



(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)



1-0027239

(51)^{2020.01} G01N 33/84; C12M 1/36; C12N 1/20; (13) B
C12P 13/10; C12P 13/24; C12M 1/34;
C12P 13/08

(21) 1-2016-01503

(22) 02/10/2014

(86) PCT/JP2014/076468 02/10/2014

(87) WO 2015/050234 A1 09/04/2015

(30) 2013-207519 02/10/2013 JP

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/10/2016 343A

(73) AJINOMOTO CO., INC. (JP)

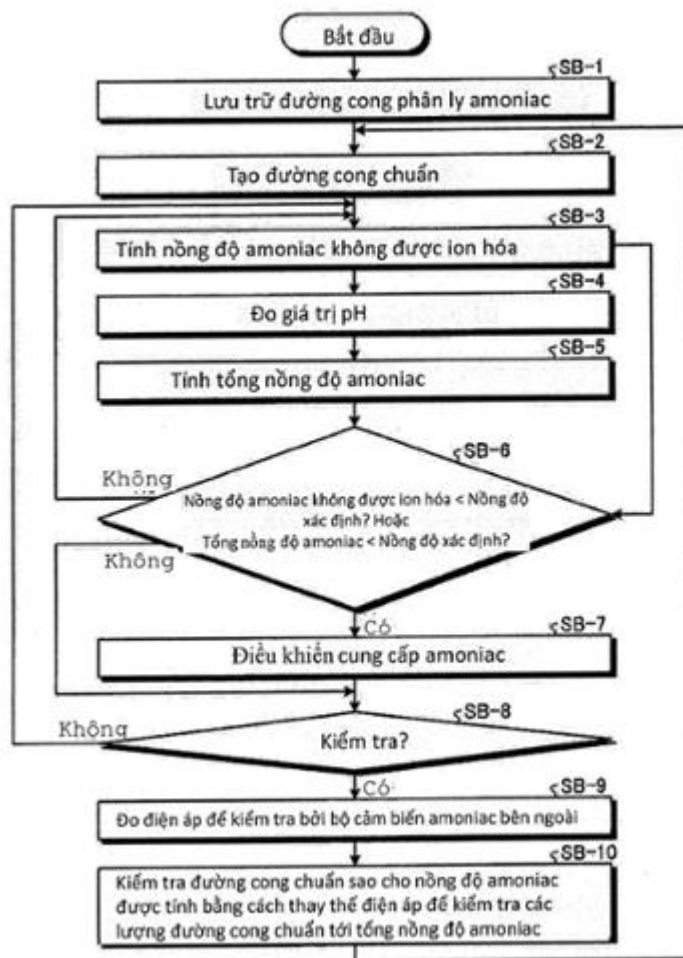
15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-8315 Japan

(72) TAKESHITA, Ryo (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT AMONIAC CHO QUÁ TRÌNH LÊN MEN, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẤT ĐÍCH BẰNG QUÁ TRÌNH LÊN MEN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát amoniac để kiểm soát nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200), trong đó nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy (200) được kiểm soát bằng cách sử dụng thiết bị kiểm soát amoniac (100) bao gồm ít nhất bộ phận cung cấp amoniac (300) để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy (200), bộ cảm biến amoniac (10) mà phản ứng với amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200), và bộ phận kiểm soát (102) được nối với bộ phận cung cấp amoniac (300) và bộ cảm biến amoniac (10), và phương pháp này bao gồm các bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát (102): bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa để tính nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy (200) bằng cách thay thế tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (10) thành đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy (200) và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (10); và bước điều khiển cung cấp amoniac để điều khiển bộ phận cung cấp amoniac (300) cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy (200) khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ định trước. Sáng chế cũng đề cập đến thiết bị kiểm soát amoniac và phương pháp sản xuất chất đích bằng quá trình lên men.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thiết bị và phương pháp kiểm soát amoniac, cụ thể là đến thiết bị và phương pháp kiểm soát amoniac mà để kiểm soát nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Từ xa xưa, amoniac là nguồn cung cấp nitơ rất quan trọng như chất dinh dưỡng không thể thiếu được sử dụng cho quá trình lên men.

Với kỹ thuật hiện nay để đo nồng độ amoniac, có kỹ thuật sử dụng điện cực ion.

Ví dụ, theo phương pháp được mô tả trong tài liệu sáng chế 1, nồng độ amoniac trong môi trường lên men lỏng được kiểm soát ở nồng độ xác định hoặc thấp hơn, và do đó vi khuẩn lên men được nuôi cấy ở trị số pH cao hơn. Các ion trái dấu được bổ sung vào môi trường để sản xuất chất cơ bản bởi quá trình lên men do đó được làm giảm, và quy trình sản xuất do đó được đơn giản hóa một cách đáng kể.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Đơn sáng chế quốc tế WO2006/038695

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Tuy nhiên, kỹ thuật thông thường nêu trên có nhược điểm là khó trực tiếp kiểm soát nồng độ amoniac trong môi trường lên men lỏng, nghĩa là, trực tiếp đo hoặc kiểm soát nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy trong khi nuôi cấy.

Cụ thể là, nó có nhược điểm là, như được thể hiện trên Fig.9 (lưu đồ thể hiện ví dụ về quy trình kiểm soát nồng độ amoniac thông thường), để biết tổng

nồng độ amoniac (tổng nồng độ của NH_3 và NH_4^+) trong môi trường nuôi cấy, có đề xuất một loạt các thao tác lấy mẫu môi trường nuôi cấy từ bên trong của bể nuôi cấy (bước SA-1), trộn môi trường nuôi cấy được lấy mẫu với chất lỏng phản ứng kiềm mạnh (ví dụ, NaOH) (bước SA-2), và tiếp tục đo amoniac hiện thời mà đã được chuyển đổi thành amoniac không được ion hóa (NH_3) bên ngoài bể nuôi cấy (bước SA-3). Nghĩa là, khó thực hiện vô trùng một loạt các thao tác cho việc đo lường với môi trường nuôi cấy được lấy mẫu bên ngoài bể nuôi cấy. Ngoài ra, do môi trường nuôi cấy được sử dụng cho việc đo lường chứa chất lỏng phản ứng kiềm mạnh (ví dụ, NaOH), nó không thể được tái chế thành bể nuôi cấy và phải được loại bỏ. Do đó, tần suất đo cao hơn lỗi cuốn chất thải lớn hơn của môi trường nuôi cấy, và số lượng các lần đo thực tế bị giới hạn (bước SA-4).

Ngoài ra, trong bể nuôi cấy, amoniac tiếp tục được sử dụng, nhưng tỷ lệ sử dụng amoniac không ổn định. Do đó, cũng có nhược điểm là, như được thể hiện trên Fig.9, thậm chí nếu nồng độ amoniac được đo bởi thao tác lấy mẫu nêu trên với khoảng thời gian xác định (bước SA-5), xu hướng thời gian ngắn của nó không thể được biết đến, và do đó nồng độ amoniac trong môi trường nuôi cấy không thể được kiểm soát ổn định (bước SA-6).

Ngoài ra, thậm chí nếu amoniac không được ion hóa (NH_3) một phần tồn tại trong môi trường nuôi cấy được đo với điện cực ion xét đến các nhược điểm nêu trên của kỹ thuật thông thường, nó có nhược điểm là không dễ dàng kiểm tra các giá trị được đo để điều chỉnh các lỗi xảy ra trong khi nuôi cấy. Điều này là bởi vì, để biết nồng độ amoniac chính xác hiện tại, cần đo tổng nồng độ amoniac cho môi trường nuôi cấy được lấy mẫu mà đã được trộn với chất lỏng phản ứng kiềm mạnh sao cho amoniac trong môi trường nuôi cấy được chuyển đổi thành amoniac không được ion hóa (NH_3).

Cụ thể là, đó là bởi vì, trong việc lên men thông thường, trị số pH của môi trường nuôi cấy nằm trong phạm vi axit yếu đến kiềm yếu (khoảng pH 5 tới 9), vì vậy một phần hoặc về cơ bản tất cả amoniac tồn tại trong môi trường nuôi cấy tồn tại như được ion hóa, ion amoni (NH_4^+), và do đó khó đạt được tổng nồng độ amoniac (tổng nồng độ của NH_3 và NH_4^+) trong môi trường nuôi cấy chỉ bằng cách đo nồng độ của amoniac không được ion hóa (NH_3) với điện cực ion nêu trên. Do đó, tổng nồng độ amoniac không thể được kiểm soát một cách chính xác.

Sáng chế đã được thực hiện xét đến các nhược điểm nêu trên, và mục đích của sáng chế là đề xuất thiết bị và phương pháp để kiểm soát amoniac mà cho phép việc nuôi cấy kiểm soát liên tục và một cách tùy ý nồng độ amoniac trong môi trường nuôi cấy.

Cách thức giải quyết vấn đề

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp và thiết bị dưới đây.

(1) Phương pháp kiểm soát amoniac để kiểm soát nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy, trong đó nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy được kiểm soát bằng cách sử dụng thiết bị kiểm soát amoniac bao gồm ít nhất bộ phận cung cấp amoniac để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy, bộ cảm biến amoniac mà phản ứng với amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy, và bộ phận kiểm soát được nối với bộ phận cung cấp amoniac và bộ cảm biến amoniac, và phương pháp này bao gồm các bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát:

bước tạo đường cong chuẩn để tạo ra đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac,

bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa để tính nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy bằng cách thay thế tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac thành đường cong chuẩn, và

bước điều khiển cung cấp amoniac để điều khiển bộ phận cung cấp amoniac cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ định trước.

(2) Phương pháp kiểm soát amoniac như được nêu trên, còn bao gồm bước tạo đường cong chuẩn để tạo ra đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac.

(3) Phương pháp kiểm soát amoniac như được nêu trên, trong đó thiết bị kiểm soát amoniac còn được nối với bộ cảm biến pH để đo trị số pH của môi trường

nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy,

trong đó phương pháp còn bao gồm bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát:

bước tính tổng nồng độ amoniac để tính tổng nồng độ amoniac từ nồng độ amoniac không được ion hóa được tính ở bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa và trị số pH được đo với bộ cảm biến pH trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac thể hiện tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ amoniac được phân hủy trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy ở mỗi trị số pH, và

trong đó ở bước điều khiển cung cấp amoniac, tổng nồng độ amoniac được sử dụng thay cho nồng độ amoniac không được ion hóa.

(4) Phương pháp kiểm soát amoniac như được nêu trên, bao gồm việc bố trí bộ cảm biến amoniac bên ngoài ở phía ngoài bể nuôi cấy để đo nồng độ amoniac không được ion hóa, và

thu được tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac bên ngoài bằng cách đo nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy, mà, sau khi thu thập từ bể nuôi cấy, được tạo kiềm một cách đầy đủ để chuyển hóa ion amoni thành amoniac không được ion hóa với bộ cảm biến amoniac bên ngoài, như tín hiệu để kiểm tra, và

trong đó phương pháp còn bao gồm bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát:

bước kiểm tra để kiểm tra đường cong chuẩn sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa được tính từ tín hiệu để kiểm tra trên cơ sở của các lượng đường cong chuẩn tới tổng nồng độ amoniac được tính ở bước tính tổng nồng độ amoniac.

(5) Phương pháp kiểm soát amoniac như được nêu trên, trong đó thiết bị kiểm soát amoniac được nối với bộ cảm biến amoniac bên ngoài, và

trong đó phương pháp còn bao gồm bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát:

bước đưa vào tín hiệu để kiểm tra để đưa vào tín hiệu từ bộ cảm biến

amoniac bên ngoài, như tín hiệu để kiểm tra.

(6) Phương pháp để sản xuất chất đích bởi quá trình lên men bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật có khả năng sản xuất chất đích trong bể nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy, và thu thập chất đích từ việc nuôi cấy, trong đó vi sinh vật được nuôi cấy với việc kiểm soát nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy bởi phương pháp kiểm soát amoniac như được nêu trên.

(7) Phương pháp sản xuất như được nêu trên, trong đó chất đích là axit amin L, axit hữu cơ, axit nucleic, rượu, hoặc protein.

(8) Phương pháp sản xuất như được nêu trên, trong đó chất đích là axit amin cơ bản được lựa chọn từ nhóm bao gồm L-lysin, L-arginin, và L-histidin.

(9) Phương pháp sản xuất như được nêu trên, mà bao gồm việc làm giảm số lượng các ion sulfat và/hoặc ion clorua được sử dụng như các ion trái dấu của axit amin cơ bản bằng cách điều chỉnh tổng nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy trong phạm vi nồng độ xác định trong ít nhất một phần của toàn bộ quy trình nuôi cấy.

(10) Phương pháp sản xuất như được nêu trên, trong đó phạm vi nồng độ xác định là 300mM hoặc thấp hơn.

(11) Phương pháp sản xuất như được nêu trên, trong đó phạm vi nồng độ xác định là 200mM hoặc thấp hơn.

(12) Phương pháp sản xuất như được nêu trên, trong đó phạm vi nồng độ xác định là 100mM hoặc thấp hơn.

(13) Thiết bị kiểm soát amoniac bao gồm ít nhất bộ phận cung cấp amoniac mà cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy, bộ cảm biến amoniac, và bộ phận kiểm soát, trong đó:

bộ cảm biến amoniac phản ứng với amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy,

bộ phận kiểm soát được nối với bộ phận cung cấp amoniac và bộ cảm biến amoniac,

bộ phận kiểm soát tạo ra đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ

cảm biến amoniac,

tính nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy bằng cách thay thế tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac thành đường cong chuẩn, và

điều khiển bộ phận cung cấp amoniac cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ định trước.

(14) Thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên, mà còn được nối với bộ cảm biến pH để đo trị số pH của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy, và

trong đó bộ phận kiểm soát còn tính tổng nồng độ amoniac từ nồng độ amoniac không được ion hóa được tính bởi phương tiện tính nồng độ amoniac không được ion hóa và trị số pH đo được với bộ cảm biến pH trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac thể hiện tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ amoniac được phân hủy trong môi trường nuôi cấy ở mỗi trị số pH, và

tổng nồng độ amoniac được sử dụng thay cho nồng độ amoniac không được ion hóa.

(15) Thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên, trong đó bộ phận kiểm soát còn:

kiểm tra đường cong chuẩn sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa được tính từ tín hiệu để kiểm tra trên cơ sở của các lượng đường cong chuẩn tới tổng nồng độ amoniac được tính bởi phương tiện tính tổng nồng độ amoniac, và

tín hiệu để kiểm tra là:

tín hiệu thu được với bộ cảm biến amoniac bên ngoài được bố trí bên ngoài bể nuôi cấy để đo nồng độ amoniac không được ion hóa bằng cách chuẩn bị bộ cảm biến amoniac bên ngoài, và

đo nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy, mà, sau khi thu thập từ bể nuôi cấy, được tạo kiềm một cách đầy đủ để chuyển hóa ion amoni thành amoniac không được ion hóa với bộ cảm biến amoniac bên ngoài.

(16) Thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên, mà được nối với bộ cảm biến

amoniac bên ngoài, và

trong đó bộ phận kiểm soát còn đưa vào tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac bên ngoài, như tín hiệu để kiểm tra.

(17) Thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên, mà được tạo kết cấu để giữ tổng nồng độ amoniac trong phạm vi định trước.

(18) Thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên, còn bao gồm giao diện người dùng.

(19) Thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên, mà được tạo kết cấu để kiểm soát amoniac theo thời gian thực trong môi trường nuôi cấy, tốt hơn là theo thời gian thực trong việc kiểm soát amoniac tại chỗ trong môi trường nuôi cấy.

(20) Thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên, mà được lắp vào để kiểm soát amoniac trong môi trường nuôi cấy của một hoặc nhiều bể nuôi cấy, tốt hơn là 1 tới 10 bể nuôi cấy.

(21) Thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên, mà được lắp vào để kiểm soát amoniac trong môi trường nuôi cấy ở các khoảng thời gian 5 phút hoặc ít hơn, tốt hơn là 1 giây hoặc ít hơn.

(22) Thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên, mà được lắp vào để kiểm tra đường cong chuẩn ở các khoảng thời gian 12 tiếng hoặc ít hơn, tốt hơn là 8 tiếng hoặc ít hơn.

(23) Thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên, mà được lắp vào để kiểm soát amoniac cho ít nhất một phần giai đoạn nuôi cấy hoặc toàn bộ giai đoạn nuôi cấy.

(24) Phương pháp để sản xuất chất đích bởi quá trình lên men bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật có khả năng sản xuất chất đích trong bể nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy để sản xuất và tích tụ chất đích trong môi trường nuôi cấy, trong đó tổng nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh để nằm trong phạm vi nồng độ xác định trong ít nhất một phần của toàn bộ quy trình nuôi cấy bằng cách sử dụng thiết bị kiểm soát amoniac như được nêu trên.

(25) Phương pháp sản xuất như được nêu trên, trong đó phạm vi nồng độ xác định là 300mM hoặc thấp hơn.

(26) Phương pháp sản xuất như được nêu trên, trong đó phạm vi nồng độ xác

định là 200mM hoặc thấp hơn.

(27) Phương pháp sản xuất như được nêu trên, trong đó phạm vi nồng độ xác định là 100mM hoặc thấp hơn.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (ví dụ, điện áp) được tạo ra, nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy được tính với tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac trên cơ sở của đường cong chuẩn, và bộ phận cung cấp amoniac được kiểm soát để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ xác định. Do đó, sáng chế có các hiệu quả là các thao tác vô trùng được cho phép cho một loạt các thao tác đo lường trong bể nuôi cấy, và việc nuôi cấy có thể được thực hiện với việc kiểm soát liên tục và một cách tùy ý nồng độ amoniac trong môi trường nuôi cấy mà không lãng phí môi trường nuôi cấy.

Ngoài ra, theo một phương án của sáng chế, nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy được tính, trị số pH trong bể nuôi cấy được đo với bộ cảm biến pH, tổng nồng độ amoniac được tính từ nồng độ amoniac không được ion hóa được tính và trị số pH được đo trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac được lưu trữ trong bộ phận lưu trữ, và khi tổng nồng độ amoniac được tính thấp hơn so với nồng độ định trước, bộ phận cung cấp amoniac được điều khiển cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy. Do đó, sáng chế có các hiệu quả là tổng nồng độ amoniac (tổng nồng độ của NH_3 và NH_4^+) của môi trường nuôi cấy có thể được đo trực tiếp từ trị số pH và nồng độ amoniac không được ion hóa (NH_3) trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac, và do đó việc nuôi cấy có thể được thực hiện với việc còn kiểm soát một cách chính xác nồng độ amoniac.

Ngoài ra, theo sáng chế, bằng cách điều tra tổng nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy, mà đã được thu thập từ bể nuôi cấy và được khuấy đục trong chất lỏng phản ứng kiềm mạnh sao cho ion amoni được chuyển đổi thành amoniac không được ion hóa, bằng cách sử dụng thiết bị đo amoniac phổ biến bên ngoài; và tính nồng độ amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy bằng cách thay thế tổng giá trị nồng độ amoniac nêu trên thành phương trình

phân hủy amoniac và bằng cách sử dụng trị số pH của môi trường nuôi cấy được lưu trữ ở bước đo trị số pH nêu trên, đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa và đầu ra của bộ cảm biến (điện áp) có thể được kiểm tra với nó. Do đó, các lỗi được tạo ra trong khi nuôi cấy có thể được điều chỉnh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A là lưu đồ thể hiện ví dụ về quy trình kiểm soát nồng độ amoniac theo sáng chế.

Fig.1B là lưu đồ thể hiện ví dụ khác về quy trình kiểm soát nồng độ amoniac theo sáng chế.

Fig.2 là sơ đồ cấu hình lý thuyết thể hiện cấu hình cơ bản của sáng chế.

Fig.3 là đồ thị thể hiện ví dụ về đường cong phân ly amoniac được sử dụng cho sáng chế.

Fig.4 là sơ đồ khối logic thể hiện ví dụ về cấu hình của thiết bị kiểm soát amoniac 100 theo sáng chế.

Fig.5 là lưu đồ thể hiện ví dụ về bước xử lý thao tác cơ bản được thực hiện với thiết bị kiểm soát amoniac 100 theo phương án của sáng chế.

Fig.6 là lưu đồ thể hiện chi tiết về ví dụ xử lý được thực hiện với thiết bị kiểm soát amoniac 100 theo phương án của sáng chế.

Fig.7 thể hiện các kết quả của việc kiểm soát nồng độ amoniac thu được trong việc sản xuất arginin (Arg - arginine) được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị của ví dụ.

Fig.8 thể hiện sự tích tụ của Arg trong việc sản xuất Arg được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị của ví dụ.

Fig.9 là lưu đồ thể hiện ví dụ về quy trình kiểm soát nồng độ amoniac thông thường.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, các phương án của thiết bị kiểm soát amoniac và phương pháp kiểm soát amoniac của sáng chế sẽ được giải thích chi tiết dựa vào các hình vẽ.

Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án này.

Khái quát sáng chế

Dưới đây, khái quát về sáng chế sẽ được giải thích dựa vào các hình vẽ Fig.1A, Fig.1B, Fig.2 và Fig.3, và tiếp theo cấu hình, quy trình xử lý, v.v. của sáng chế sẽ được giải thích chi tiết. Fig.1A là lưu đồ thể hiện ví dụ về quy trình kiểm soát nồng độ amoniac theo sáng chế, Fig.1B là lưu đồ thể hiện ví dụ khác về quy trình kiểm soát nồng độ amoniac theo sáng chế, Fig.2 là sơ đồ cấu hình lý thuyết thể hiện cấu hình cơ bản của thiết bị của sáng chế, và Fig.3 là đồ thị thể hiện ví dụ về đường cong phân ly amoniac được sử dụng cho sáng chế.

Phương pháp của sáng chế là phương pháp kiểm soát amoniac để kiểm soát nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy bằng cách sử dụng thiết bị kiểm soát amoniac bao gồm ít nhất bộ phận cung cấp amoniac để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy, bộ cảm biến amoniac mà phản ứng với amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy, và bộ phận kiểm soát được nối với bộ phận cung cấp amoniac và bộ cảm biến amoniac. Như được thể hiện trên Fig.1A, phương pháp của sáng chế bao gồm việc thực hiện quy trình xử lý với thiết bị kiểm soát amoniac trên cơ sở của đầu vào của tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac mà phản ứng với amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy, và đưa ra sự chỉ dẫn tới bộ phận cung cấp amoniac để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy. Thuật ngữ “được nối” đủ để được nối theo chức năng, và có thể được nối bởi hệ thống có dây hoặc không dây.

Phương pháp của sáng chế bao gồm các bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát:

bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa để tính nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy bằng cách thay thế tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac thành đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac, và

bước điều khiển cung cấp amoniac để điều khiển bộ phận cung cấp amoniac cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ định trước.

Phương pháp có thể còn bao gồm bước tạo đường cong chuẩn để tạo ra đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac. Đối với đường cong chuẩn, nó có thể được tạo ra bằng cách cung cấp các dung dịch amoniac ở các nồng độ đã biết, và ngâm điện cực trong các dung dịch để đánh dấu các điện áp được thể hiện bởi điện cực.

Ở bước tạo đường cong chuẩn, đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac được tạo ra. Việc tạo ra này có thể bao gồm việc đọc hết đường cong chuẩn từ bộ phận lưu trữ được bố trí ở thiết bị kiểm soát amoniac, hoặc đưa vào đường cong chuẩn từ bên ngoài.

Bộ cảm biến amoniac phản ứng với amoniac không được phân hủy, và thông thường là bộ cảm biến bao gồm màng lựa chọn amoniac và điện cực bên trong. Tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac không được giới hạn cụ thể miễn là nó là tín hiệu được tạo ra bằng cách phản ứng với amoniac không được ion hóa, và điện áp của điện cực bên trong thường được sử dụng. Tuy nhiên, nó có thể được chuyển đổi thành đặc tính điện khác bằng cách sử dụng mạch điện. Ngoài ra, đặc tính điện như điện áp có thể được sử dụng như tín hiệu tương tự gốc, hoặc như tín hiệu số thu được bằng cách chuyển đổi tương tự sang số.

Đường cong chuẩn có thể được tạo ra bằng cách điều tra trước mối tương quan giữa tín hiệu như vậy và nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy. Đường cong chuẩn được tạo ra như được nêu trên có thể được lưu trữ trong bộ phận lưu trữ. Hình thức lưu trữ không được giới hạn cụ thể, và đường cong chuẩn có thể được lưu trữ dưới dạng bảng, hoặc phương trình số học thể hiện đường cong chuẩn có thể được lưu trữ.

Ở bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa, nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy được tính bằng cách thay thế tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac thành đường cong chuẩn. Khi đường cong chuẩn được lưu trữ dưới dạng bảng, việc tính toán bởi việc thay thế thành đường cong chuẩn có thể được thực hiện bằng cách đọc hết giá trị được ghi ở vị trí tương ứng với giá trị được thay thế của tín hiệu. Khi đường cong chuẩn được lưu trữ là phương trình số học, nó có thể được thực hiện bởi việc tính toán bằng cách thay

thể giá trị được đưa vào của tín hiệu thành phương trình.

Ở bước điều khiển cung cấp amoniac, khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ định trước, bộ phận cung cấp amoniac được kiểm soát để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy.

Bộ phận cung cấp amoniac không được giới hạn cụ thể, miễn là nó có thể kiểm soát việc cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy trên cơ sở của việc kiểm soát được tạo ra ở bước điều khiển cung cấp amoniac. Ví dụ, bộ phận cung cấp amoniac được cấu thành sao cho, tương ứng với việc kiểm soát được tạo ra ở bước điều khiển cung cấp amoniac, van điện từ của đường khí amoniac được mở để cung cấp amoniac.

Amoniacc có thể là amoniacc khí hoặc amoniacc lỏng. Amoniacc cũng có thể được cung cấp dưới dạng dung dịch lỏng của hợp chất mà tạo ra ion amoni khi nó được phân giải, như amoni sulfat. Tốc độ cung cấp amoniacc được cung cấp bởi bộ phận cung cấp amoniacc được lựa chọn sao cho nồng độ amoniacc sẽ không thay đổi nhanh, khi xem xét kích thước của bể nuôi cấy, tần số của các chỉ dẫn được tạo ra ở bước điều khiển cung cấp amoniacc, và v.v.. Tổng nồng độ amoniacc thường được kiểm soát là 1 tới 350mM, mong muốn hơn là 2,5 tới 300mM, vẫn mong muốn hơn là 2,5 tới 200mM, vẫn mong muốn hơn là 3 tới 100mM, vẫn mong muốn hơn là 3 tới 50mM về amoniacc.

Phương án chỉ dẫn có thể là đầu ra của tín hiệu điện mà trực tiếp thao tác phương tiện như van của bộ phận cung cấp amoniacc được bao gồm trong việc kiểm soát cung cấp amoniacc, hoặc khi bộ phận cung cấp amoniacc có chức năng truyền thông, nó có thể là đầu ra của tín hiệu truyền thông để kiểm soát van hoặc tương tự bởi chức năng truyền thông.

Thiết bị kiểm soát amoniacc của sáng chế có thể còn được nối với bộ cảm biến pH để đo trị số pH của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy. Theo phương án này, phương pháp của sáng chế còn bao gồm bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát:

bước tính tổng nồng độ amoniacc để tính tổng nồng độ amoniacc từ nồng độ amoniacc không được ion hóa được tính ở bước tính nồng độ amoniacc không được ion hóa và trị số pH từ bộ cảm biến pH trên cơ sở của đường cong phân ly

amoniac thể hiện các tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ ion amoni trong môi trường nuôi cấy ở mỗi trị số pH, và

ở bước điều khiển cung cấp amoniac, tổng nồng độ amoniac được sử dụng thay cho nồng độ amoniac không được ion hóa.

Mối tương quan của các tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ ion amoni trong môi trường nuôi cấy ở mỗi trị số pH có thể được tính về mặt lý thuyết, hoặc được đo về mặt thực tế. Trên cơ sở của mối tương quan này, đường cong phân ly có thể được tạo ra.

Đường cong phân ly được tạo ra như được nêu trên được lưu trữ trong bộ phận lưu trữ. Phương án lưu trữ không được giới hạn cụ thể, và đường cong phân ly có thể được lưu trữ dưới dạng bảng hai chiều, hoặc phương trình số học thể hiện đường cong phân ly có thể được lưu trữ. Ngoài ra, nó có thể được lưu trữ cùng với đường cong chuẩn được lưu trữ ở bước lưu trữ đường cong chuẩn dưới dạng bảng, hoặc phương trình số học thể hiện đường cong phân ly kết hợp với đường cong chuẩn có thể được tạo ra và được lưu trữ.

Đường cong phân ly amoniac sẽ được giải thích dựa vào Fig.3. Trên Fig.3, trục đứng chỉ báo tỷ lệ hiện thời (%) của amoniac không được ion hóa (NH_3) và ion amoni (NH_4^+) trong bể nuôi cấy, và trục ngang chỉ báo trị số pH trong bể nuôi cấy. Các đường cong được thể hiện trên đồ thị của Fig.3 là các đường cong phân ly của amoniac không được ion hóa (NH_3) và ion amoni (NH_4^+) ở các trị số pH khác nhau. Như được thể hiện trên Fig.3, amoniac không được ion hóa (NH_3) và ion amoni (NH_4^+) tồn tại ở các lượng tương đương đáng kể khoảng pH 9, và khi trị số pH trở nên cao hơn, amoniac không được ion hóa (NH_3) tăng lên, trong khi ion amoni (NH_4^+) giảm xuống. Amoniac không được ion hóa và ion amoni lần lượt tương tự như amoniac không được phân hủy (NH_3) và amoniac được phân hủy (NH_4^+).

Như được mô tả ở trên, trong việc lên men thông thường, trị số pH của môi trường nuôi cấy nằm trong phạm vi axit yếu đến kiềm yếu (khoảng pH 5 tới 9), vì vậy hầu hết phần amoniac tồn tại trong môi trường nuôi cấy tồn tại là ion amoni (NH_4^+), và do đó thường không thể đạt được tổng nồng độ amoniac (tổng nồng độ của NH_3 và NH_4^+) trong môi trường nuôi cấy chỉ bằng cách đo nồng độ

của amoniac không được ion hóa (NH_3). Tuy nhiên, theo sáng chế, đường cong phân ly amoniac được tạo ra trước cho môi trường nuôi cấy để được sử dụng như bước tiền xử lý, và do đó tổng nồng độ amoniac (tổng nồng độ của NH_3 và NH_4^+) có thể được tính từ nồng độ amoniac không được ion hóa (NH_3) trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac.

Ở bước tính tổng nồng độ amoniac, tổng nồng độ amoniac được tính từ nồng độ amoniac không được ion hóa được tính ở bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa và trị số pH được đo với bộ cảm biến pH trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac. Khi đường cong phân ly amoniac được lưu trữ dưới dạng bảng, việc tính toán từ nồng độ amoniac không được ion hóa và trị số pH trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac có thể được thực hiện bằng cách đọc hết giá trị được ghi ở địa chỉ tương ứng với nồng độ amoniac không được ion hóa được đưa vào và trị số pH được đưa vào. Khi phương trình số học được lưu trữ, việc tính toán có thể được thực hiện bởi việc tính toán bằng cách thay thế các giá trị được đưa vào phương trình.

Ví dụ về việc tính toán của tổng nồng độ amoniac được thể hiện ở các mục từ (1) tới (3) dưới đây.

(1) Thứ nhất, bằng cách thay thế điện áp của bộ cảm biến amoniac trong bể nuôi cấy (ví dụ, 0,5 V) thành phương trình số học thể hiện đường cong chuẩn, nồng độ amoniac không được ion hóa (ví dụ, 30mM) được tính.

(2) Tiếp theo, bằng cách thay thế trị số pH trong bể nuôi cấy được đo với bộ cảm biến pH (ví dụ, pH 6) thành phương trình số học thể hiện đường cong phân ly, tỷ lệ hiện thời của amoniac không được ion hóa (ví dụ, 40%) được ước tính.

(3) Bằng cách sử dụng tỷ lệ hiện thời được ước tính của amoniac không được ion hóa (ví dụ, 40%) và nồng độ amoniac không được ion hóa được tính ở (1) (ví dụ, 30mM), việc tính toán được thực hiện, chẳng hạn, như sau: " $30\text{mM} \times (100/40) = 75\text{mM}$ ", để tính tổng nồng độ amoniac (75mM trong trường hợp này).

Ở bước điều khiển cung cấp amoniac, khi nồng độ amoniac không được ion hóa thấp hơn so với nồng độ định trước, bộ phận cung cấp amoniac được kiểm soát để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy. Ngoài ra, khi tổng nồng độ amoniac thấp hơn so với nồng độ định trước, bộ phận cung cấp amoniac có thể

được kiểm soát để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy.

Thiết bị kiểm soát amoniac có thể còn được nối với bộ cảm biến amoniac bên ngoài được bố trí bên ngoài bể nuôi cấy. Bằng cách đo điện áp của bộ cảm biến amoniac bên ngoài cho môi trường nuôi cấy mà đã được thu thập từ bể nuôi cấy và được khuấy đục trong chất lỏng phản ứng kiềm mạnh sao cho ion amoni được chuyển đổi thành amoniac không được ion hóa, đường cong chuẩn có thể được kiểm tra sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa được tính bằng cách thay thế điện áp đo được thành các lượng đường cong chuẩn tới tổng nồng độ amoniac được tính.

Chức năng tự động tính tổng nồng độ amoniac trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac bằng cách sử dụng trị số pH được đo thực tế của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy có thể được sử dụng chỉ cho việc kiểm tra, và nồng độ amoniac thực tế trong bể nuôi cấy có thể được kiểm soát trên cơ sở của nồng độ amoniac không được ion hóa (NH_3).

Ngoài ra, theo sáng chế, khi việc kiểm tra được thực hiện, đường cong chuẩn có thể được kiểm tra sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa được tính bằng cách thay thế điện áp được đo bởi bộ cảm biến amoniac bên ngoài cho môi trường nuôi cấy được lấy mẫu mà đã được khuấy đục trong chất lỏng phản ứng kiềm mạnh (ví dụ, NaOH) sao cho amoniac trong môi trường nuôi cấy được chuyển đổi thành amoniac không được ion hóa thành đường cong chuẩn, các lượng tới tổng nồng độ amoniac được tính bởi việc tính tổng nồng độ amoniac.

Nói chung, thiết bị của sáng chế có cấu hình cơ bản dưới đây. Nghĩa là, thiết bị kiểm soát amoniac bao gồm ít nhất bộ phận cung cấp amoniac mà cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy, bộ cảm biến amoniac mà phản ứng với amoniac không được phân hủy trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy, và bộ phận kiểm soát được nối với bộ phận cung cấp amoniac và bộ cảm biến amoniac. Bộ phận cung cấp amoniac có thể được lắp vào để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy. Bộ cảm biến amoniac được lắp vào để phản ứng với amoniac không được phân hủy trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy. Như được thể hiện trên Fig.2, thiết bị kiểm soát amoniac của sáng chế có thể được tạo kết cấu để được nối với bộ phận cung cấp amoniac mà cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy, và bộ cảm biến amoniac mà phản ứng với amoniac

không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy, và bao gồm bộ phận lưu trữ và bộ phận kiểm soát. Thuật ngữ “được nối” đủ để được nối theo chức năng, và có thể được nối bởi hệ thống có dây hoặc không dây.

Bộ phận kiểm soát bao gồm:

phương tiện tạo đường cong chuẩn để tạo ra đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac,

phương tiện tính nồng độ amoniac không được ion hóa để tính nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy từ tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac trên cơ sở của đường cong chuẩn, và

phương tiện điều khiển cung cấp amoniac để điều khiển bộ phận cung cấp amoniac cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy khi nồng độ amoniac không được ion hóa thấp hơn so với nồng độ định trước.

Bộ phận kiểm soát có thể bao gồm:

bộ phận lưu trữ được tạo kết cấu để lưu trữ đường cong chuẩn định trước, hoặc phương tiện tạo đường cong chuẩn được tạo kết cấu để tạo ra đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac,

phương tiện tính nồng độ amoniac không được ion hóa được tạo kết cấu để tính nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy từ tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac trên cơ sở của đường cong chuẩn, và

phương tiện điều khiển cung cấp amoniac được tạo kết cấu để điều khiển bộ phận cung cấp amoniac cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ định trước.

Thiết bị của sáng chế có thể còn bao gồm phương tiện tính tổng nồng độ amoniac để tính tổng nồng độ amoniac từ nồng độ amoniac không được ion hóa được tính với phương tiện tính nồng độ amoniac không được ion hóa và trị số pH từ bộ cảm biến pH trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac thể hiện các tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ ion amoni trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy ở mỗi trị số pH.

Phương tiện tính tổng nồng độ amoniac có thể được tạo kết cấu để tính tổng nồng độ amoniac từ nồng độ amoniac không được ion hóa được tính bởi phương tiện tính nồng độ amoniac không được ion hóa và trị số pH từ bộ cảm biến pH trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac thể hiện tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ ion amoni trong môi trường nuôi cấy ở mỗi trị số pH.

Các bộ phận của các phương tiện này tương tự như các bộ phận được giải thích cho các bước của phương pháp của sáng chế.

Bộ phận kiểm soát có thể còn bao gồm:

Phương tiện kiểm tra được tạo kết cấu để kiểm tra đường cong chuẩn sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa được tính từ tín hiệu để kiểm tra trên cơ sở của các lượng đường cong chuẩn tới tổng nồng độ amoniac được tính bởi phương tiện tính tổng nồng độ amoniac, và

trong đó phương tiện kiểm tra được tạo kết cấu để sử dụng tín hiệu cho việc kiểm tra mà có thể là:

tín hiệu thu được với bộ cảm biến amoniac bên ngoài được bố trí bên ngoài bể nuôi cấy để đo nồng độ amoniac không được ion hóa, và

thu được bằng cách đo nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy, mà, sau khi thu thập từ bể nuôi cấy, được tạo kiềm một cách đầy đủ để chuyển hóa ion amoni thành amoniac không được ion hóa với bộ cảm biến amoniac bên ngoài.

Bộ phận kiểm soát có thể còn được lắp vào để đưa vào tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac bên ngoài, như tín hiệu để kiểm tra.

Thiết bị kiểm soát amoniac có thể được tạo kết cấu để giữ tổng nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy nằm trong phạm vi định trước.

Thiết bị kiểm soát amoniac có thể còn bao gồm giao diện người dùng.

Thiết bị kiểm soát amoniac có thể được tạo kết cấu để kiểm soát amoniac theo thời gian thực trong môi trường nuôi cấy, tốt hơn là theo thời gian thực trong việc kiểm soát amoniac tại chỗ trong môi trường nuôi cấy.

Thiết bị kiểm soát amoniac có thể được lắp vào để kiểm soát amoniac

trong môi trường nuôi cấy của một hoặc nhiều bể nuôi cấy, tùy chọn từ 1 tới 10 bể nuôi cấy.

Thiết bị kiểm soát amoniac có thể được lắp vào để kiểm soát amoniac trong môi trường nuôi cấy ở các khoảng thời gian 5 phút hoặc ít hơn, tốt hơn là 1 giây hoặc ít hơn.

Thiết bị kiểm soát amoniac có thể được lắp vào để kiểm tra đường cong chuẩn ở các khoảng thời gian 12 tiếng hoặc ít hơn, tốt hơn là 8 tiếng hoặc ít hơn.

Thiết bị kiểm soát amoniac có thể được lắp vào để kiểm soát amoniac cho ít nhất một phần giai đoạn nuôi cấy hoặc toàn bộ giai đoạn nuôi cấy.

Thời gian thực hoặc thời gian thực tại chỗ được sử dụng ở đây nghĩa là việc kiểm soát nồng độ amoniac trong thời gian định trước, nghĩa là, đo nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy và cung cấp amoniac vào môi trường trong khoảng thời gian định trước. Ví dụ, như đối với thời gian để đo amoniac, nó có thể được lắp vào để đo ở các khoảng thời gian 5 phút hoặc ít hơn, 3 phút hoặc ít hơn, 1 phút hoặc ít hơn, hoặc 30 giây hoặc ít hơn. Như đối với thời gian để cung cấp amoniac, nó có thể được lắp vào để cung cấp trong 1 phút hoặc ít hơn, 30 giây hoặc ít hơn, 10 giây hoặc ít hơn, 5 giây hoặc ít hơn, hoặc 1 giây hoặc ít hơn.

Như đối với thời gian của toàn bộ việc kiểm soát, nó có thể được lắp vào để kiểm soát ở các khoảng thời gian 5 phút hoặc ít hơn, 3 phút hoặc ít hơn, 1 phút hoặc ít hơn, 30 giây hoặc ít hơn, hoặc 1 giây hoặc ít hơn.

Thời gian và khoảng thời gian có thể được lựa chọn tùy thuộc vào tốc độ thay đổi nồng độ của amoniac không được ion hóa hoặc tổng nồng độ amoniac mà có thể xảy ra trong môi trường nuôi cấy trong bể nuôi cấy trong khi nuôi cấy. Ví dụ, nó có thể được lắp vào để cho phép sự thay đổi ở nồng độ của amoniac không được ion hóa ở môi trường nuôi cấy trong khi nuôi cấy là 0,5mM hoặc ít hơn, 0,2mM hoặc ít hơn, 0,1mM hoặc ít hơn trong khoảng thời gian đo, hoặc được lắp vào để cho phép sự thay đổi trong tổng nồng độ amoniac ở môi trường nuôi cấy trong khi nuôi cấy là 80mM hoặc ít hơn, 20mM hoặc ít hơn, 10mM hoặc ít hơn trong khoảng thời gian đo.

