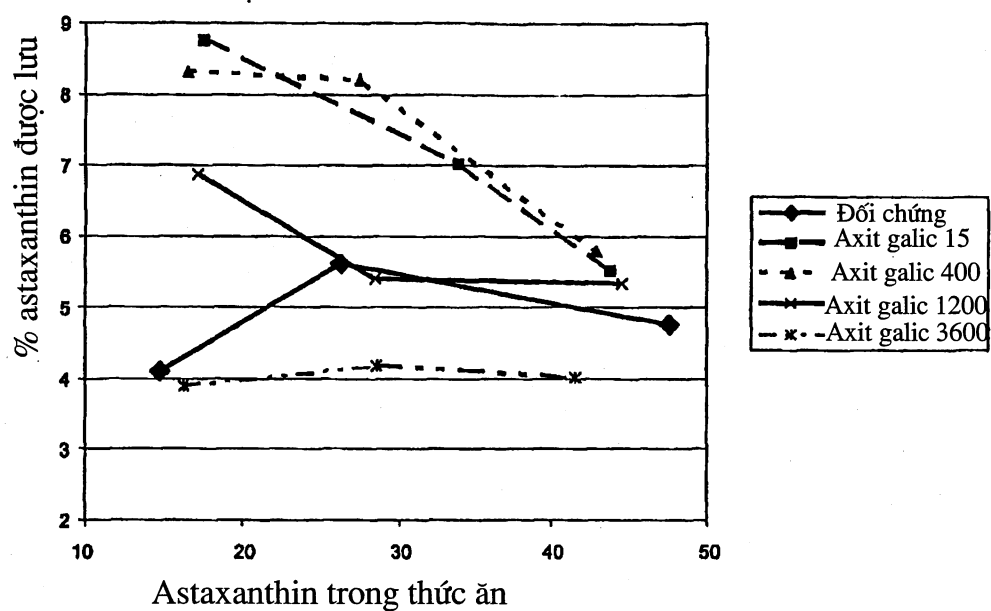
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thức ăn cho cá dạng ép đùn chứa lượng nhỏ hơn 10% khối lượng tro, nhiều hơn 20% khối lượng chất béo, nhỏ hơn 20% khối lượng nguyên liệu thô chứa tinh bột, và astaxanthin, đặc trưng ở chỗ, thức ăn cho cá này chứa ít nhất một chất chống oxy hoá hoà tan trong nước được chọn từ nhóm bao gồm axit galic và axit syringic, trong đó chất chống oxy hoá hoà tan trong nước có mặt với hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 75ppm hoặc với hàm lượng nằm trong khoảng từ 76 đến 750ppm tính theo tổng khối lượng của thức ăn này, và trong đó thức ăn cho cá này chứa astaxanthin với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 40mg trong 1kg thức ăn.

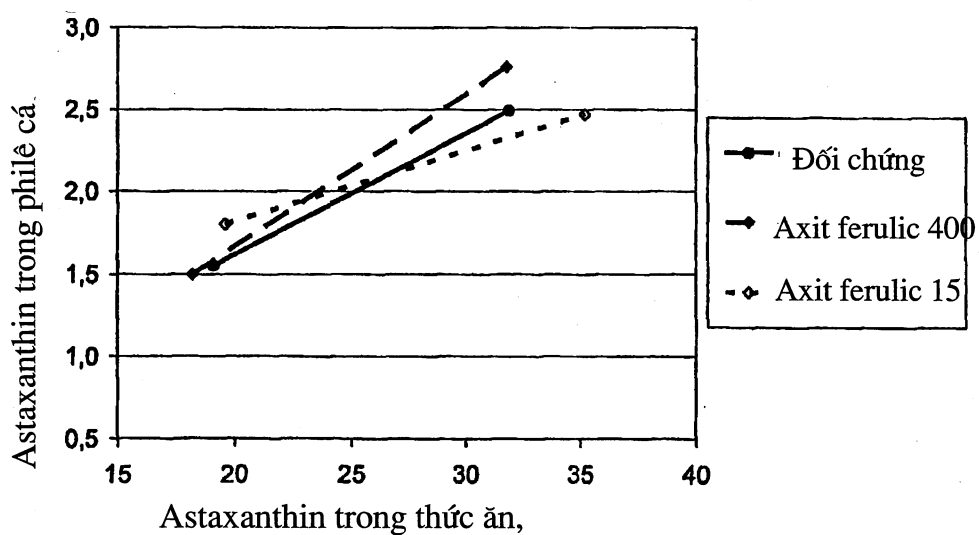
2. Thức ăn cho cá theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ, thức ăn cho cá này chứa nhiều hơn 25% khối lượng chất béo.