Dưới đây, ví dụ về cấu hình của thiết bị kiểm soát amoniac sẽ được giải thích.

Cấu hình của thiết bị kiểm soát amoniac 100

Fig.4 là sơ đồ khối logic thể hiện ví dụ về cấu hình của thiết bị kiểm soát amoniac 100 mà sáng chế được áp dụng tới, và về mặt khái niệm nó thể hiện chỉ một phần cấu hình liên quan đến sáng chế.

Như được thể hiện trên Fig.4, thiết bị kiểm soát amoniac 100 của sáng chế được nối với bể nuôi cấy 200, bộ phận cung cấp amoniac 300 cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy 200, bộ cảm biến amoniac 10 được đưa vào bể nuôi cấy 200 và đo điện áp đầu ra, và bộ cảm biến pH 20 được đưa vào bể nuôi cấy 200 và đo trị số pH. Ngoài ra, thiết bị kiểm soát amoniac 100 bao gồm bộ phận kiểm soát 102, như CPU, mà kiểm soát liên khối toàn bộ thiết bị kiểm soát amoniac 100, bộ phận đưa ra kiểm soát 104 được nối với bộ phận cung cấp amoniac 300 v.v., bộ phận đưa vào tín hiệu 108 được nối với bộ cảm biến amoniac 10, bộ cảm biến amoniac bên ngoài 12, bộ cảm biến pH 20, v.v., và bộ phận lưu trữ 106 lưu trữ các loại cơ sở dữ liệu khác nhau, các bảng, và v.v., và các bộ phận này được nối có thể truyền thông nhờ các kênh truyền thông tùy ý.

Trên Fig.4, bộ phận cung cấp amoniac 300 bao gồm ít nhất bể amoniac 30 mà chứa amoniac bên trong, van 32 mà điều chỉnh lượng amoniac được cung cấp từ bể amoniac 30, và công tắc 31 mà kiểm soát việc mở và việc đóng của van 32. Bộ phận cung cấp amoniac 300 này có chức năng cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy 200 theo các chỉ dẫn được gửi từ thiết bị kiểm soát amoniac 100.

Trên Fig.4, bể nuôi cấy 200 chứa môi trường nuôi cấy bên trong, và được nối với thiết bị kiểm soát amoniac 100 nhờ bộ cảm biến amoniac 10 và bộ cảm biến pH 20, mà được đưa vào bể nuôi cấy 200. Ngoài ra, bể nuôi cấy 200 được nối với bộ phận cung cấp amoniac 300 nhờ ống để cung cấp amoniac từ bể amoniac 30 hoặc tương tự. Fig.4 thể hiện bể nuôi cấy 200 được nối với cốc để lấy mẫu hoặc tương tự mà bộ cảm biến amoniac bên ngoài 12 được đưa vào bên trong nhờ ống để thu thập mẫu của môi trường nuôi cấy như ví dụ. Tuy nhiên, bể nuôi cấy 200 có thể không cần được nối với cốc như vậy, và người sử dụng có thể thu thập mẫu từ bể nuôi cấy 200, và bộ cảm biến amoniac bên ngoài 12 có thể được sử dụng cho cốc hoặc loại tương tự mà mẫu được di chuyển tới.

Trên Fig.4, bộ phận lưu trữ 106 của thiết bị kiểm soát amoniac 100 mà

lưu trữ các loại cơ sở dữ liệu khác nhau, các bảng, các tập tin (tập tin đường cong phân ly amoniac 106a tới tập tin tổng nồng độ amoniac 106e) bao gồm phương tiện lưu trữ như ổ đĩa cố định, và lưu trữ các loại chương trình khác nhau, các bảng, các tập tin, các cơ sở dữ liệu, và v.v. được sử dụng cho các bước xử lý khác nhau.

Trong số các bộ phận này của bộ phận lưu trữ 106, tập tin đường cong phân ly amoniac 106a là phương tiện lưu trữ đường cong phân ly amoniac mà lưu trữ đường cong phân ly amoniac thể hiện các tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ ion amoni trong bể nuôi cấy 200 ở mỗi trị số pH, mà được tạo ra bởi bước xử lý được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát 102.

Ngoài ra, tập tin đường cong chuẩn 106b là phương tiện lưu trữ đường cong chuẩn mà tạo ra và lưu trữ đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy 200 và điện áp của bộ cảm biến amoniac 10.

Ngoài ra, tập tin nồng độ amoniac không được ion hóa 106c là phương tiện lưu trữ nồng độ amoniac không được ion hóa mà lưu trữ nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy 200 được đo với bộ cảm biến amoniac 10, bởi bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b bằng cách đo điện áp của bộ cảm biến amoniac 10 và thay thế điện áp thành đường cong chuẩn.

Ngoài ra, tập tin trị số pH 106d là phương tiện lưu trữ trị số pH mà lưu trữ trị số pH của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy 200 được đo bởi bộ phận đo trị số pH 102c với bộ cảm biến pH 20.

Ngoài ra, tập tin tổng nồng độ amoniac 106e là phương tiện lưu trữ tổng nồng độ amoniac mà lưu trữ tổng nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy 200 được tính bởi bộ phận tính tổng nồng độ amoniac 102d từ nồng độ amoniac không được ion hóa được lưu trữ trong tập tin nồng độ amoniac không được ion hóa 106c và trị số pH được lưu trữ trong tập tin trị số pH 106d trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac được lưu trữ trong tập tin đường cong phân ly amoniac 106a.

Ngoài ra, trên Fig.4, bộ phận đưa ra kiểm soát 104 kiểm soát các truyền thông giữa thiết bị kiểm soát amoniac 100 và bộ phận cung cấp amoniac 300.

Nghĩa là, bộ phận đưa ra kiểm soát 104 có chức năng truyền thông truyền tín hiệu để mở và đóng van 32 bằng cách kiểm soát công tắc 31 của bộ phận cung cấp amoniac 200 sao cho bộ phận cung cấp amoniac 300 cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy 200 theo lượng được kiểm soát bởi thiết bị kiểm soát amoniac 100.

Ngoài ra, trên Fig.4, bộ phận đưa vào tín hiệu 108 kiểm soát bộ cảm biến amoniac 10, bộ cảm biến amoniac bên ngoài 12, và bộ cảm biến pH 20. Bộ cảm biến amoniac 10 là bộ cảm biến để đo nồng độ amoniac không được ion hóa (NH_3) trong số amoniac được chứa trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy 200, và bao gồm, chẳng hạn, điện cực ion hoặc tương tự. Ngoài ra, bộ cảm biến amoniac 10 này có thể được nối với bộ khuếch đại NH_3 11 để khuếch đại tín hiệu thể hiện nồng độ amoniac không được ion hóa (NH_3) được đo trong bể nuôi cấy 200, và truyền nó tới bộ phận đưa vào tín hiệu 108. Do bộ cảm biến amoniac bên ngoài 12 và bộ khuếch đại NH_3 13 giống nhau, các phần giải thích của nó được bỏ qua. Ngoài ra, bộ cảm biến pH 20 là bộ cảm biến để đo trị số pH của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy 200, và bao gồm, chẳng hạn, điện cực pH hoặc tương tự. Ngoài ra, bộ cảm biến pH 20 này có thể được cấu thành sao cho được nối với bộ khuếch đại 21 mà khuếch đại tín hiệu thể hiện trị số pH được đo trong bể nuôi cấy 200, và truyền nó tới bộ phận đưa vào tín hiệu 108.

Ngoài ra, trên Fig.4, bộ phận kiểm soát 12 có bộ nhớ trong để lưu trữ các chương trình kiểm soát, như OS (Operating System - Hệ điều hành), các chương trình mà định rõ các loại bước xử lý khác nhau, và dữ liệu cần thiết, và thực hiện các bước xử lý thông tin để thực hiện các quy trình xử lý khác nhau với các chương trình này, và v.v.. Bộ phận kiểm soát 102 được cấu thành, theo ý nghĩa khái niệm và chức năng, sao cho bao gồm bộ phận tạo đường cong chuẩn 102a, bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b, bộ phận đo trị số pH 102c, bộ phận tính tổng nồng độ amoniac 102d, bộ phận điều khiển cung cấp amoniac 102e, điện áp để kiểm tra bộ phận đo 102f, và bộ phận kiểm tra 102g.

Trong số các bộ phận này, bộ phận tạo đường cong chuẩn 102a là phương tiện tạo đường cong chuẩn mà tạo ra đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy 200 và điện áp của bộ cảm biến amoniac 10.

Ngoài ra, bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b là phương tiện tính nồng độ amoniac không được ion hóa mà tính nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy 200 bằng cách thay thế điện áp của bộ cảm biến amoniac 10 thành đường cong chuẩn.

Ngoài ra, bộ phận đo trị số pH 102c là phương tiện đo trị số pH để đo trị số pH của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy 200 với bộ cảm biến pH 20.

Ngoài ra, bộ phận tính tổng nồng độ amoniac 102d là phương tiện tính tổng nồng độ amoniac để tính tổng nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy 200 từ nồng độ amoniac không được ion hóa được lưu trữ trong tập tin nồng độ amoniac không được ion hóa 106c và trị số pH được lưu trữ trong tập tin trị số pH 106d trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac được lưu trữ trong tập tin đường cong phân ly amoniac 106a.

Ngoài ra, bộ phận điều khiển cung cấp amoniac 102e là phương tiện điều khiển cung cấp amoniac mà điều khiển bộ phận cung cấp amoniac 300 cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy 200, khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính bởi bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b thấp hơn so với nồng độ định trước. Ngoài ra, bộ phận điều khiển cung cấp amoniac 102e có thể điều khiển bộ phận cung cấp amoniac 300 cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy 200, khi tổng nồng độ amoniac được tính bởi bộ phận tính tổng nồng độ amoniac 102d thấp hơn so với nồng độ định trước.

Ngoài ra, điện áp để kiểm tra bộ phận đo 102f là điện áp để kiểm tra phương tiện đo để đo điện áp cho môi trường nuôi cấy mà đã được thu thập từ bể nuôi cấy 200, và được khuấy đục trong chất lỏng phản ứng kiềm mạnh (ví dụ, NaOH) sao cho ion amoni được chuyển đổi thành amoniac không được ion hóa với bộ cảm biến amoniac bên ngoài 12.

Ngoài ra, bộ phận kiểm tra 102g là phương tiện kiểm tra để kiểm tra đường cong chuẩn được lưu trữ trong tập tin đường cong chuẩn 106b sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa được tính bằng cách thay thế điện áp được đo với điện áp để kiểm tra bộ phận đo 102f thành đường cong chuẩn, các lượng tới tổng nồng độ amoniac được tính bởi việc tính tổng nồng độ amoniac.

Bước xử lý được thực hiện bởi thiết bị kiểm soát amoniac 100

Dưới đây, ví dụ về bước xử lý được thực hiện bởi thiết bị kiểm soát amoniac 100 được cấu thành như được nêu trên sẽ được giải thích chi tiết dựa vào Fig.5 và Fig.6. Fig.5 là lưu đồ thể hiện ví dụ về bước xử lý thao tác cơ bản được thực hiện bởi thiết bị kiểm soát amoniac 100 theo phương án này, và Fig.6 là lưu đồ thể hiện chi tiết về ví dụ xử lý được thực hiện bởi thiết bị kiểm soát amoniac 100 theo phương án này.

Bước xử lý thao tác cơ bản

Thứ nhất, ví dụ về bước xử lý thao tác cơ bản được thực hiện bởi thiết bị kiểm soát amoniac 100 theo phương án này sẽ được giải thích dựa vào Fig.5.

Bước tiền xử lý

Như được thể hiện trên Fig.5, với bước tiền xử lý, bộ phận kiểm soát 102 có thể tạo ra đường cong phân ly amoniac (dựa vào Fig.3) mà thể hiện tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ ion amoni trong bể nuôi cấy 200 ở mỗi trị số pH, và lưu trữ nó trong tập tin đường cong phân ly amoniac 106a (bước SB-1). Nghĩa là, bộ phận kiểm soát 102 có thể tạo ra đường cong phân ly amoniac bằng cách tính các tỷ lệ hiện thời của amoniac không được ion hóa và ion amoni ở các trị số pH khác nhau trên cơ sở của việc phân hủy amoniac ổn định, và đánh dấu các giá trị được tính như đồ thị.

Bước xử lý chính

Tiếp theo, bộ phận tạo đường cong chuẩn 102a tạo ra đường cong chuẩn mà thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy 200 và điện áp của bộ cảm biến amoniac 10 (bước SB-2).

Tiếp theo, bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b tính nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy 200 bằng cách thay thế điện áp của bộ cảm biến amoniac 10 thành đường cong chuẩn (bước SB-3). Tiếp theo, quy trình xử lý đến bước xử lý ở bước SB-6.

Ở bước SB-3 nêu trên, sau khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính bởi bước xử lý ở bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b, các bước xử lý ở bước SB-4 và bước SB-5 có thể được thực hiện.

Bộ phận đo trị số pH 102c nêu trên có thể đo trị số pH của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy 200 với bộ cảm biến pH 20 (bước SB-4). Ngoài ra, bộ phận tính tổng nồng độ amoniac 102d có thể tính tổng nồng độ amoniac từ nồng độ amoniac không được ion hóa được tính bởi bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b và trị số pH được đo với bộ phận đo trị số pH 102c trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac được lưu trữ trong tập tin đường cong phân ly amoniac 106a (bước SB-5).

Tiếp theo, bộ phận kiểm soát 102 đánh giá xem nồng độ amoniac không được ion hóa được đo bởi bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b có thấp hơn so với nồng độ định trước hay không (bước SB-6). Bộ phận kiểm soát 102 có thể đánh giá xem tổng nồng độ amoniac được đo bởi bộ phận đo tổng amoniac 102d có thấp hơn so với nồng độ định trước hay không (bước SB-6).

Tiếp theo, khi bộ phận kiểm soát 102 đánh giá rằng nồng độ amoniac không được ion hóa được đo bởi bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b ở bước SB-3 thấp hơn so với nồng độ định trước (bước SB-6, Có), bộ phận điều khiển cung cấp amoniac 102e kiểm soát bộ phận cung cấp amoniac 300 cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy 200 (bước SB-7). Bộ phận điều khiển cung cấp amoniac 102e có thể điều khiển bộ phận cung cấp amoniac 300 cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy 200, khi bộ phận kiểm soát 102 đánh giá rằng tổng nồng độ amoniac được đo bởi bộ phận đo tổng amoniac 102d thấp hơn so với nồng độ định trước (bước SB-6, Có) (bước SB-7).

Mặt khác, khi bộ phận kiểm soát 102 đánh giá rằng nồng độ amoniac không được ion hóa được đo bởi bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b không thấp hơn so với nồng độ định trước (bước SB-6, Không), quy trình xử lý quay lại bước xử lý ở bước SB-3.

Ngoài ra, khi bộ phận kiểm soát 102 đánh giá rằng tổng nồng độ amoniac được đo bởi bộ phận đo tổng amoniac 102d không thấp hơn so với nồng độ định trước (bước SB-6, Không), các bước xử lý của các bước từ bước SB-8 tới bước SB-10 có thể được thực hiện.

Bộ phận kiểm soát 102 có thể đánh giá xem đường cong chuẩn được tạo

ra ở bước SB-2 có được kiểm tra hay không (bước SB-8). Mặc dù Fig.5 thể hiện ví dụ trong đó xem quy trình kiểm tra được bắt đầu được đánh giá sau khi cung cấp amoniac được kiểm soát hay không (bước SB-6), việc đánh giá có thể được thực hiện ở bất kỳ thời gian nào theo đầu vào của người sử dụng, hoặc có thể được thực hiện tự động cho mọi giai đoạn được thiết đặt trước.

Ngoài ra, khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng việc kiểm tra được thực hiện (bước SB-8, Có), điện áp để kiểm tra bộ phận đo 102f có thể đo điện áp của bộ cảm biến amoniac bên ngoài 12 cho môi trường nuôi cấy mà đã được thu thập từ bể nuôi cấy 200, và được khuấy đục trong chất lỏng phản ứng kiềm mạnh (ví dụ, NaOH) sao cho ion amoni được chuyển đổi thành amoniac không được ion hóa (bước SB-9).

Ngoài ra, bộ phận kiểm tra 102g có thể kiểm tra đường cong chuẩn sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa được tính bằng cách thay thế điện áp được đo bởi điện áp để kiểm tra bộ phận đo 102f thành đường cong chuẩn được lưu trữ trong tập tin đường cong chuẩn 106b, các lượng tới tổng nồng độ amoniac được tính bởi việc tính tổng nồng độ amoniac (bước SB-10).

Mặt khác, khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng việc kiểm tra không được thực hiện (bước SB-8, Không), quy trình xử lý quay lại bước xử lý ở bước SB-3.

Các bước xử lý thao tác cơ bản này (bước SB-2 tới bước SB-10) được thực hiện lặp lại trong khi nuôi cấy. Do đó, nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy 200 có thể được kiểm soát, và việc nuôi cấy có thể được thực hiện với việc kiểm soát liên tục và một cách tùy ý nồng độ amoniac trong môi trường nuôi cấy. Đến đây, phần giải thích của các bước xử lý thao tác cơ bản của thiết bị kiểm soát amoniac 100 của sáng chế được kết thúc.

Mô tả chi tiết quy trình kiểm soát amoniac

Dưới đây, phần mô tả chi tiết của ví dụ về quy trình xử lý được thực hiện bởi thiết bị kiểm soát amoniac 100 theo phương án này của sáng chế sẽ được giải thích dựa vào Fig.6.

Như được thể hiện trên Fig.6, bộ phận kiểm soát 102 đánh giá xem đường cong phân ly amoniac được tạo ra và/hoặc tổng nồng độ amoniac được tính có

được kiểm tra hay không (bước SC-1). Nội dung của bước xử lý ở bước SC-1 này tương tự như nội dung của bước xử lý ở bước SB-7 được thể hiện trên Fig.5. Ngoài ra, như được nêu trên, xem quy trình kiểm tra này được bắt đầu có thể được đánh giá ở bất kỳ thời gian nào theo đầu vào của người sử dụng hay không, hay được đánh giá tự động cho mọi giai đoạn được thiết đặt trước.

Tiếp theo, khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng việc kiểm tra được thực hiện (bước SC-1, Có), đường cong chuẩn được tạo ra cho môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy 200 (bước SC-2).

"Đường cong chuẩn" nêu trên là phương trình tương quan thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy 200 và điện áp đo được với bộ cảm biến amoniac 10, và theo phương án này, nó được sử dụng để đo nồng độ amoniac không được ion hóa (C) bằng cách thay thế điện áp đo được với bộ cảm biến amoniac 10 ở bước SC-7 và bước SC-10 được mô tả dưới đây thành đường cong chuẩn.

Mặt khác, khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng việc kiểm tra không được thực hiện (bước SC-1, Không), quy trình xử lý đến bước xử lý ở bước SC-3.

Tiếp theo, bộ phận kiểm soát 102 đánh giá xem thông số kiểm soát cho bể nuôi cấy 200 được thay đổi hay không (bước SC-3).

Thông số kiểm soát nêu trên là, chẳng hạn, giá trị SV (Set value - giá trị thiết đặt), giá trị TC (Time Cycle - Chu kỳ thời gian), giá trị ON (On Time - Đúng giờ), hoặc tương tự. Giá trị SV là giá trị được thiết đặt lại của tổng nồng độ amoniac hoặc nồng độ amoniac không được ion hóa (mM) để được kiểm soát. Ngoài ra, giá trị TC thể hiện chu kỳ để đánh giá việc cung cấp amoniac (giây). Ngoài ra, giá trị ON thể hiện thời gian (giây) để thực hiện việc cung cấp amoniac trong một chu kỳ. Cụ thể là, khi các thông số kiểm soát được thiết đặt, chẳng hạn, như sau: Giá trị SV = 50mM, giá trị TC = 10 giây, và giá trị ON = 1 giây, xem amoniac có được cung cấp hay không được đánh giá một lần trong 10 giây, và nếu nồng độ amoniac được đo thực tế cao hơn so với 50mM, amoniac không được cung cấp. Nghĩa là, van điện từ của cửa nạp cho khí amoniac được duy trì để được đóng. Ngoài ra, khi nồng độ amoniac được đo thực tế thấp hơn so với

50mM, amoniac được cung cấp trong 1 giây. Nghĩa là, van điện từ được mở.

Khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng thông số kiểm soát được thay đổi (bước SC-3, Có), giá trị thông số kiểm soát được đưa vào (bước SC-4).

Mặt khác, khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng thông số kiểm soát không được thay đổi (bước SC-3, Không), quy trình xử lý đến bước xử lý ở bước SC-5.

Tiếp theo, bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b kết hợp với tốc độ điện áp (A) của bộ cảm biến amoniac 10 (ví dụ, điện cực ion) được đưa vào bể nuôi cấy 200 (bước SC-5). Nghĩa là, bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b đo điện áp của bộ cảm biến amoniac 10.

Tiếp theo, bộ phận đo trị số pH 102c kết hợp với trị số pH (B) từ điện cực pH của bộ cảm biến pH 20 được đưa vào bể nuôi cấy 200 (bước SC-6). Nghĩa là, bộ phận đo trị số pH 102c đo trị số pH (B) của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy 200 với bộ cảm biến pH 20.

Tiếp theo, bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b tính nồng độ amoniac không được ion hóa (C) bằng cách thay thế điện áp (A) được kết hợp ở bước SC-5 thành đường cong chuẩn được tạo ra ở bước SC-2 (bước SC-7). Nghĩa là, bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa 102b tính nồng độ amoniac không được ion hóa (C) trong bể nuôi cấy 200 bằng cách thay thế điện áp của bộ cảm biến amoniac 10 thành đường cong chuẩn.

Tiếp theo, bộ phận tính tổng nồng độ amoniac 102d tính tổng nồng độ amoniac (D) trên cơ sở của trị số pH (B) được kết hợp ở bước SC-6, nồng độ amoniac (C) được tính ở bước SC-7, và đường cong phân ly amoniac (dựa vào Fig.3) được tạo ra bởi bộ phận kiểm soát 102 như bước tiền xử lý (bước SC-8). Nghĩa là, bộ phận tính tổng nồng độ amoniac 102d tính tổng nồng độ amoniac (D) trong bể nuôi cấy 200 từ nồng độ amoniac không được ion hóa (C) được lưu trữ trong tập tin amoniac không được ion hóa 106c và trị số pH (B) được lưu trữ trong tập tin trị số pH 106d trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac được lưu trữ trong tập tin đường cong phân ly amoniac 106a.

Tiếp theo, bộ phận kiểm soát 102 đánh giá xem việc điều chỉnh một điểm có được thực hiện hay không (bước SC-9).

"Việc điều chỉnh một điểm" nêu trên là một trong các phương pháp để tiêu chuẩn hóa, và tiêu chuẩn hóa mục tiêu bằng cách sử dụng mẫu tiêu chuẩn hóa của một điểm. Theo phương án này, mẫu tiêu chuẩn hóa của một điểm là dữ liệu đo thu được với thiết bị đo bên ngoài (điện áp (A')), và thuật ngữ tiêu chuẩn hóa được sử dụng với cùng ý nghĩa như ý nghĩa của việc kiểm tra.

Khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng việc điều chỉnh một điểm đã được thực hiện (bước SC-9, Có), nồng độ amoniac để kiểm tra bộ phận đo 102f và bộ phận kiểm tra 102g kết hợp dữ liệu đo (điện áp (A')) thu được với thiết bị đo bên ngoài (bộ cảm biến amoniac bên ngoài 12 v.v.), và thực hiện việc điều chỉnh một điểm cho đường cong chuẩn sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa (C') thu được bằng cách thay thế dữ liệu đo (điện áp (A')) thành đường cong chuẩn, các lượng tới tổng nồng độ amoniac (D) được tính ở bước SC-8 (bước SC-10). Nghĩa là, điện áp để kiểm tra bộ phận đo 102f đo điện áp (A') của bộ cảm biến amoniac bên ngoài 12 cho môi trường nuôi cấy mà đã được thu thập từ bể nuôi cấy 200 và được khuấy đục trong chất lỏng phản ứng kiềm mạnh (ví dụ, NaOH) sao cho ion amoni được chuyển đổi thành amoniac không được ion hóa, và bộ phận kiểm tra 102g kiểm tra đường cong chuẩn sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa (C') được tính bằng cách thay thế điện áp (A') được đo với điện áp để kiểm tra bộ phận đo 102f thành đường cong chuẩn được lưu trữ trong tập tin đường cong chuẩn 106b, các lượng tới tổng nồng độ amoniac (D) được tính bởi việc tính tổng nồng độ amoniac.

Mặt khác, khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng việc điều chỉnh một điểm không được thực hiện (bước SC-9, Không), quy trình xử lý đến bước xử lý ở bước SC-11.

Tiếp theo, bộ phận kiểm soát 102 xác định xem chế độ kiểm soát amoniac nào được lựa chọn (bước SC-11).

Chế độ kiểm soát amoniac nêu trên là, chẳng hạn, chế độ để thực hiện việc kiểm soát với tổng nồng độ amoniac, chế độ để thực hiện việc kiểm soát với nồng độ amoniac không được ion hóa, hoặc tương tự, và ở bước SC-11, bộ phận kiểm soát 102 có thể lựa chọn chế độ kiểm soát tổng nồng độ amoniac hoặc chế độ kiểm soát nồng độ amoniac không được ion hóa như chế độ kiểm soát amoniac.

Tiếp theo, khi bộ phận kiểm soát 102 đã lựa chọn chế độ kiểm soát tổng nồng độ amoniac là chế độ kiểm soát amoniac (bước SC-11, chế độ kiểm soát tổng nồng độ amoniac), nó thiết đặt chế độ ở đó nồng độ amoniac được kiểm soát trên cơ sở của tổng nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy 200. Tiếp theo, bộ phận kiểm soát 102 tạo ra các chỉ dẫn kiểm soát để được gửi tới thiết bị nuôi cấy bao gồm bộ phận cung cấp amoniac 300 được nối với bể nuôi cấy 200 v.v. bằng cách sử dụng tổng nồng độ amoniac (D) được tính ở bước SC-8 hoặc tổng nồng độ amoniac (D') được kiểm tra ở bước SC-10, và các giá trị được thiết đặt lại và các thông số kiểm soát (ví dụ, giá trị SV dùng làm chỉ số cho việc kiểm soát nồng độ amoniac) được thiết đặt ở thiết bị kiểm soát amoniac 100 (bước SC-12).

Tiếp theo, bộ phận kiểm soát 102 đánh giá xem việc kiểm soát được tính ở bước SC-12 là cần thiết hay không (bước SC-13). Ví dụ, bộ phận kiểm soát 102 đánh giá xem tổng nồng độ amoniac có thấp hơn so với nồng độ định trước hay không.

Tiếp theo, khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng việc chỉ dẫn kiểm soát là cần thiết (ví dụ, tổng nồng độ amoniac thấp hơn so với nồng độ định trước) (bước SC-13, Có), bộ phận điều khiển cung cấp amoniac 102e đưa ra chỉ dẫn kiểm soát, như chỉ dẫn để bổ sung amoniac vào bể nuôi cấy 200 từ bể amoniac 30 theo lượng được chỉ dẫn, cho bộ phận cung cấp amoniac 300. Nghĩa là, bộ phận điều khiển cung cấp amoniac 102e thao tác công tắc 31 để thay đổi việc mở và việc đóng của van 32 qua bộ phận đưa ra kiểm soát 104 để kiểm soát việc mở và việc đóng của van 32 sao cho amoniac được cung cấp tới bể nuôi cấy 200 từ bể amoniac 30 với lượng theo chỉ dẫn kiểm soát.

Mặt khác, khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng việc chỉ dẫn kiểm soát là không cần thiết (ví dụ, tổng nồng độ amoniac không thấp hơn so với nồng độ định trước) (bước SC-13, Không), quy trình xử lý quay lại bước xử lý ở bước SC-5.

Khi quy trình xử lý quay lại bước SC-11, và bộ phận kiểm soát 102 đã lựa chọn chế độ kiểm soát nồng độ amoniac không được ion hóa như chế độ kiểm soát amoniac, chế độ ở đó việc kiểm soát được thực hiện trên cơ sở của nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy 200 được thiết đặt (bước SC-11, chế độ kiểm soát nồng độ amoniac không được ion hóa). Tiếp theo, bộ phận kiểm

soát 102 tạo ra các chỉ dẫn kiểm soát cho thiết bị nuôi cấy bao gồm bộ phận cung cấp amoniac 300 được nối với bể nuôi cấy 200 v.v. bằng cách sử dụng nồng độ amoniac không được ion hóa (C) mà đã được tính ở bước SC-7, các giá trị được thiết đặt lại và các thông số kiểm soát (ví dụ, giá trị SV dùng làm chỉ số kiểm soát nồng độ amoniac) được thiết đặt trong thiết bị kiểm soát amoniac 100 (bước SC-15).

Tiếp theo, bộ phận kiểm soát 102 đánh giá xem việc kiểm soát được tính ở bước SC-15 là cần thiết hay không (bước SC-16). Ví dụ, bộ phận kiểm soát 102 đánh giá xem nồng độ amoniac không được ion hóa có thấp hơn so với nồng độ định trước hay không.

Tiếp theo, khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng việc chỉ dẫn kiểm soát là cần thiết (ví dụ, nồng độ amoniac không được ion hóa thấp hơn so với nồng độ định trước) (bước SC-16, Có), bộ phận điều khiển cung cấp amoniac 102e đưa ra chỉ dẫn kiểm soát, như chỉ dẫn để bổ sung amoniac vào bể nuôi cấy 200 từ bể amoniac 30 theo lượng được chỉ dẫn, cho bộ phận cung cấp amoniac 300. Nghĩa là, bộ phận điều khiển cung cấp amoniac 102e thao tác công tắc 31 để kiểm soát việc mở và việc đóng của van 32 qua bộ phận đưa ra kiểm soát 104 để kiểm soát việc mở và việc đóng của van 32 sao cho amoniac được cung cấp tới bể nuôi cấy 200 từ bể amoniac 30 với lượng theo chỉ dẫn kiểm soát.

Mặt khác, khi bộ phận kiểm soát 102 đã đánh giá rằng việc chỉ dẫn kiểm soát là không cần thiết (ví dụ, nồng độ amoniac không được ion hóa không thấp hơn so với nồng độ định trước) (bước SC-16, Không), quy trình xử lý quay lại bước xử lý ở bước SC-5.

Đến đây, phần giải thích chi tiết của ví dụ về quy trình xử lý của thiết bị kiểm soát amoniac 100 được hoàn thành.

Phần giải thích của phương án này cũng được hoàn thành.

Các phương án khác

Mặc dù phương án của sáng chế đã được giải thích ở trên, sáng chế có thể được thực hiện như các phương án khác nhau trong phạm vi kỹ thuật của sáng chế được định rõ trong các điểm được bảo hộ, ngoài phương án được giải thích ở trên.

Ví dụ, mặc dù sáng chế đã được giải thích ở trên cho trường hợp ở đó thiết bị kiểm soát amoniac 100 thực hiện việc kiểm soát amoniac cho quá trình lên men được thực hiện trong bể nuôi cấy 200, nó có thể được sử dụng cho không chỉ quá trình lên men, mà còn cho việc sử dụng khác như sử dụng trong bể phản ứng trong ngành công nghiệp hóa học v.v..

Ngoài ra, trong số các bước xử lý được giải thích cho phương án, tất cả hoặc một phần các bước xử lý được giải thích được thực hiện tự động cũng có thể được thực hiện bằng tay, tất cả hoặc một phần các bước xử lý được giải thích được thực hiện bằng tay cũng có thể được thực hiện tự động bởi các phương pháp đã được biết đến.

Ngoài ra, các bước xử lý, các bước kiểm soát, các tên cụ thể được đề cập trong các phần tham khảo và các hình vẽ nêu trên, thông tin bao gồm các thông số như dữ liệu được đăng ký, các điều kiện nghiên cứu v.v. cho các bước xử lý, và cấu hình cơ sở dữ liệu có thể được thay đổi một cách tùy ý, trừ khi được chỉ báo cụ thể.

Ngoài ra, các bộ phận được thể hiện trên các hình vẽ cho thiết bị kiểm soát amoniac 100 được thể hiện dưới dạng giản đồ để chỉ báo các chức năng của nó, và chúng có thể không cần được cấu thành về mặt vật lý như được thể hiện trên các hình vẽ.

Ví dụ, tất cả hoặc một phần các chức năng xử lý của các bộ phận của thiết bị kiểm soát amoniac 100, cụ thể là các chức năng xử lý của bộ phận kiểm soát 102, có thể được thực hiện với CPU (Central Processing Unit - Bộ xử lý trung tâm) và các chương trình được giải thích và được thực hiện bởi CPU, hoặc với phần cứng dựa vào logic có dây. Các chương trình được ghi ở phương tiện ghi được mô tả dưới đây, và về mặt cơ học được đọc bởi thiết bị kiểm soát amoniac 100 theo yêu cầu. Nghĩa là, các chương trình máy tính để đưa ra các lệnh tới CPU để thực hiện các bước xử lý khác nhau bằng cách kết hợp với OS (Operating System – Hệ điều hành) được lưu trữ trong bộ phận lưu trữ 106, như ROM và HD. Các chương trình máy tính này được thực hiện bằng cách được tải trên RAM, và kết hợp với CPU để cấu thành bộ phận kiểm soát 102.

Ngoài ra, các chương trình máy tính có thể được lưu trữ ở máy chủ

chương trình ứng dụng được nối với thiết bị kiểm soát amoniac 100 qua mạng tùy ý, và tất cả hoặc một phần của chúng có thể được tải xuống theo yêu cầu.

Ngoài ra, các chương trình theo sáng chế cũng có thể được lưu trữ ở phương tiện ghi máy tính có thể đọc. "Phương tiện ghi" nêu trên bao gồm "phương tiện vật lý xách tay" tùy ý như đĩa mềm, đĩa quang từ, ROM, EPROM, EEPROM, CD-ROM, MO, và DVD, cũng như "phương tiện truyền thông" để tạm thời lưu trữ các chương trình như các đường truyền thông và các sóng mang được sử dụng để truyền các chương trình qua các mạng, trong đó các ví dụ đặc trưng là LAN, WAN, và Internet.

Ngoài ra, thuật ngữ "chương trình" nghĩa là phương pháp xử lý dữ liệu được mô tả theo ngôn ngữ tùy ý hoặc phương pháp mô tả, và định dạng của nó như mã nguồn và mã nhị phân không bị hạn chế. Ngoài ra, "chương trình" không cần bị giới hạn ở các chương trình được cấu thành như phần mềm độc lập, nhưng bao gồm các chương trình được phân phối như các môđun hoặc các thư viện, và các chương trình này thực hiện các chức năng của nó bằng cách kết hợp với các chương trình tách biệt khác, trong đó ví dụ đặc trưng là OS (Operating System – Hệ điều hành). Ngoài ra, với các cấu hình cụ thể để đọc phương tiện ghi trong thiết bị được thể hiện theo phương án, các bước để đọc các chương trình, các bước để lắp đặt chúng sau khi đọc, và v.v., các cấu hình và các bước đã được biết đến có thể được sử dụng.

Bộ phận lưu trữ 106 mà lưu trữ các loại cơ sở dữ liệu khác nhau (tập tin đường cong phân ly amoniac 106a tới tập tin tổng nồng độ amoniac 106e) và v.v. là phương tiện lưu trữ bao gồm thiết bị bộ nhớ như RAM và ROM, ổ đĩa cố định như đĩa cứng, đĩa mềm, đĩa quang, hoặc tương tự, và lưu trữ các loại chương trình khác nhau, các bảng, các cơ sở dữ liệu, các tập tin cho các trang mạng, v.v. được sử dụng cho các bước xử lý khác nhau hoặc việc thuyết trình trên các trang mạng.

Ngoài ra, thiết bị kiểm soát amoniac 100 cũng có thể được thực hiện bằng cách nối bộ xử lý thông tin như các máy tính cá nhân hiện thời và các trạm làm việc vào mục đích của việc kiểm soát, và lắp đặt phần mềm (bao gồm các chương trình, dữ liệu, v.v.) để thực hiện phương pháp của sáng chế trên bộ xử lý thông tin.

Ngoài ra, các phương án cụ thể của việc phân phối và việc tích hợp của thiết bị không bị giới hạn ở các phương án được thể hiện trên các hình vẽ, và thiết bị có thể được cấu thành bằng cách phân phối hoặc tích hợp theo chức năng hoặc về mặt vật lý tất cả hoặc một phần thiết bị trong các bộ tùy ý theo các bổ sung khác nhau của các bộ phận v.v..

Phương pháp kiểm soát amoniac và thiết bị kiểm soát amoniac nêu trên có thể được sử dụng cho các phương án dưới đây. Ví dụ, chúng có thể được sử dụng cho phương pháp để sản xuất chất đích bởi quá trình lên men nhờ sử dụng vi sinh vật, cụ thể là, phương pháp nuôi cấy vi sinh vật có khả năng sản xuất chất đích trong môi trường lỏng được chứa trong bể lên men để sản xuất và tích tụ chất đích trong môi trường.

Các ví dụ về chất đích được đề cập trong sáng chế bao gồm các axit amin L, các axit nucleic, các rượu, các protein, và v.v.. Theo sáng chế, "axit amin L" không được giới hạn cụ thể, miễn là nó là axit amin L mà có thể được tích tụ trong môi trường lên men nhờ sử dụng vi sinh vật. Mặc dù loại axit amin L không được giới hạn cụ thể, các ví dụ bao gồm các axit amin cơ bản như L-lysin, L-ornithin, L-arginin, L-histidin và L-citrulin, các axit amin béo như L-leuxinisoleuxin, L-alanin, L-valin, L-leuxin và glyxin, các axit amin mà là các axit hydroxy-monoaminocarboxylic như L-threonin và L-serin, các axit amin theo chu kỳ như L-prolin, các axit amin thơm như L-phenylalanin, L-tyrosin và L-tryptophan, các axit amin chứa lưu huỳnh như L-cystein, L-cystein và L-ethioninmethionin, các axit amin có tính axit như axit L-glutamic, axit L-aspartic, L-glutamin và L-asparagin và các amit axit của nó.

Vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế có thể có khả năng sản xuất hai hoặc nhiều loại axit amin. Axit amin L được đề cập trong sáng chế có thể là axit amin L tự do, hoặc có thể là muối như sunfat, hydrochlorit, và cacbonat của axit amin L.

Theo sáng chế, "axit nucleic" không được giới hạn cụ thể, miễn là nó là axit nucleic mà có thể được tích tụ trong môi trường lên men nhờ sử dụng vi sinh vật. Các ví dụ về axit nucleic bao gồm các purin nucleosit, các purin nucleotit, và v.v.. Các purin nucleosit bao gồm inosin, xanthosin, guanosin, adenosin, và v.v., và các purin nucleotit bao gồm este 5' phosphat của các purin nucleosit, chẳng

hạn, axit inosinic, (inosin 5' phosphat, dưới đây cũng được gọi là "IMP"), axit xanthylic (xanthosin 5' phosphat, dưới đây cũng được gọi là "XMP"), axit guanylic (guanosin 5' monophosphat, dưới đây cũng được gọi là "GMP"), axit adenylic (adenosine 5' monophosphat, dưới đây cũng được gọi là "AMP"), và v.v..

Theo sáng chế, "axit hữu cơ" không được giới hạn cụ thể, miễn là nó là axit hữu cơ mà có thể được tích tụ trong môi trường lên men nhờ sử dụng vi sinh vật. Các ví dụ về axit hữu cơ bao gồm axit lactic, axit lactetic, axit citric, axit gluconic, axit succinic, axit fumaric, axit malic, và v.v..

Theo sáng chế, "rượu" không được giới hạn cụ thể, miễn là nó là rượu mà có thể được tích tụ trong môi trường lên men nhờ sử dụng vi sinh vật. Các ví dụ về rượu bao gồm, chẳng hạn, ethanol, isobutanol, 1,2-butanediol, 1,3-butanediol, 1,3-propanediol, 1,4-butanediol, glycerol, 2,3-butanediol, và v.v..

Các ví dụ về vi sinh vật có thể sử dụng trong sáng chế bao gồm, cụ thể là, vi khuẩn *Enterobacteriaceae* thuộc về dòng *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Morganella*, hoặc tương tự, vi khuẩn coryneform, vi khuẩn *Bacillus*, vi khuẩn *Streptococcus*, các nấm men *Saccharomyces* và v.v.. Tốt hơn là vi sinh vật mà việc thay thế các gen là có thể.

Các ví dụ về vi khuẩn *Escherichia* bao gồm *Escherichia coli* và v.v.. Khi *Escherichia coli* được nhân dòng bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền, dòng *E. Coli* K12 và các biến thể của nó, dòng *Escherichia coli* 1655 (ATCC 47076) và dòng *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325), có thể được sử dụng. Để đạt được dòng K-12 của *Escherichia coli* và các dòng biến thể, chúng có thể được cung cấp từ, chẳng hạn, Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC – American Type Culture Collection, Địa chỉ: Hòm thư 1549, Manassas, VA 20108, Hoa Kỳ).