3. Phương pháp cải thiện sự tích tụ màu trong thịt cá hồi bao gồm việc cho cá ăn thức ăn cho cá chứa lượng nhỏ hơn 10% khối lượng tro, nhiều hơn 20% khối lượng chất béo, nhỏ hơn 20% khối lượng nguyên liệu thô chứa tinh bột, và astaxanthin, đặc trưng ở chỗ, thức ăn cho cá này được bổ sung ít nhất một chất chống oxy hoá hoà tan trong nước được chọn từ nhóm bao gồm axit galic và axit syringic, trong đó chất chống oxy hoá hoà tan trong nước có mặt với hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 75ppm hoặc với hàm lượng nằm trong khoảng từ 76 đến 750ppm tính theo tổng khối lượng của thức ăn này, và thức ăn cho cá này còn được bổ sung astaxanthin với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 40mg trong 1kg thức ăn cho cá, và thức ăn này được cho cá hồi ăn để cải thiện khả năng giữ lại astaxanthin trong thịt cá.

1/2

**Fig.1**

% astaxanthin được lưu giữ ở các mức astaxanthin và axit galic (ppm) khác nhau trong thức ăn

**Fig.2**

Astaxanthin trong phôi cá ở các mức astaxanthin và axit ferulic (ppm) khác nhau trong thức ăn

2/2

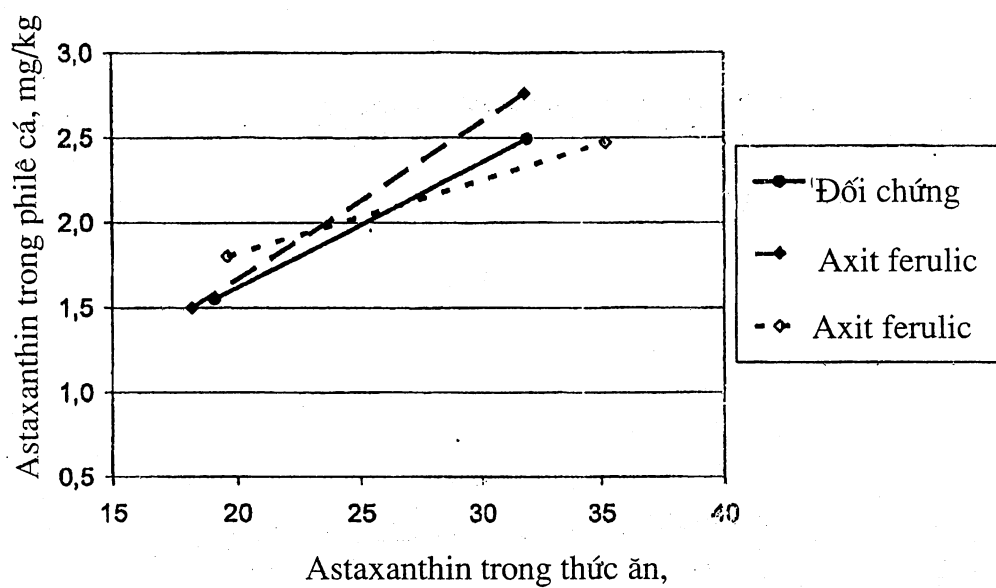


Fig.3 Astaxanthin trong phôi cá ở các mức astaxanthin và axit syringic (ppm) khác nhau trong thức ăn.