Với vi khuẩn *Escherichia*, các vi khuẩn này được mô tả trong công trình của Neidhardt và cộng sự (Neidhardt, F.C. và cộng sự, *Escherichia coli* và *Salmonella Typhimurium*, Hiệp hội Vi sinh vật học Hoa Kỳ, Washington D.C., 1208, bảng 1), như *Escherichia coli*, có thể được sử dụng. Các ví dụ về các dòng loại hoang dã của *Escherichia coli* bao gồm, chẳng hạn, dòng K12 và các biến thể của nó, dòng *Escherichia coli* MG1655 (ATCC số 47076), dòng W3110 (ATCC số 27325), và v.v.. Chúng có sẵn ở Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC –

American Type Culture Collection, Địa chỉ: Hòm thư 1549, Manassas, VA 20108, Hoa Kỳ).

Các ví dụ về vi khuẩn *Enterobacter* bao gồm *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* và v.v., và các ví dụ về vi khuẩn *Pantoea* bao gồm *Pantoea ananatis*. Một số loài của *Enterobacter agglomerans* gần đây đã được phân loại lại thành *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* hoặc tương tự, dựa vào phân tích chuỗi nucleotit của 16S rRNA, v.v.. Cả vi khuẩn *Enterobacter* và vi khuẩn *Pantoea* có thể được sử dụng miễn là vi khuẩn được lựa chọn được phân loại thành họ Enterobacteriaceae. Khi dòng *Pantoea ananatis* được nhân dòng bởi kỹ thuật di truyền, dòng *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614), dòng AJ13356 (FERM BP-6615), dòng AJ13601 (FERM BP-7207) và các biến thể của nó có thể được sử dụng. Các dòng này đã được nhận dạng là *Enterobacter agglomerans* khi chúng đã được cô lập, và được ký gửi như *Enterobacter agglomerans*. Tuy nhiên, gần đây chúng đã được phân loại lại là *Pantoea ananatis* trên cơ sở của việc sắp xếp theo chuỗi nucleotit của 16S rRNA và v.v. như được nêu trên.

Các vi khuẩn coryneform là nhóm các vi sinh vật được định rõ trong Sổ tay vi khuẩn học xác định, ấn bản thứ 8, trang 599 (1974), và các vi sinh vật được phân loại thành trực khuẩn hiếu khí, vi khuẩn Gram dương và trực khuẩn không nhuộm kháng axit như vậy mà không thể hình thành bào tử có thể được sử dụng. Vi khuẩn coryneform bao gồm vi khuẩn mà trước đây đã được phân loại thành dòng *Brevibacterium* nhưng hiện nay hợp nhất thành dòng *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol. 41:255-260 (1991)), và vi khuẩn thuộc về dòng *Brevibacterium* hoặc *Microbacterium*, mà liên quan chặt chẽ đến dòng *Corynebacterium*.

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform như vậy bao gồm các loài dưới đây:

Corynebacterium acetoaxitophilum

Corynebacterium acetoglutamicum

Corynebacterium alkanolyticum

Corynebacterium callunae

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium lilium

Corynebacterium melassecola

Corynebacterium thermoaminogenes (*Corynebacterium efficiens*)

Corynebacterium herculis

Brevibacterium divaricatum

Brevibacterium flavum

Brevibacterium immariophilum

Brevibacterium lactofermentum

Brevibacterium roseum

Brevibacterium saccharolyticum

Brevibacterium thiogenitalis

Corynebacterium ammoniagenes

Brevibacterium album

Brevibacterium cerinum

Microbacterium amoniacophilum

Các ví dụ cụ thể về các vi khuẩn này bao gồm các dòng dưới đây:

Corynebacterium acetoaxitophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium efficiens AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum ATCC 14020

Brevibacterium flavum ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869)

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6871, ATCC 6872

Brevibacterium album ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354

Các dòng này có sẵn ở, chẳng hạn, Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC - American Type Culture Collection) (Địa chỉ: Hòm thư 1549, Manassas, VA 2010812301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Hoa Kỳ). Nghĩa là, các số đăng ký được đưa tới mỗi trong số các dòng, và các dòng có thể được yêu cầu bằng cách sử dụng các số đăng ký này. Các số đăng ký của các dòng được lập danh sách trong danh mục của Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (tham khảo trang <http://www.atcc.org/>). Dòng AJ12340 đã được ký gửi vào ngày 27 tháng 10 năm 1987 tại Viện Công nghệ Sinh học quốc gia, Cơ quan Khoa học và Công nghệ Công nghiệp, Bộ Kinh tế, Thương mại và Công nghiệp (hiện nay là cơ quan quản lý độc lập, Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia, Cơ quan lưu trữ sinh vật sáng chế quốc tế, phòng số 120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Nhật Bản) với số truy cập là FERM BP-1539 theo các quy định của Hiệp ước Budapest. Dòng AJ12418 đã được ký gửi vào ngày 05 tháng 01 năm 1989 tại Viện Công nghệ Sinh học quốc gia, Cơ quan Khoa học và Công nghệ Công nghiệp, Bộ Kinh tế, Thương mại và Công nghiệp (hiện nay là cơ quan quản lý độc lập, Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia, Cơ quan lưu trữ sinh vật sáng chế quốc tế) với số truy cập là FERM BP-2205 theo các quy định của Hiệp ước

Budapest.

Khi vi khuẩn *Bacillus* được sử dụng, các ví dụ của nó bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, và v.v..

Các ví dụ về *Bacillus subtilis* bao gồm dòng Marburg *Bacillus subtilis* 168 (ATCC 6051), dòng *Bacillus subtilis* PY79 (Plasmit, 1984, 12, 1-9), và v.v.. Các ví dụ về *Bacillus amyloliquefaciens* bao gồm dòng *Bacillus amyloliquefaciens* T (ATCC 23842), dòng *Bacillus amyloliquefaciens* N (ATCC 23845), và v.v.. Các ví dụ về *Bacillus pumilus* bao gồm *Bacillus pumilus* Gottheil số 3218 (ATCC 21005) (bằng sáng chế Mỹ số 3,616,206), và v.v..

Dưới đây, các phương pháp để truyền khả năng sản xuất axit amin L- hoặc axit nucleic tới các dòng bố mẹ như được nêu trên sẽ được mô tả.

Để truyền khả năng sản xuất axit amin L hoặc axit nucleic, các phương pháp thông thường được sử dụng trong việc sinh sản vi khuẩn coryneform hoặc vi khuẩn của dòng *Escherichia* (xem "Quá trình lên men axit amin", trung tâm Gakkai Shuppan (Công ty trách nhiệm hữu hạn), ấn bản thứ nhất, được xuất bản vào ngày 30 tháng 05 năm 1986, trang 77-100) có thể được sử dụng. Các phương pháp như vậy bao gồm các phương pháp thu nhận thể đột biến trợ dưỡng, dòng kháng tương tự, hoặc chất đột biến quy định trao đổi chất, hoặc cấu tạo dòng tái tổ hợp sao cho nó thể hiện quá mức enzym sinh tổng hợp axit amin L hoặc axit nucleic. Trong việc sinh sản vi khuẩn sản xuất axit amin L, đơn hoặc hai hoặc ba hoặc nhiều đặc tính nêu trên như hiện tượng dinh dưỡng thụ động, kháng tương tự, hoặc đột biến quy định trao đổi chất có thể được truyền. Sự biểu hiện của đơn hoặc hai hoặc ba hoặc nhiều enzym sinh tổng hợp axit amin L có thể được nâng cao. Ngoài ra, các phương pháp truyền các đặc tính như đột biến dinh dưỡng thụ động, kháng tương tự, hoặc đột biến quy định trao đổi chất có thể được kết hợp với các phương pháp nâng cao các enzym sinh tổng hợp.

Dòng đột biến trợ dưỡng, dòng kháng tương tự axit amin L hoặc axit nucleic, hoặc dòng đột biến quy định trao đổi chất có khả năng sản xuất axit amin L hoặc axit nucleic có thể thu được bằng cách làm cho dòng bố mẹ hoặc dòng loại hoang dã trải qua đột biến thông thường, như tiếp xúc với các tia X hoặc chiếu xạ UV, hoặc xử lý với tác nhân gây đột biến như N-methyl-N'-nitro-N-

nitrosoguanidin, v.v., và tiếp theo chọn các tác nhân mà biểu lộ tính tự dưỡng, kháng tương tự, hoặc đột biến quy định trao đổi chất, và cũng có khả năng sản xuất axit amin L từ các dòng đột biến thu được.

Dòng đột biến tự dưỡng, dòng kháng tương tự axit amin L, hoặc dòng đột biến quy định trao đổi chất có khả năng sản xuất axit amin L có thể thu được bằng cách làm cho dòng bố mẹ hoặc dòng loại hoang dã trải qua đột biến thông thường, như tiếp xúc với các tia X hoặc chiếu xạ UV, hoặc xử lý với tác nhân gây đột biến như N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) hoặc ethyl methanesulfonat (EMS), v.v., và tiếp theo chọn các tác nhân mà biểu lộ tính tự dưỡng, kháng tương tự, hoặc đột biến quy định trao đổi chất và cũng có khả năng sản xuất axit amin L từ các dòng đột biến thu được.

Các phương pháp để truyền khả năng sản xuất axit amin và vi khuẩn sản xuất axit amin sẽ được ví dụ cụ thể dưới đây.

(Vi khuẩn sản xuất L-Lysin)

Vi khuẩn sản xuất L-Lysin và các phương pháp để cấu tạo chúng được ví dụ dưới đây.

Các ví dụ về các dòng có khả năng sản xuất L-Lysin bao gồm, chẳng hạn, các dòng kháng tương tự L-lysin và các dòng đột biến quy định trao đổi chất. Các ví dụ về tương tự L-lysin bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, oxalysin, lysin hydroxamat, S-(2-aminoethyl)-L-cystein (AEC), γ -methyllysin, α -chlorocaprolactam và v.v.. Các dòng đột biến có tính kháng các chất tương tự lysin này có thể thu được bằng cách làm cho vi khuẩn thuộc về họ Enterobacteriaceae hoặc vi khuẩn coryneform trải qua việc xử lý các tác nhân gây đột biến nhân tạo thông thường. Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-Lysin bao gồm *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185, xem đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-18596 và bằng sáng chế Mỹ số 4,346,170), dòng *Escherichia coli* VL611 (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2000-189180), và v.v.. Với *Escherichia coli* sản xuất L-lysin, dòng WC196 cũng có thể được sử dụng (xem đơn quốc tế số WO96/17930).

Ngoài ra, vi khuẩn sản xuất L-lysin cũng có thể được cấu tạo bằng cách làm tăng hoạt động của enzym hệ thống sinh tổng hợp L-lysin. Việc làm tăng

hoạt động của enzym như vậy có thể đạt được bằng cách làm tăng số lượng bản sao của các gen mã hóa cho enzym trong các tế bào, hoặc bằng cách sửa đổi chuỗi kiểm soát biểu hiện của nó. Việc làm tăng số lượng bản sao của các gen mã hóa cho enzym của hệ thống sinh tổng hợp L-lysine trong các tế bào và việc sửa đổi của chuỗi kiểm soát biểu hiện có thể đạt được bằng cách tương tự như cách cho các gen *gltP* và *gltS* được mô tả dưới đây.

Các ví dụ về các gen mã hóa cho các enzym sinh tổng hợp L-lysine bao gồm các gen mã hóa cho các enzym của quá trình diaminopimelat như gen dihydrodipicolinat synthaza (*dapA*), gen aspartokinaza (*lysC*), gen dihydrodipicolinat reductaza (*dapB*), gen diaminopimelat decarboxylaza (*lysA*), gen diaminopimelat dehydrogenaza (*ddh*) (WO96/40934 cho tất cả các gen nêu trên), gen phosphoenolpyruvat cacboxylaza (*ppc*) (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 60-87788), gen aspartat aminotransferaza (*aspC*) (đơn sáng chế Nhật Bản (Kokoku) Số 6-102028), gen diaminopimelat epimeraza (*dapF*) (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2003-135066), và gen aspartat semialdehyde dehydrogenaza (*asd*) (WO00/61723), và các gen mã hóa cho các enzym của quá trình axit aminoadipic như các gen homoaconitat hydrataza (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2000-157276). Ngoài ra, dòng bố mẹ có thể thể hiện mức biểu hiện gen được tăng lên được bao gồm trong công suất năng lượng (*cyo*) (EP 1170376 A), gen mã hóa cho nicotinamid nucleotit transhydrogenaza (*pntAB*) (bằng sáng chế Mỹ số 5,830,716), gen *ybjE* mã hóa cho protein có hoạt động bài tiết L-lysine (WO2005/073390), gen mã hóa cho glutamat dehydrogenaza (*gdhA*) (Gen 23:199-209 (1983)), hoặc sự kết hợp tùy ý của các gen này. Các từ viết tắt cho các gen được thể hiện trong các ngoặc đơn. Trong số các gen được nêu trên, gen *ybjE* được lựa chọn.

Đã được biết đến rằng dihydrodipicolinat synthaza loại hoang dã được dẫn xuất từ *Escherichia coli* chịu ức chế phản hồi bởi L-lysine, và đã được biết đến rằng aspartokinaza loại hoang dã được dẫn xuất từ *Escherichia coli* chịu sự loại bỏ và ức chế phản hồi bởi L-lysine. Do đó, khi các gen *dapA* và *lysC* được sử dụng, các gen này tốt hơn là các gen mã hóa cho các enzym đột biến được bão hòa với ức chế phản hồi bởi L-lysine.

Các ví dụ về DNA mã hóa dihydrodipicolinat synthetaza đột biến được

bảo hòa với ức chế phản hồi bởi L-lysin bao gồm DNA mã hóa protein như vậy mà có chuỗi axit amin trong đó dư lượng histidin ở vị trí 118 được thay thế bởi dư lượng tyrosin. Các ví dụ về DNA mã hóa aspartokinaza đột biến được bảo hòa với ức chế phản hồi bởi L-lysin bao gồm DNA mã hóa AKIII có chuỗi axit amin trong đó dư lượng threonin ở vị trí 352, dư lượng glyxin ở vị trí 323, và dư lượng ethioninmethionin ở vị trí 318 được thay thế bởi lần lượt các dư lượng leuxinisoleuxin, asparagin và leuxinisoleuxin (đối với các đột biến này, xem các bảng sáng chế Mỹ số 5,661,012 và 6,040,160). Các DNA đột biến như vậy có thể thu được bởi việc gây đột biến điểm chuyên biệt nhờ sử dụng PCR hoặc tương tự.

Các giới hạn chủ rộng plasmit RSFD80, pCAB1, và pCABD2 đã được biết đến là các plasmit chứa gen đột biến *dapA* mã hóa dihydrodipicolinat synthaza đột biến và gen *lysC* đột biến mã hóa aspartokinaza đột biến (bằng sáng chế Mỹ số 6,040,160). Dòng *Escherichia coli* JM109 được biến đổi với RSFD80 đã được đặt tên là AJ12396 (bằng sáng chế Mỹ số 6,040,160), và dòng đã được ký gửi ở Viện sinh học và công nghệ con người quốc gia, Cơ quan Khoa học và Công nghệ Công nghiệp, Bộ Thương mại và Công nghiệp quốc tế (hiện nay là cơ quan quản lý độc lập, Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia, Cơ quan lưu trữ sinh vật sáng chế quốc tế) vào ngày 28 tháng 10 năm 1993 và được quy định số truy cập là FERM P-13936, và việc ký gửi tiếp theo được chuyển đổi để ký gửi quốc tế theo các quy định của Hiệp ước Budapest vào ngày 01 tháng 11 năm 1994 và được quy định số truy cập là FERM BP-4859. RSFD80 có thể thu được từ dòng AJ12396 bởi phương pháp thông thường.

Ngoài ra, vi khuẩn sản xuất axit amin L có thể đã làm giảm hoạt động của enzym mà xúc tác phản ứng tách khỏi quá trình sinh tổng hợp axit amin L và sản xuất hợp chất khác, hoặc có thể thiếu trong hoạt động như vậy, hoặc chúng có thể đã làm giảm hoạt động của enzym mà có tác động tiêu cực đến sự tổng hợp axit amin L hoặc sự tích tụ, hoặc có thể thiếu trong hoạt động như vậy. Các ví dụ về các enzym như vậy được bao gồm trong việc sản xuất L-lysin bao gồm homoserin dehydrogenaza, lysin decarboxylaza (*cadA*, *ldcC*), enzym malic, và v.v., và các dòng ở đó các hoạt động của các enzym này được làm giảm hoặc được xóa được bộc lộ ở WO95/23864, WO96/17930, WO2005/010175, và v.v..

Điều này được lựa chọn rằng các biểu hiện của cả gen *cadA* và *ldcC* mã

hóa lysin decarboxylaza được làm giảm để làm giảm hoặc xóa hoạt động lysin decarboxylaza. Sự biểu hiện của cả hai gen này có thể được làm giảm bởi, chẳng hạn, phương pháp được mô tả trong WO2006/078039.

Để làm giảm hoặc loại bỏ các hoạt động của các enzym này, sự đột biến có thể được đưa vào các gen của các enzym ở bộ di truyền bởi phương pháp tác nhân gây đột biến thông thường hoặc kỹ thuật tái tổ hợp các gen sao cho các hoạt động nội bào của các enzym được làm giảm hoặc được loại bỏ. Việc đưa vào sự đột biến như vậy có thể đạt được bằng cách, chẳng hạn, sử dụng việc tái tổ hợp di truyền để loại bỏ các gen mã hóa cho các enzym ở bộ di truyền hoặc để sửa đổi chuỗi kiểm soát biểu hiện như chất trợ xúc tác hoặc chuỗi Shine-Dalgarno (SD - Shine-Dalgarno). Nó cũng có thể đạt được bằng cách đưa vào sự đột biến để thay thế axit amin (đột biến sai nghĩa), bộ ba mã kết thúc (đột biến vô nghĩa), hoặc đột biến lệch khung đọc để bổ sung hoặc xóa một hoặc hai nucleotit thành các vùng mã hóa cho các enzym ở bộ di truyền, hoặc xóa một phần hoặc toàn bộ các gen (J. Biol. Chem., 272:8611-8617 (1997)). Các hoạt động của enzym cũng có thể được làm giảm hoặc được loại bỏ bằng cách cấu tạo gen mã hóa cho enzym đột biến, trong đó vùng mã hóa được xóa một phần hoặc toàn bộ, và thay thế nó với gen thông thường trên bộ di truyền bởi việc tái tổ hợp tương đồng hoặc tương tự, hoặc bằng cách đưa yếu tố gen nhảy hoặc IS vào gen.

Ví dụ, để đưa vào sự đột biến mà làm giảm hoặc loại bỏ các hoạt động của các enzym nêu trên bởi việc tái tổ hợp di truyền, các phương án dưới đây được sử dụng. Gen đột biến được chuẩn bị bằng cách sửa đổi một phần chuỗi của gen đích sao cho nó không mã hóa enzym mà có thể có chức năng thông thường, và tiếp theo vi khuẩn thuộc về họ *Enterobacteriaceae* có thể được biến đổi với DNA chứa gen đột biến để khiến việc tái tổ hợp của gen tương ứng trên bộ di truyền với gen đột biến thay thế gen đột biến với gen đích trên bộ di truyền. Các ví dụ về việc thay thế gen như vậy nhờ sử dụng việc tái tổ hợp tương đồng bao gồm các phương pháp sử dụng DNA tuyến tính như phương pháp được gọi là tích hợp Red-driven (Datsenko, K.A, và Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ, 97:6640-6645 (2000)), và phương pháp sử dụng việc tích hợp Red driven kết hợp với hệ thống riêng biệt được dẫn xuất từ thể thực khuẩn λ (Cho, E.H., Gumpert, R.I., Gardner, J.F., J. Bacteriol., 184:5200-5203 (2002)) (dựa vào

WO2005/010175), phương pháp sử dụng plasmit chứa gốc nhân bản nhảy cảm nhiệt độ (bằng sáng chế Mỹ số 6,303,383, đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 05-007491), và v.v.. Ngoài ra, sự gây đột biến điểm chuyên biệt như vậy dựa vào việc thay thế gen nhờ sử dụng việc tái tổ hợp tương đồng cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng plasmit mà không thể tái tạo trong vật chủ.

Các ví dụ tốt nhất về vi khuẩn sản xuất L-Lysin bao gồm *Escherichia coli* WC196 Δ cadA Δ ldcC/pCABD2 (WO2006/078039). Dòng đã được cấu tạo bằng cách đưa plasmit pCABD2 chứa các gen sinh tổng hợp lysin (bằng sáng chế Mỹ số 6,040,160) vào dòng WC196 đã phá vỡ các gen *cadA* và *ldcC*, mà mã hóa lysin decarboxylaza. Dòng WC196 đã được nhân dòng từ dòng W3110, mà đã được dẫn xuất từ *Escherichia coli* K-12, bằng cách thay thế gen *lysC* loại hoang dã trên nhiễm sắc thể của dòng W3110 với gen *lysC* đột biến mã hóa aspartokinaza II đột biến ở đó threonin ở vị trí 352 đã được thay thế với leuxinisoleuxin, dẫn đến sự bão hòa của ức chế phản hồi của nó bởi L-lysine (bằng sáng chế Mỹ số 5,661,012), và độ kháng AEC với dòng tạo ra (bằng sáng chế Mỹ số 5,827,698). Dòng WC196 đã được chỉ định *Escherichia coli* AJ13069, được ký gửi ở Viện sinh học và công nghệ con người quốc gia, Cơ quan Khoa học và Công nghệ Công nghiệp (hiện nay là cơ quan quản lý độc lập, Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia, Cơ quan lưu trữ sinh vật sáng chế quốc tế, phòng số 120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Nhật Bản) vào ngày 06 tháng 12 năm 1994, và được quy định số truy cập là FERM P-14690. Tiếp theo, nó đã được chuyển tiếp để ký gửi quốc tế theo các quy định của Hiệp ước Budapest vào ngày 29 tháng 9 năm 1995, và được quy định số truy cập là FERM BP-5252 (bằng sáng chế Mỹ số 5,827,698). Dòng WC196 Δ cadA Δ ldcC tự nó cũng là vi khuẩn sản xuất L-lysine tốt nhất. WC196 Δ cadA Δ ldcC đã được chỉ định là AJ110692, và được ký gửi ở Viện Công nghệ Sinh học quốc gia, Cơ quan Khoa học và Công nghệ Công nghiệp (hiện nay là cơ quan quản lý độc lập, Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia, Cơ quan lưu trữ sinh vật sáng chế quốc tế, Phòng số 120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Nhật Bản) vào ngày 07 tháng 10 năm 2008 như ký gửi quốc tế và được quy định số truy cập là FERM BP-11027.

Plasmit pCABD2 chứa gen đột biến *dapA* được dẫn xuất từ *Escherichia*

coli và mã hóa cho dihydrodipicolinat synthaza (DDPS) có sự đột biến cho sự bảo hòa với ức chế phản hồi bởi L-lysin, gen *lysC* đột biến được dẫn xuất từ *Escherichia coli* và mã hóa cho aspartokinaza III có sự đột biến cho sự bảo hòa với ức chế phản hồi bởi L-lysin, gen *dapB* được dẫn xuất từ *Escherichia coli* và mã hóa cho dihydrodipicolinat reductaza, và gen *ddh* được dẫn xuất từ *Brevibacterium lactofermentum* và mã hóa cho diaminopimelat dehydrogenaza.

Các bước được nêu trên để nâng cao sự biểu hiện gen của các enzym được bao gồm trong việc sinh tổng hợp L-lysin, và các phương pháp để làm giảm các hoạt động của enzym có thể được áp dụng giống nhau tới các gen mã hóa cho các enzym sinh tổng hợp axit amin L khác.

Vi khuẩn sản xuất L-Tryptophan

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-Tryptophan và các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất chúng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các dòng thuộc về dòng *Escherichia*, như *E. Coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) và JP6015/pMU91 (DSM10123) mà thiếu trong tryptophanyl-tRNA synthetaza được mã hóa bởi gen *trpS* đột biến (bằng sáng chế Mỹ số 5,756,345), *E. Coli* SV164 (pGH5) có *serA* allele mã hóa phosphoglycerat dehydrogenaza được bảo hòa với ức chế phản hồi bởi serin và *trpE* allele mã hóa anthranilat synthaza được bảo hòa với ức chế phản hồi bởi tryptophan (bằng sáng chế Mỹ số 6,180,373), *E. Coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) và AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) thiếu tryptophanaza (bằng sáng chế Mỹ số 4,371,614), *E. Coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps trong đó khả năng sản xuất phosphoenolpyruvat được nâng cao (WO97/08333, bằng sáng chế Mỹ số 6,319,696), và v.v.. Vi khuẩn sản xuất L-Tryptophan thuộc về dòng *Escherichia* mà đã nâng cao hoạt động của protein được mã hóa bởi các gen *yedA* hoặc *yddG* cũng có thể được sử dụng (các đơn xin cấp bằng sáng chế Mỹ 2003/0148473 A1 và 2003/0157667 A1).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-Tryptophan và các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất chúng cũng bao gồm các dòng trong đó một hoặc nhiều hoạt động của các enzym dưới đây được nâng cao: anthranilat synthaza (*trpE*), phosphoglycerat dehydrogenaza (*serA*), và tryptophan synthaza (*trpAB*). Anthranilat synthaza và phosphoglycerat dehydrogenaza cả hai chịu ức chế phản hồi bởi L-tryptophan và L-serin, và do đó sự đột biến bảo hòa các enzym với ức

chế phản hồi có thể được đưa vào các enzym này. Các ví dụ cụ thể về các dòng có sự đột biến như vậy bao gồm *E. Coli* SV164 mà chứa anthranilat synthaza được bảo hòa và dòng SV164 biến thể thu được bằng cách đưa vào *E. Coli* SV164 plasmit pGH5, mà chứa gen *serA* đột biến mã hóa ức chế phản hồi phosphoglycerat dehydrogenaza được bảo hòa (WO94/08031).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-Tryptophan và các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất chúng cũng bao gồm dòng mà đã nâng cao hoạt động của 3 phosphoserin phosphatase (*serB*) (bằng sáng chế Mỹ số 4,371,614), dòng mà đã nâng cao hoạt động của phosphoenolpyruvat carboxykinaza (*pckA*) (WO2004/090125), và dòng trong đó các enzym của quá trình axit glyoxylic được biểu hiện một cách cơ bản (WO2005/103275).

L-tryptophan, L-phenylalanin, và L-tyrosin tất cả là các axit amin thơm và chia sẻ quá trình sinh tổng hợp chung. Các ví dụ về các gen mã hóa các enzym sinh tổng hợp cho các axit amin thơm này bao gồm deoxyarabino-heptulosonate phosphat synthaza (*aroG*), 3 dehydroquinate synthaza (*aroB*), shikimate axit dehydratase (*aroE*), shikimate kinaza (*aroL*), 5 enolpyruvylshikimate 3 phosphat synthaza (*aroA*), và chorismate synthaza (*aroC*) (đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 763127 A). Đã được biết đến rằng các gen này được kiểm soát bởi chất kìm hãm tyrosin (*tyrR*), và do đó hoạt động của enzym sinh tổng hợp axit amin thơm cũng có thể được tăng lên bằng cách xóa gen *tyrR* (tham khảo Đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 763127 A). Các từ viết tắt ở giữa các dấu ngoặc sau các tên enzym thể hiện các tên gen (điều tương tự sẽ áp dụng tới các trường hợp tương tự dưới đây).

Để nâng cao năng suất của mỗi trong số các axit amin thơm đích, hệ thống sinh tổng hợp của axit amin khác ngoài axit amin đích có thể được làm suy giảm. Ví dụ, khi axit amin đích là L-tryptophan, các quá trình sinh tổng hợp của L-phenylalanin và/hoặc L-tyrosin có thể được làm suy giảm (bằng sáng chế Mỹ số 4,371,614).

Theo sáng chế, thuật ngữ "việc làm tăng hoạt động của enzym" tương ứng với, chẳng hạn, số lượng của các phân tử enzym được tăng lên mỗi tế bào, hoạt động cụ thể của mỗi phân tử enzym được tăng lên, và v.v.. Ví dụ, hoạt động có thể được tăng lên bằng cách làm tăng lượng biểu hiện gen của enzym. Hoạt động

trong tế bào của enzym tốt hơn là được tăng lên để cao hơn so với hoạt động của dòng không được sửa đổi, chẳng hạn, dòng loại hoang dã, của vi sinh vật.

Ngoài ra, 3 deoxy D-arabinoheptulosonat 7 phosphat synthetaza (*aroF*, *aroG*) chịu ức chế phản hồi bởi các axit amin thơm. Do đó, enzym có thể được sửa đổi sao cho nó được bão hòa với ức chế phản hồi. Vi khuẩn sản xuất axit amin L thơm có thể thu được bằng cách, chẳng hạn, đưa vào *aroF* đột biến trong đó dư lượng axit L-aspartic ở vị trí 147 hoặc dư lượng L-serin ở vị trí 181 từ N-terminus được thay thế bởi axit amin khác, hoặc bằng cách đưa vào gen *aroG* đột biến trong đó một trong số dư lượng axit L-aspartic ở vị trí 146, dư lượng L-ethioninmethionin ở vị trí 147, L-prolin ở vị trí 150 và dư lượng L-alanin ở vị trí 202, hoặc cả dư lượng L-ethioninmethionin ở vị trí 157 và dư lượng L-alanin ở vị trí 219 từ N-terminus được thay thế bởi (các) axit amin khác (EP0488424).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-tryptophan và các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất chúng cũng bao gồm các dòng mà tryptophan operon chứa gen mã hóa anthranilat synthaza được bão hòa ức chế đã được đưa vào (các đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua thẩm định số 57-71397, 62-244382, bằng sáng chế Mỹ số 4,371,614). Ngoài ra, khả năng sản xuất L-tryptophan có thể được truyền bằng cách nâng cao sự biểu hiện gen mà mã hóa tryptophan synthaza trong tryptophan operon (*trpBA*). Tryptophan synthaza bao gồm các nhóm con α và β mà lần lượt được mã hóa bởi các gen *trpA* và *trpB*. Ngoài ra, khả năng sản xuất L-tryptophan có thể được nâng cao bằng cách nâng cao sự biểu hiện của isocitrat lyaza-malat synthaza operon (WO2005/103275).

Với vi khuẩn coryneform, *Corynebacterium glutamicum* AJ12118 (FERM BP-478, bằng sáng chế Nhật Bản số 01681002), mà kháng guanidinsulfaguanidin, vi khuẩn coryneform được đưa vào với tryptophan operon (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 63-240794), và vi khuẩn coryneform được đưa vào với gen mã hóa cho shikimat kinaza được dẫn xuất từ vi khuẩn coryneform (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 01-994749) có thể được sử dụng.

Vi khuẩn sản xuất L-Phenylalanin

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-Phenylalanin và các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất chúng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các dòng thuộc

về dòng *Escherichia*, như *E. Coli* AJ12739 (*tyrA*::Tn10, *tyrR*) (VKPM B-8197), *E. Coli* HW1089 (ATCC 55371) chứa gen *pheA34* đột biến (bằng sáng chế Mỹ số 5,354,672), *E. Coli* MWEC101-b (bằng sáng chế Hàn Quốc số 8903681), *E. Coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146, và NRRL B-12147 (bằng sáng chế Mỹ số 4,407,952). Ngoài ra, với dòng bố mẹ, *E. Coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHAB (FERM BP-3566), *E. Coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHAD] (FERM BP-12659), *E. Coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHAtm] (FERM BP-12662) và *E. Coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pBR-aroG4, pACMAB] đ AJ126 được đặt tên là 4 (FERM BP-3579) cũng có thể được sử dụng (EP 488424 B1). Ngoài ra, vi khuẩn sản xuất L-Phenylalanin thuộc về dòng *Escherichia* với hoạt động của protein được mã hóa được nâng cao bởi gen *yedA* hoặc gen *yddG* cũng có thể được sử dụng (các đơn xin cấp bằng sáng chế Mỹ số 2003/0148473 A1 và 2003/0157667 A1).

Với vi khuẩn coryneform tạo ra phenylalanin, *Corynebacterium glutamicum* BPS-13 (FERM BP-1777), K77 (FERM BP-2062), và K78 (FERM BP-2063) (đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 331145 A, đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 02-303495), trong đó hoạt động phosphoenolpyruvat cacboxylaza hoặc pyruvat kinaza được làm giảm, dòng tyrosin dinh dưỡng thụ động (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 05-049489), và v.v. có thể được sử dụng.

Vi khuẩn mà sản xuất hiệu quả phenylalanin cũng có thể thu được bằng cách sửa đổi vi khuẩn sao cho nó kết hợp với các sản phẩm phụ, chẳng hạn, bằng cách làm tăng lượng biểu hiện của gen hấp thu L-tryptophan, *tnaB* hoặc *mtr*, hoặc gen hấp thu L-tyrosin, *tyrP* (EP 1484410).

Vi khuẩn sản xuất L-Tyrosin

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-tyrosin bao gồm vi khuẩn *Escherichia* với gen prephenat dehydrataza được bão hòa (*tyrA*) (đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 1616940 A).

Vi khuẩn sản xuất L-Valin

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-Valin và các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất vi khuẩn sản xuất L-Valin bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các

dòng mà đã được sửa đổi để biểu hiện quá mức *ilvGMEDA* operon (bằng sáng chế Mỹ số 5,998,178). Điều này được lựa chọn rằng vùng trong *ilvGMEDA* operon mà được yêu cầu cho sự suy giảm được loại bỏ sao cho sự biểu hiện của operon không được làm suy giảm bởi L-valin mà được sản xuất. Ngoài ra, điều này được lựa chọn rằng gen *ilvA* trong operon bị làm gián đoạn sao cho hoạt động threonin deaminaza được làm giảm.

Các ví dụ về các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất vi khuẩn sản xuất L-Valin cũng bao gồm các dòng đột biến với amino-acyl t-RNA synthetaza có đột biến (bằng sáng chế Mỹ số 5,658,766). Ví dụ, *E. Coli* VL1970, mà có đột biến trong gen *ileS* mã hóa leuxinisoleuxin tRNA synthetaza, có thể được sử dụng. *E. Coli* VL1970 đã được ký gửi ở Cơ quan lưu trữ các vi sinh vật công nghiệp Nga (VKPM - Russian National Collection of Industrial Microorganisms) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Nga) vào ngày 24 tháng 06 năm 1988 theo số truy cập VKPM B-4411.

Ngoài ra, các đột biến yêu cầu axit lipoic để phát triển và/hoặc thiếu H⁺-ATPaza cũng có thể được sử dụng như các dòng bố mẹ (WO96/06926).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-valin của vi khuẩn coryneform bao gồm, chẳng hạn, các dòng được sửa đổi sao cho sự biểu hiện gen mã hóa enzym sinh tổng hợp L-valin được nâng cao. Các ví dụ về enzym sinh tổng hợp L-valin bao gồm các enzym được mã hóa bởi các gen được thể hiện trên *ilvBNC* operon, nghĩa là, acetohydroxy axit synthetaza được mã hóa bởi *ilvBN* và isomero-reductaza được mã hóa bởi *ilvC* (WO00/50624). Do *ilvBNC* operon chịu quy định biểu hiện bởi L-valin và/hoặc L-leuxinisoleuxin và/hoặc L-leuxin, mong muốn là loại bỏ sự suy giảm để tránh sự loại bỏ biểu hiện bởi L-valin mà được sản xuất.

Khả năng sản xuất L-Valin có thể được truyền tới vi khuẩn coryneform và khả năng sản xuất L-Valin của vi khuẩn coryneform có thể được nâng cao bằng cách làm giảm hoặc xóa hoạt động của ít nhất một loại enzym mà được bao gồm trong quá trình trao đổi chất mà làm giảm việc sản xuất L-valin. Ví dụ, việc làm giảm của hoạt động của threonin dehydrataza được bao gồm trong việc tổng hợp L-leuxin, hoặc hoạt động của enzym mà được bao gồm trong việc tổng hợp D-panthothenat được dự tính (WO00/50624).

Các ví dụ về các phương pháp để truyền khả năng sản xuất L-Valin cũng bao gồm việc truyền độ kháng tới tương tự axit amin hoặc tương tự.

Các ví dụ bao gồm, chẳng hạn, các dòng đột biến mà dinh dưỡng thụ động cho L-leuxinisoleuxin và L-ethioninmethionin, và kháng với D-riboza, purin ribonucleosit hoặc pyrimidin ribonucleosit, và có khả năng sản xuất L-valin (FERM P-1841, FERM P-29, đơn sáng chế Nhật Bản số 53-025034), các dòng đột biến kháng với các polyketit (FERM P-1763, FERM P-1764, đơn sáng chế Nhật Bản số 06-065314), và các dòng đột biến kháng với L-valin trong môi trường chứa axit lactic như nguồn cacbon duy nhất và nhạy cảm với các tương tự axit pyruvic (axit β -fluoropyruvic v.v.) Trong môi trường chứa đường glucoza như nguồn cacbon duy nhất (FERM BP-3006, BP-3007, bằng sáng chế Nhật Bản số 3006929).

Ví dụ về gen được bao gồm trong việc tổng hợp của chuỗi các axit amin được phân nhánh là *ilvGMEDA* operon, và operon này chịu sự biểu hiện kiểm soát (sự suy giảm) bởi L-valin và/hoặc L-leuxinisoleuxin và/hoặc L-leuxin. Do đó, năng suất của vi sinh vật cho các axit amin L này có thể được nâng cao bằng cách đưa vào vi sinh vật *ilvGMEDA* operon trong đó vùng được yêu cầu cho sự suy giảm được loại bỏ hoặc được biến đổi.

Vi khuẩn sản xuất L-leuxinIsoleuxin

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-leuxinIsoleuxin và các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất vi khuẩn sản xuất L-leuxinIsoleuxin bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các đột biến có độ kháng với 6-dimethylaminopurin (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 5-304969), các đột biến có độ kháng với tương tự leuxinisoleuxin như thialeuxinisoleuxin và leuxinisoleuxin hydroxamat, và các đột biến có độ kháng với DL-ethionin và/hoặc arginin hydroxamat (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 5-130882). Ngoài ra, các dòng tái tổ hợp được biến đổi với các gen mã hóa các protein được bao gồm trong việc sinh tổng hợp L-leuxinisoleuxin, như threonin deaminaza và synthaza axit axetohydroxy, cũng có thể được sử dụng như các dòng bố mẹ (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2-458, bằng sáng chế Pháp số 0356739, và bằng sáng chế Mỹ số 5,998,178).

Các ví dụ về các dòng sản xuất L-leuxinisoleuxin của vi khuẩn coryneform bao gồm vi khuẩn coryneform trong đó gen *brnE* mã hóa cho protein bài tiết axit amin chuỗi được phân nhánh được khuếch đại (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2001-169788), vi khuẩn coryneform được truyền với khả năng sản xuất L-leuxinisoleuxin bởi dung hợp tế bào trần với vi khuẩn sản xuất L-lysine (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 62-74293), vi khuẩn coryneform trong đó homoserine dehydrogenase được nâng cao (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 62-91193), dòng kháng threonine hydroxamate (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 62-195293), dòng kháng axit α -ketomalonate (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 61-15695), và dòng kháng methyl lysine (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 61-15696).

Vi khuẩn sản xuất L-Leuxin

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-Leuxin và các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất vi khuẩn sản xuất L-Leuxin bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vi khuẩn *Escherichia*, như *E. Coli* các dòng kháng với leuxin (ví dụ, dòng 57 (VKPM B-7386, bằng sáng chế Mỹ số 6,124,121)) hoặc các tương tự leuxin bao gồm β -2-thienylalanine, 3-hydroxyleuxin, 4-azaleuxin và 5,5,5-trifluoroleuxin (đơn sáng chế Nhật Bản số 62-34397 và đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 8-70879); các dòng *E. Coli* thu được bởi các phương pháp kỹ thuật di truyền được mô tả trong WO96/06926; và *E. Coli* H-9068 (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 8-70879).

Vi khuẩn sản xuất L-Leuxin cũng có thể được nâng cao bằng cách nâng cao sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen được bao gồm trong việc sinh tổng hợp L-leuxin. Các ví dụ về các gen như vậy bao gồm các gen của *leuABCD* operon, mà tốt hơn là được thể hiện bởi gen *leuA* đột biến mã hóa cho isopropylmalate synthase được bão hòa với ức chế phản hồi bởi L-leuxin (bằng sáng chế Mỹ số 6,403,342). Ngoài ra, vi khuẩn sản xuất L-Leuxin cũng có thể được nâng cao bằng cách nâng cao sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen mã hóa cho các protein mà bài tiết axit amin L từ tế bào vi khuẩn. Các ví dụ về các gen như vậy bao gồm các gen *b2682* và *b2683* (*ygaZH* các gen) (EP 1239041 A2).

Các ví dụ về các dòng sản xuất L-leuxin của vi khuẩn coryneform bao

gồm các dòng 2-thiazolealanin và kháng β -hydroxyleucineleuxin (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 8-266295), dòng kháng tương tự valin (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 63-248392), dòng dinh dưỡng thụ động (đơn sáng chế Nhật Bản số 38-4395), dòng kháng S-(2-aminoethyl)-L-cystein (AEC) (đơn sáng chế Nhật Bản số 51-37347), và phenylalanin, dòng dinh dưỡng thụ động valin và leuxinisoleuxin (đơn sáng chế Nhật Bản số 54-36233).

Vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic

Các ví dụ tốt nhất về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic bao gồm, chẳng hạn, các dòng trong đó sự biểu hiện gen mã hóa enzym tổng hợp axit L-glutamic được nâng cao. Các ví dụ về các gen như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các gen mã hóa glutamat dehydrogenaza (*gdhA*), glutamin synthetaza (*glnA*), glutamat synthetaza (*gltAB*), isocitrat dehydrogenaza (*icdA*), aconitat hydrataza (*acnA*, *acnB*), citrat synthaza (*gltA*), phosphoenolpyruvat cacboxylaza (*ppc*), pyruvat dehydrogenaza (*aceEF*, *lpdA*), pyruvat kinaza (*pykA*, *pykF*), phosphoenolpyruvat synthaza (*ppsA*), enolaza (*eno*), phosphoglyceromutaza (*pgmA*, *pgmI*), phosphoglycerat kinaza (*pgk*), glyceraldehyde 3 phophat dehydrogenaza (*gapA*), triose phosphat isomeraza (*tpiA*), fructose bisphosphat aldolaza (*fbp*), phosphofructokinaza (*pfkA*, *pfkB*), đường glucoza phosphat isomeraza (*pgi*), và v.v..

Các ví dụ về các dòng mà đã được sửa đổi sao cho sự biểu hiện của gen citrat synthetaza, gen phosphoenolpyruvat cacboxylaza, gen isocitrat dehydrogenaza, gen pyruvat dehydrogenaza, và/hoặc gen glutamat dehydrogenaza được nâng cao bao gồm các gen được bộc lộ ở EP 1078989 A, EP 955368 A, EP 952221 và EP 1033407 A.

Việc sửa đổi để truyền khả năng sản xuất axit L-glutamic cũng có thể đạt được bằng cách làm giảm hoặc xóa hoạt động của enzym mà xúc tác phản ứng tách khỏi quá trình sinh tổng hợp axit L-glutamic và tạo ra hợp chất khác ngoài axit L-glutamic. Các ví dụ về enzym như vậy mà xúc tác phản ứng tách khỏi quá trình sinh tổng hợp axit L-glutamic và sản xuất hợp chất khác ngoài axit L-glutamic bao gồm isocitrat lyaza, α -ketoglutarat dehydrogenaza, synthaza axit axetohydroxy, axetolactat synthaza, format axetyltransferaza, lactat dehydrogenaza, glutamat decacboxylaza, 1 pyrroline 5 carboxylat dehydrogenaza,

và v.v..

Ví dụ, để làm giảm hoạt động α -ketoglutarat dehydrogenaza, việc sửa đổi có thể được thực hiện bằng cách sử dụng gen *sucA* (*odhA*) mã hóa cho E1o subunit của enzym. Các ví dụ về các dòng với hoạt động α -ketoglutarat dehydrogenaza được làm giảm bao gồm, chẳng hạn, các dòng dưới đây:

Dòng *Brevibacterium lactofermentum* Δ S (WO95/34672)

Brevibacterium lactofermentum AJ12821 (FERM BP-4172; bằng sáng chế Pháp số 9401748)

Brevibacterium flavum AJ12822 (FERM BP-4173; bằng sáng chế Pháp số 9401748)

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174; bằng sáng chế Pháp số 9401748)

Pantoea ananatis AJ13601 (FERM BP-7207)

Klebsiella planticola AJ13410 (FERM BP-6617)

Pantoea ananatis AJ13355 (FERM BP-6614)

Pantoea ananatis AJ13356 thiếu trong hoạt động α -ketoglutarat dehydrogenaza do sự phá vỡ của các gen con α KGDH-E1 (*sucA*). Dòng này đã được nhận dạng là *Enterobacter agglomerans* khi nó đã được cô lập và được ký gửi là *Enterobacter agglomerans* AJ13356. Tuy nhiên, gần đây nó đã được phân loại lại là *Pantoea ananatis* trên cơ sở của việc sắp xếp theo chuỗi nucleotit của 16S rRNA và v.v.. Mặc dù AJ13356 đã được ký gửi ở cơ quan ký gửi nêu trên là *Enterobacter agglomerans*, nó được mô tả là *Pantoea ananatis* trong đặc điểm kỹ thuật này.

Ngoài ra, khả năng để sản xuất axit L-glutamic cũng có thể được truyền tới vi khuẩn coryneform bởi phương pháp khuếch đại gen *yggB* (NCgl 1221; NP_600492. Các báo cáo chất nhỏ. [gi:19552490], WO2006/070944), hoặc phương pháp đưa vào gen *yggB* đột biến trong đó sự đột biến được đưa vào vùng mã hóa.

Các ví dụ về các phương pháp khác để truyền hoặc nâng cao khả năng sản xuất axit L-glutamic bao gồm phương pháp truyền độ kháng với tương tự axitaxit

hữu cơ, chất ức chế chuỗi hô hấp, v.v., và phương pháp truyền độ nhạy tới chất ức chế tổng hợp vách tế bào. Các ví dụ về các phương pháp như vậy bao gồm phương pháp truyền độ kháng với axit monofluoroaxetic (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 50-113209), phương pháp truyền độ kháng với adenin hoặc thymine (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 57-065198), phương pháp suy giảm urêse (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 52-038088), phương pháp truyền độ kháng với axit malonic (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 52-038088), phương pháp truyền độ kháng với các benzopyrone hoặc các naphthoquinone (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-1889), phương pháp truyền độ kháng với HOQNO (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-140895), phương pháp truyền độ kháng với α -ketoaxit malonic (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 57-2689), phương pháp truyền độ kháng với guanidin (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-35981), phương pháp truyền độ nhạy tới penicillin (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 4-88994), và v.v..

Các ví dụ cụ thể về các dòng kháng như vậy bao gồm các dòng dưới đây:

Brevibacterium flavum AJ3949 (FERM BP-2632; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 50-113209)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 57-065198)

Brevibacterium flavum AJ11355 (FERM P-5007; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-1889)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-1889)

Brevibacterium flavum AJ11217 (FERM P-4318; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 57-2689)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 57-2689)

Brevibacterium flavum AJ11564 (FERM BP-5472; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-140895)

Brevibacterium flavum AJ11439 (FERM BP-5136; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-35981)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 04-88994)

Brevibacterium lactofermentum AJ11426 (FERM P-5123; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-048890)

Corynebacterium glutamicum AJ11440 (FERM P-5137; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-048890)

Brevibacterium lactofermentum AJ11796 (FERM P-6402; đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 58-158192)

Vi khuẩn sản xuất L-Threonin

Các ví dụ tốt nhất về vi khuẩn sản xuất L-Threonin bao gồm vi khuẩn thuộc về họ Enterobacteriaceae trong đó hoạt động của hệ thống sinh tổng hợp L-threonin được nâng cao. Các ví dụ về các gen mã hóa cho các enzym sinh tổng hợp L-threonin bao gồm gen aspartokinaza III (*lysC*), gen aspartat semialdehyde dehydrogenaza (*asd*), gen aspartokinaza I (*thrA*), gen homoserin kinaza (*thrB*), và gen threonin synthaza (*thrC*) được mã hóa bởi *thr* operon. Hai hoặc nhiều loại gen này có thể được đưa vào. Các gen mã hóa cho các enzym sinh tổng hợp L-threonin có thể được đưa vào vi khuẩn *Enterobacteriaceae* với việc phân hủy threonin được làm giảm. Các ví dụ về vi khuẩn *Escherichia* với việc phân hủy threonin được làm giảm bao gồm, chẳng hạn, dòng TDH6 mà thiếu trong hoạt động threonin dehydrogenaza (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2001-346578), và v.v..

Các hoạt động của các enzym sinh tổng hợp L-threonin được ức chế bởi sản phẩm L-threonin cuối cùng, và do đó các enzym sinh tổng hợp L-threonin tốt hơn là được sửa đổi sao cho được bão hòa với ức chế phản hồi bởi L-threonin khi cấu tạo các dòng sản xuất L-threonin. Các gen *thrA*, *thrB* và *thrC* nêu trên cấu thành threonin operon mà có cấu trúc suy giảm. Sự biểu hiện của threonin operon được ức chế bởi leuxinisoleuxin và threonin trong môi trường nuôi cấy và cũng được kìm hãm bởi sự suy giảm. Sự suy giảm này có thể được loại bỏ hoặc được làm giảm bằng cách loại bỏ chuỗi lãnh đạo hoặc chất suy giảm trong vùng suy

giảm (Lynn, S.P., Burton, W.S., Donohue, T.J., Gould, R.M., Gumpert, R.I., và Gardner, J.F.J., Mol. Biol. 194:59-69 (1987); WO02/26993; WO2005/049808).

Chất xúc tác tự nhiên thể hiện ở vùng ngược dòng của threonin operon có thể được thay thế bởi không phải chất xúc tác tự nhiên (WO98/04715), hoặc threonin operon có thể được cấu tạo sao cho sự biểu hiện của gen sinh tổng hợp threonin được kiểm soát bởi chất kìm hãm và chất trợ xúc tác của thể thực khuẩn λ (bằng sáng chế châu Âu số 0593792). Ngoài ra, vi khuẩn *Escherichia* đột biến mà được bão hòa với ức chế phản hồi bởi L-threonin có thể thu được bằng cách chọn các dòng kháng với axit α -amino- β -hydroxyisovaleric (AHV).

Tốt hơn là số lượng bản sao của threonin operon kháng ức chế phản hồi được sửa đổi được tăng lên, hoặc sự biểu hiện của operon được sửa đổi được tăng lên bằng cách nối nó với chất trợ xúc tác potent trong vật chủ. Số lượng bản sao có thể được tăng lên bằng cách sử dụng, ngoài sự khuếch đại sử dụng plasmid, transposon, Mu-thực khuẩn thể, hoặc tương tự sao cho operon được biến đổi trên nhiễm sắc thể.

Gen mã hóa aspartokinaza III (*lysC*) tốt hơn là được sửa đổi sao cho enzym được bão hòa với ức chế phản hồi bởi L-lysin. Gen *lysC* kháng ức chế phản hồi được sửa đổi như vậy có thể thu được bởi phương pháp được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 5,932,453.

Vi khuẩn sản xuất L-Threonin cũng có thể tốt hơn là thu được bằng cách nâng cao sự biểu hiện của các gen được bao gồm trong quá trình glycolytic, chu kỳ TCA, hoặc chuỗi hô hấp, hoặc các gen mà quy định sự biểu hiện của các gen này, hoặc các gen được bao gồm trong việc hấp thụ đường, ngoài các gen enzym sinh tổng hợp L-threonin. Các ví dụ về các gen này mà có hiệu quả cho việc sản xuất L-threonin bao gồm gen transhydrogenaza (*pntAB*, bằng sáng chế châu Âu số 733712), gen phosphoenolpyruvat cacboxylaza (*pepC*, WO95/06114), gen phosphoenolpyruvat synthaza (*pps*, bằng sáng chế châu Âu số 877090), và gen pyruvat cacboxylaza được dẫn xuất từ vi khuẩn coryneform hoặc vi khuẩn *Bacillus* (WO99/18228, Đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 1092776 A).

Vi khuẩn sản xuất L-Threonin cũng có thể tốt hơn là thu được bằng cách nâng cao sự biểu hiện gen mà truyền độ kháng L-threonin và/hoặc gen mà truyền

độ kháng L-homoserin, hoặc bằng cách truyền độ kháng L-threonin và/hoặc độ kháng L-homoserin với vi khuẩn chủ. Các ví dụ về các gen mà truyền độ kháng nêu trên bao gồm gen *rhtA* (Res. Microbiol. 154:123-135 (2003)), gen *rhtB* (đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 0994190 A), gen *rhtC* (đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 1013765 A), gen *yfiK*, và gen *yeaS* (đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 1016710 A). Các phương pháp ví dụ để truyền độ kháng L-threonin với vi khuẩn chủ bao gồm các phương pháp được mô tả trong đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 0994190 và WO90/04636.

E. Coli VKPM B-3996 (bằng sáng chế Mỹ số 5,175,107) có thể được ví dụ là vi khuẩn sản xuất L-threonin. Dòng VKPM B-3996 đã được ký gửi vào ngày 19 tháng 11 năm 1987 tại Cơ quan lưu trữ vi sinh vật công nghiệp Nga (VKPM - Russian National Collection of Industrial Microorganisms), GNII Gentika (Nga, 117545 Moscow 1, Dorozhny proezd, 1) theo số đăng ký VKPM B-3996. Dòng VKPM B-3996 chứa plasmit pVIC40 (WO90/04636) mà đã thu được bằng cách đưa gen sinh tổng hợp threonin (threonin operon, *thrABC*) vào vectơ plasmit phạm vi chủ rộng pAYC32 chứa vật kháng streptomycin (Chistorerdov, A.Y., và Tsygankov, Y.D., Plasmit, 16, 161-167 (1986)). Trong pVIC40, aspartokinaza I-homoserin dehydrogenaza I được mã hóa bởi gen *thrA* ở threonin operon được bảo hòa với ức chế phản hồi bởi L-threonin.

E. Coli VKPM B-5318 (dựa vào bằng sáng chế châu Âu số 0593792) cũng có thể được ví dụ là vi khuẩn sản xuất L-threonin được ưu tiên. Dòng VKPM B-5318 đã được ký gửi ở Cơ quan lưu trữ vi sinh vật công nghiệp Nga (VKPM - Russian National Collection of Industrial Microorganisms) GNII Gentika vào ngày 03 tháng 05 năm 1990 theo số đăng ký VKPM B-5318. Dòng VKPM B-5318 nguyên dưỡng liên quan đến L-leuxinisoleuxin, và chứa DNA plasmit tái tổ hợp được cấu tạo sao cho threonin operon, chẳng hạn, gen sinh tổng hợp threonin, thiếu ở vùng chất suy giảm, mà là vùng điều chỉnh sao chép được chứa ban đầu, được bố trí ngược dòng từ chất kìm hãm C1 nhạy cảm nhiệt độ được dẫn xuất từ thể thực khuẩn λ , chất trợ xúc tác PR, và các gen mã hóa cho thiết bị đầu cuối N của Cro protein, và sự biểu hiện của các gen sinh tổng hợp threonin được quy định bởi chất kìm hãm và chất trợ xúc tác được dẫn xuất từ thể thực khuẩn λ .

Vi khuẩn sản xuất L-arginin

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-arginin và các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất vi khuẩn sản xuất L-arginin bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các dòng vi khuẩn Escherichial, như dòng *E. Coli* 237 (VKPM B-7925) (đơn xin cấp bằng sáng chế Mỹ số 2002/058315 A1) và các dòng biến thể của nó chứa N-axetylglutamat synthaza đột biến (đơn xin cấp bằng sáng chế Nga số 2001112869), dòng *E. Coli* 382 (VKPM B-7926) (EP 1170358 A1), và dòng sản xuất arginin được biến đổi với gen *argA* mã hóa N-axetylglutamat synthetaza (EP 1170361 A1).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-arginin và các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất vi khuẩn sản xuất L-arginin cũng bao gồm các dòng trong đó sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen mã hóa enzym sinh tổng hợp L-arginin được nâng cao. Các ví dụ về các gen như vậy bao gồm gen N-axetylglutamyl phosphat reductaza (*argC*), gen ornithin axetyl transferaza (*argJ*), gen N-axetylglutamat kinaza (*argB*), gen axetylornithin transaminaza (*argD*), gen cacbamoyl transferaza (*argF*), argininosuccinic axit synthetaza (*argG*), gen argininosuccinic axit lyaza (*argH*), và gen cacbamoyl phosphat synthetaza (*carAB*).

Các ví dụ về vi khuẩn coryneform mà có khả năng sản xuất L-arginin bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các dòng loại hoang dã của vi khuẩn coryneform; vi khuẩn coryneform kháng với các tác nhân nhất định bao gồm các thuốc sulfa, 2 thiazolealanin, axit α -amino- β -hydroxyvaleric và v.v.; vi khuẩn coryneform biểu lộ hiện tượng dinh dưỡng thụ động L-histidin, L-prolin, L-threonin, L-leuxinisoleuxin, L-ethioninmethionin, hoặc L-tryptophan ngoài độ kháng với 2 thiazolealanin (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 54-44096); vi khuẩn coryneform kháng với axit ketomalonic, axit fluoromalonic, hoặc axit monofluoroaxetic (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 57-18989); vi khuẩn coryneform kháng với argininol (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 62-24075); vi khuẩn coryneform kháng với X-guanidin (X thể hiện biến thể của axit béo hoặc chuỗi béo, đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2-186995) và v.v.. Vi khuẩn coryneform thiếu trong chất kìm hãm L-arginin (đơn xin cấp bằng sáng chế Mỹ số 20020045233) và vi khuẩn coryneform trong đó hoạt động glutamat dehydrogenaza được tăng lên (đơn xin cấp bằng

sáng chế châu Âu số 1057893 A) cũng là các dòng phù hợp với việc sản xuất L-arginin.

Cụ thể là, các dòng dưới đây có thể được ví dụ: *Brevibacterium flavum* AJ11169 (BP-6892), *Corynebacterium glutamicum* AJ12092 (FERM BP-6906), *Brevibacterium flavum* AJ11336 (FERM BP-6893), *Brevibacterium flavum* AJ11345 (FERM BP-6894), và *Brevibacterium lactofermentum* AJ12430 (FERM BP-2228). Các dòng AJ11169 và AJ12092 là các dòng kháng 2-thiazolealanin được mô tả trong đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 54-44096, dòng AJ11336 là các dòng kháng argininol và sulfadiazin được mô tả trong đơn sáng chế Nhật Bản số 62-24075, dòng AJ11345 là dòng mà kháng với argininol, 2-thiazolealanin, và guanidinsulfaguanidin, và biểu lộ hiện tượng dinh dưỡng thụ động histidin được mô tả trong đơn sáng chế Nhật Bản số 62-24075, và dòng AJ12430 là dòng kháng octylguanidin và 2-thiazolealanin được mô tả trong đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2-186995.

Corynebacterium glutamicum AJ12092 (FERM BP-6906) đã được ký gửi vào ngày 29 tháng 09 năm 1983 ở Viện Công nghệ Sinh học quốc gia, Cơ quan Khoa học và Công nghệ Công nghiệp (hiện nay là cơ quan quản lý độc lập, Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia, Cơ quan lưu trữ sinh vật sáng chế quốc tế, Phòng số 120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Nhật Bản) với số truy cập là FERM P-7273, và ký gửi ban đầu đã được chuyển tiếp để ký gửi quốc tế dựa vào Hiệp ước Budapest vào ngày 01 tháng 10 năm 1999, và nó đã được quy định số truy cập là FERM BP-6906.

Các ví dụ về vi khuẩn *Escherichia* có khả năng sản xuất L-arginin bao gồm *Escherichia coli* được đưa vào với gen *argA* (xem đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 57-5693), và dòng *Escherichia coli* 237, mà là biến thể sản xuất L-arginin của dòng biến thể sử dụng axit axetic (đơn xin cấp bằng sáng chế Nga số 2000117677). Dòng 237 đã được ký gửi ở Cơ quan lưu trữ vi sinh vật công nghiệp Nga (VKPM - Russian National Collection of Industrial Microorganisms) GNII Gentika theo số truy cập VKPM B-7925 từ ngày 10 tháng 04 năm 2000, và ký gửi ban đầu đã được chuyển tiếp để ký gửi quốc tế dựa vào Hiệp ước Budapest, vào ngày 18 tháng 05 năm 2001. Dòng *Escherichia coli* 382 có sự đột biến về độ kháng với ức chế phản hồi bởi L-arginin, mà là biến

thể của dòng 237 (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2002-017342) cũng có thể được sử dụng. Dòng *Escherichia coli* 382 đã được ký gửi ở Cơ quan lưu trữ vi sinh vật công nghiệp Nga với số VKPM B-7926 vào ngày 10 tháng 04 năm 2000, và ký gửi đã được chuyển tiếp để ký gửi quốc tế dựa vào Hiệp ước Budapest vào ngày 18 tháng 05 năm 2001.

Các ví dụ về vi khuẩn *Serratia* có khả năng sản xuất L-arginin bao gồm *Serratia marcescens* thiếu khả năng phân tích L-arginin, và biểu lộ độ kháng với các tác nhân đối kháng arginin và canavanin và tính tự dưỡng cho lysin (xem đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 52-8729).

Vi khuẩn sản xuất L-Histidin

Các ví dụ về các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất vi khuẩn sản xuất L-Histidin bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các dòng vi khuẩn Escherichial, như dòng *E. Coli* 24 (VKPM B-5945, RU2003677), dòng *E. Coli* 80 (VKPM B-7270, RU2119536), *E. Coli* NRRL B-12116 B-12121 (bằng sáng chế Mỹ số 4,388,405), *E. Coli* H-9342 (FERM BP-6675), *E. Coli* H-9343 (FERM BP-6676) (bằng sáng chế Mỹ số 6,344,347), *E. Coli* H-9341 (FERM BP-6674) (EP 1085087), và *E. Coli* AI80/pFM201 (bằng sáng chế Mỹ số 6,258,554).

Các ví dụ về các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất vi khuẩn sản xuất L-Histidin cũng bao gồm các dòng trong đó sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen mã hóa các enzym sinh tổng hợp L-histidin được nâng cao. Các ví dụ về các gen như vậy bao gồm gen ATP phosphoribosyltransferaza (*hisG*), gen phosphoribosyl AMP cyclohydrolaza (*hisI*), gen phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolaza (*hisIE*), gen phosphoribosylformimino 5 aminoimidazole carboxamide ribotide isomeraza (*hisA*), gen amidotransferaza (*hisH*), gen histidinol phosphat aminotransferaza (*hisC*), gen histidinol phosphataza (*hisB*), gen histidinol dehydrogenaza (*hisD*), và v.v..

Đã được biết đến rằng các enzym sinh tổng hợp L-histidin được mã hóa bởi *hisG* và *hisBHAFI* được ức chế bởi L-histidin, và do đó khả năng để sản xuất L-histidin cũng có thể được nâng cao một cách hiệu quả bằng cách đưa vào sự đột biến mà liên quan đến độ kháng với ức chế phản hồi thành các gen mã hóa cho ATP phosphoribosyltransferaza (*hisG*) (các bằng sáng chế Nga số 2003677

và 2119536).

Các ví dụ cụ thể về các dòng có khả năng sản xuất L-histidin bao gồm *E. Coli* FERM-P 5038 và 5048 mà đã được biến đổi với vectơ mang DNA mã hóa enzym sinh tổng hợp L-histidin (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 56-005099), các dòng *E. Coli* được biến đổi với gen mã hóa protein được bao gồm trong xuất khẩu axit amin (EP 1016710 A), dòng *E. Coli* 80 mà kháng guanidinsulfaguanidin, DL-1,2,4 triazole 3 alanin, và streptomycin (VKPM B-7270, bằng sáng chế Nga số 2119536), và v.v..

Vi khuẩn sản xuất L-Cystein

Các ví dụ về các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất vi khuẩn sản xuất L-Cystein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các dòng thuộc về dòng *Escherichia*, như *E. Coli* JM15 mà được biến đổi với *cysE* alleles khác mã hóa các serin axetyltransferaza kháng phản hồi (bằng sáng chế Mỹ số 6,218,168, Đơn xin cấp bằng sáng chế Nga số 2003121601), *E. Coli* W3110 với các gen được biểu hiện quá mức mã hóa các protein mà thúc đẩy sự bài tiết các chất độc tới các tế bào (bằng sáng chế Mỹ số 5,972,663), các dòng *E. Coli* với hoạt động cystein desulfohydraza được làm giảm (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 11-155571), *E. Coli* W3110 với hoạt động được tăng lên của bộ điều chỉnh sao chép dương cho cystein regulon được mã hóa bởi gen *cysB* (WO01/27307A1), và v.v..

Vi khuẩn sản xuất L-Serin

Các ví dụ về các dòng bố mẹ có thể sử dụng để dẫn xuất vi khuẩn sản xuất L-Serin bao gồm vi khuẩn coryneform trong đó gen phosphoserin phosphataza được khuếch đại (các đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2001-275689 và 11-253187), vi khuẩn coryneform có D-3 phosphoglycerat dehydrogenaza được bão hòa với sự ức chế, mà được dẫn xuất từ vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-serin và kháng với azazarin hoặc β -(2-thienyl)-DL-alanin (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 11-266881), và vi khuẩn coryneform sản xuất serin kháng với azazarin hoặc thienylalanin, và thiếu khả năng phân hủy serin (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 10-248588).

Các phương pháp để truyền khả năng sản xuất axit nucleic tới vi sinh vật và vi khuẩn sản xuất axit nucleic sẽ được ví dụ dưới đây.

Vi sinh vật có khả năng sản xuất axit nucleic có thể thu được bằng cách truyền, chẳng hạn, hiện tượng dinh dưỡng thụ động purin nucleosit hoặc độ kháng với thuốc như tương tự purinepurin tới vi khuẩn như được nêu trên (dựa vào các đơn sáng chế Nhật Bản số 38-23099, 54-17033, 55-45199, 57-14160, 57-41915 và 59-42895). Ví dụ, vi khuẩn *Bacillus* có hiện tượng dinh dưỡng thụ động hoặc độ kháng thuốc có thể thu được bởi việc xử lý với tác nhân gây đột biến mà được sử dụng cho việc xử lý tác nhân gây đột biến thông thường như N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) hoặc ethyl methanesulfonat (EMS - ethyl methanesulfonat).

Các ví dụ về vi khuẩn *Bacillus* mà sản xuất purin nucleosit bao gồm các vi khuẩn dưới đây.

Với ví dụ cụ thể về dòng sản xuất inosin thuộc về dòng *Bacillus*, dòng *Bacillus subtilis* KMBS16 có thể được sử dụng. Dòng này được dẫn xuất từ dòng *Bacillus subtilis* trpC2 đã biết (168 Marburg), trong đó gen *purR* mã hóa chất kìm hãm purin operon (*purR::spc*), gen *purA* mã hóa succinyl-AMP synthaza (*purA::erm*), và gen *deoD* mã hóa purin nucleosit phosphorylaza (*deoD::kan*) bị làm gián đoạn (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2004-242610, đơn xin cấp bằng sáng chế Mỹ số 2004166575 A1). Dòng *Bacillus subtilis* AJ3772 (FERM P-2555, đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 62-014794) và v.v. cũng có thể được sử dụng.

Các ví dụ về vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sản xuất guanosin bao gồm vi khuẩn *Bacillus* có hoạt động IMP dehydrogenaza được tăng lên (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 3-58787), vi khuẩn *Bacillus* thu được bằng cách đưa vào vectơ bao gồm gen mà liên quan đến độ kháng với các tương tự purinepurin hoặc decoyinin thành thể đột biến trợ dưỡng adenin (đơn sáng chế Nhật Bản số 4-28357), và v.v..

Các ví dụ về vi khuẩn *Bacillus* mà sản xuất purin nucleotit bao gồm các vi khuẩn dưới đây.

Với vi khuẩn *Bacillus* sản xuất axit inosinic, các dòng sản xuất inosin của

Bacillus subtilis mà đã làm suy giảm hoạt động phosphatase đã được báo cáo (Uchida, K. và cộng sự, Agr. Biol. Chem., 1961, 25, 804-805; Fujimoto, M., Uchida, K., Agr. Biol. Chem., 1965, 29, 249-259). Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit guanylic bao gồm các đột biến của vi khuẩn *Bacillus* mà có hiện tượng dinh dưỡng thụ động adenin, độ kháng với decoyinin hoặc ethioninmethionin sulfoxit và khả năng sản xuất 5' axit guanylic (guanosin 5' monophosphat, dưới đây cũng được gọi là "GMP") (đơn sáng chế Nhật Bản số 56-12438).

Ngoài ra, vi khuẩn sản xuất axit xanthylic có thể được cấu tạo bởi phương pháp được sử dụng để sinh sản vi khuẩn coryneform, ví dụ đặc trưng là gen *Corynebacterium amoniac*. Ví dụ, bằng cách thu được dòng PRPP amidotransferaza được nâng cao (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 8-168383), dòng kháng axit amin béo (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 4-262790), hoặc dòng kháng dehydroprolin (đơn xin cấp bằng sáng chế Hàn Quốc chưa qua xét nghiệm số 2003-56490), vi khuẩn sản xuất axit xanthylic có thể được cấu tạo.

Ngoài ra, các phương pháp ví dụ để sinh sản vi khuẩn *Bacillus* mà có khả năng sản xuất chất có nguồn gốc từ purin cũng bao gồm việc nâng cao hoạt động của enzym mà được bao gồm trong việc sinh tổng hợp purin mà phổ biến với việc sinh tổng hợp của các purin nucleosit và các purin nucleotit, chẳng hạn, enzym sinh tổng hợp purin, trong các tế bào vi khuẩn.

Các ví dụ về enzym được bao gồm trong việc sinh tổng hợp purin bao gồm, chẳng hạn, phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza, phosphoribosyl pyrophosphat synthetaza (PRPP synthetaza [EC: 2.7.6.1]), và v.v..

Một số trong số các chất dị hóa được sản xuất bởi việc trao đổi chất của nguồn đường như đường glucoza mà tham gia vào quá trình pentoza phosphat được chuyển đổi thành riboza 5 phosphat nhờ ribuloza 5 phosphat. Từ riboza 5 phosphat được sinh tổng hợp, phosphoribosyl pyrophosphat (PRPP) được sản xuất, mà là chất tiền thân không thể thiếu cho các quá trình sinh tổng hợp purin nucleosit, histidin và tryptophan. Cụ thể là, riboza 5 phosphat được chuyển đổi thành PRPP bởi phosphoribosyl pyrophosphat synthetaza. Do đó, khả năng sản xuất chất có nguồn gốc từ purin có thể được truyền tới vi khuẩn *Bacillus* hoặc khả năng của vi khuẩn có thể được nâng cao bằng cách sửa đổi vi khuẩn sao cho

hoạt động của phosphoribosyl pyrophosphat synthetaza của nó được tăng lên.

Hoạt động của phosphoribosyl pyrophosphat synthetaza có thể được đo bởi, chẳng hạn, phương pháp của Switzer và cộng sự (Các phương pháp Enzymol., 1978, 51, 3-11) hoặc phương pháp của Roth và cộng sự (Các phương pháp Enzymol., 1978, 51, 12-17). Vi khuẩn *Bacillus* trong đó hoạt động của phosphoribosyl pyrophosphat synthetaza được tăng lên có thể được sản xuất bằng cách, chẳng hạn, làm tăng sự biểu hiện gen mã hóa phosphoribosyl pyrophosphat synthetaza trong vi khuẩn *Bacillus* theo phương pháp sử dụng plasmit hoặc tích hợp các gen thành nhiễm sắc thể, mà có thể được thực hiện theo cách tương tự như các phương pháp được mô tả trong đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2004-242610.

Mặt khác, khi PRPP, mà là chất tiền thân không thể thiếu cho các quá trình sinh tổng hợp purin nucleosit, histidin và tryptophan, được sản xuất, một số trong số đó được chuyển đổi thành các purin nucleotit và các purin nucleosit bởi các enzym được bao gồm trong việc sinh tổng hợp purin. Các ví dụ về các gen mã hóa các enzym như vậy bao gồm các gen của purin operon từ *Bacillus subtilis*, cụ thể là, các gen của *purEKB-purC(orf)QLF-purMNH(J)-purD* operon (Ebbole D.J. và Zalkin H., J. Biol. Chem., 1987, 262, 17, 8274-87) (hiện tại, cũng được gọi là *purEKBCSQLFMNHD*, *Bacillus subtilis* và các họ gần nhất của nó, tổng biên tập: A.L. Sonenshein, ASM Press, Washington D.C., 2002, số truy cập ngân hàng gen NC_000964), và các gen của *pur* regulon từ *Escherichia coli* (*Escherichia* và *Salmonella*, ấn bản thứ hai, tổng biên tập: F.C. Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996).

Theo đó, bằng cách nâng cao sự biểu hiện của các gen này, khả năng sản xuất chất có nguồn gốc từ purin cũng có thể được truyền hoặc được nâng cao. Ngoài ra, các gen của purin operon mà có thể được sử dụng cho sáng chế không bị giới hạn ở các gen này, và các gen được dẫn xuất từ các vi sinh vật, các động vật và các cây trồng khác cũng có thể được sử dụng.

Các ví dụ về phương pháp để làm tăng sự biểu hiện của purin operon bao gồm việc làm tăng sự biểu hiện của các gen của purin operon trong vi khuẩn *Bacillus* bởi phương pháp sử dụng plasmit, tích hợp các gen thành nhiễm sắc thể, hoặc tương tự.

Phương pháp thứ hai để làm tăng sự biểu hiện của purin operon bao gồm việc thay thế chất xúc tác tự nhiên của purin operon với chất trợ xúc tác mạnh hơn, và thay thế vùng -35 hoặc -10 của chất xúc tác tự nhiên với chuỗi đồng nhất.

Ví dụ, trong *bacillus subtilis* (dòng *B. subtilis* 168 Marburg, ATCC 6051), chuỗi -35 của purin operon là chuỗi đồng nhất (TTGACA), nhưng chuỗi -10 là TAAGAT, mà khác với chuỗi đồng nhất TATAAT (Ebbole, D.J. và H. Zalickn, J. Biol. Chem., 1987, 262, 8274-8287). Do đó, bằng cách thay thế chuỗi -10 (TAAGAT) với chuỗi đồng nhất, hoặc bằng cách tạo xấp xỉ chuỗi -10 (TAAGAT) gần với chuỗi đồng nhất, nó có thể được thay đổi thành TATAAT, TATGAT hoặc TAAAAT, và do đó hoạt động sao chép của purin operon có thể được tăng lên. Chuỗi chất trợ xúc tác có thể được thay thế bởi phương pháp tương tự như phương pháp thay thế gen, mà được mô tả dưới đây.

Phương pháp thứ ba để làm tăng sự biểu hiện của purin operon bao gồm việc làm giảm lượng biểu hiện của chất kìm hãm purin operon (bằng sáng chế Mỹ số 6,284,495).

Lượng biểu hiện của chất kìm hãm purin operon (chất kìm hãm purin) có thể được làm giảm bởi, chẳng hạn, phương pháp xử lý vi khuẩn *Bacillus* với chiếu xạ tia cực tím hoặc tác nhân gây đột biến được sử dụng trong việc xử lý tác nhân gây đột biến thông thường như NTG hoặc EMS và chọn chất đột biến thể hiện sự biểu hiện được làm giảm của chất kìm hãm purin.

Ngoài ra, vi khuẩn *Bacillus* với biểu hiện được làm giảm của chất kìm hãm purin cũng có thể thu được bằng cách, chẳng hạn, ngoài việc xử lý tác nhân gây đột biến, thay thế gen mã hóa chất kìm hãm purin trên nhiễm sắc thể (*purR*, số truy cập ngân hàng gen NC_000964) với gen tương ứng mà thường không có chức năng (dưới đây, cũng được gọi là “gen loại được làm gián đoạn”) bởi việc tái tổ hợp tương đồng nhờ sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen (Các thí nghiệm trong phân tử di truyền học, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1972); Matsuyama, S. và Mizushima, S., J. Bacteriol., 1985, 162, 1196-1202).

Ngoài ra, khả năng sản xuất chất có nguồn gốc từ purin cũng có thể được nâng cao bằng cách suy giảm sự hấp thu của chất có nguồn gốc từ các purin thành các tế bào. Ví dụ, sự hấp thu của các purin nucleosit bởi các tế bào có thể

được làm suy giảm bằng cách chặn phản ứng được bao gồm trong sự hấp thu của các purin nucleosit bởi các tế bào. Các ví dụ về phản ứng được bao gồm trong sự hấp thu của các purin nucleosit bởi các tế bào bao gồm các phản ứng được xúc tác bởi các nucleosit permeaza.

Ngoài ra, khi purin nucleosit được sản xuất, hoạt động của enzym mà phân tích chất có nguồn gốc từ các purin có thể được làm giảm để nâng cao khả năng sản xuất purin nucleosit. Các ví dụ về enzym như vậy bao gồm purin nucleosit phosphorylaza.

Các purin nucleotit được sinh tổng hợp từ PRPP bởi các enzym được bao gồm trong việc sinh tổng hợp purin được phospho hóa và do đó được chuyển đổi thành purin nucleosit. Để khiến sự tích tụ của purin nucleosit một cách hiệu quả, mong muốn là làm giảm các hoạt động của các purin nucleosit phosphorylaza, mà còn làm giảm các purin nucleosit thành hypoxanthin hoặc tương tự. Nghĩa là, mong muốn là xúc tác hoặc loại bỏ hoạt động của purin nucleosit phosphorylaza mà sử dụng các purin nucleosit như inosin làm chất nền.

Cụ thể là, hoạt động purin nucleosit phosphorylaza có thể được làm giảm bằng cách phá vỡ các gen *deoD* và *pupG* mã hóa purin nucleosit phosphorylaza trong vi khuẩn *Bacillus*. Vi khuẩn *Bacillus* được sử dụng trong sáng chế có thể được sửa đổi bằng cách phá vỡ một hoặc cả hai gen *deoD* và gen *pupG*. Với các gen *deoD* và *pupG*, chẳng hạn, các gen này được dẫn xuất từ vi khuẩn *Bacillus* (*deoD*; số truy cập ngân hàng gen NC_000964, *pupG*; số truy cập ngân hàng gen NC_000964) có thể được sử dụng.

Khả năng sản xuất chất có nguồn gốc từ purin cũng có thể được nâng cao bằng cách làm giảm hoạt động của succinyl-AMP synthaza. Các ví dụ về gen mã hóa succinyl-AMP synthaza bao gồm gen *purA*. Các ví dụ về gen *purA* bao gồm, chẳng hạn, các ví dụ có chuỗi nucleotit được đăng ký với số truy cập ngân hàng gen NC_000964 (vùng mã hóa tương ứng với các số nucleotit từ 4153460 tới 4155749 của dải bổ sung).

Khả năng sản xuất chất có nguồn gốc từ purin cũng có thể được nâng cao bằng cách làm giảm hoạt động của inosin monophosphat (IMP) dehydrogenaza. Các ví dụ về gen mã hóa IMP dehydrogenaza bao gồm gen *guaB*. Các ví dụ về

gen *guaB* bao gồm, chẳng hạn, các ví dụ có chuỗi nucleotit được đăng ký với số truy cập ngân hàng gen NC_000964 (vùng mã hóa tương ứng với các số nucleotit từ 15913 tới 17376).

Ngoài ra, với phương pháp để nâng cao khả năng sản xuất chất có nguồn gốc từ purin, sự khuếch đại của gen mã hóa protein có hoạt động bài tiết chất có nguồn gốc từ purin có thể được dự tính. Ví dụ về vi khuẩn trong đó gen như vậy đã được khuếch đại là vi khuẩn *Bacillus* trong đó gen *rhtA* được khuếch đại (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2003-219876).

Nhiều ví dụ cụ thể về vi sinh vật có thể sử dụng cho sáng chế bao gồm, chẳng hạn, *Escherichia coli* AJ11442 (NRRL B-12185, FERM BP-1543, dựa vào bằng sáng chế Mỹ số 4,346,170), *Brevibacterium lactofermentum* AJ3990 (ATCC 31269, dựa vào bằng sáng chế Mỹ số 4,066,501) v.v. với L-lysin là chất đích, *Escherichia coli* VKPM B-3996 (RIA1867, VKPM B-3996, dựa vào bằng sáng chế Mỹ số 5,175,107), *Corynebacterium acetoaxitophilum* AJ12318 (FERM BP-1172) (dựa vào bằng sáng chế Mỹ số 5,188,949) v.v. với L-threonin, *Escherichia coli* AJ12604 (FERM BP-3579, dựa vào Đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 488,424 A), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12637 (FERM BP-4160, dựa vào Đơn xin cấp bằng sáng chế Pháp chưa qua xét nghiệm số 2,686,898) v.v. với L-phenylalanin, *Escherichia coli* AJ12624 (FERM BP-3853, dựa vào Đơn xin cấp bằng sáng chế Pháp chưa qua xét nghiệm số 2,680,178), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12475 (FERM BP-2922, dựa vào bằng sáng chế Mỹ số 5,272,067) v.v. cho axit L-glutamic, *Escherichia coli* AJ11478 (FERM P-5274, dựa vào đơn sáng chế Nhật Bản số 62-34397), *Brevibacterium lactofermentum* AJ3718 (FERM P-2516, dựa vào bằng sáng chế Mỹ số 3,970,519) v.v. cho L-leuxin, *Escherichia coli* KX141 (VKPM B-4781, dựa vào đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 519,113 A), *Brevibacterium flavum* AJ12149 (FERM BP-759, dựa vào bằng sáng chế Mỹ số 4,656,135) v.v. với L-leuxinisoleuxin, *Escherichia coli* VL1970 (VKPM B-4411, dựa vào Đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 519,113 A), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12341 (FERM BP-1763, dựa vào bằng sáng chế Mỹ số 5,188,948) v.v. với L-valin, và *Corynebacterium glutamicum* AJ12092 (FERM BP-6906) với L-arginin.

Việc sản xuất chất đích nhờ sử dụng sáng chế có thể đạt được bằng cách

kiểm soát nồng độ của amoniac nằm trong phạm vi nồng độ xác định trong ít nhất giai đoạn được yêu cầu, nghĩa là, ít nhất một phần giai đoạn, trong toàn bộ quy trình nuôi cấy khi lên men.

Giai đoạn được yêu cầu trong toàn bộ quy trình nuôi cấy trong khi lên men nghĩa là giai đoạn trong đó việc nuôi cấy được thực hiện với nồng độ amoniac được kiểm soát ở nồng độ xác định. Điều này được lựa chọn để kiểm soát trong giai đoạn trong đó việc sản xuất của chất được thực hiện. Ví dụ, khi phương pháp của sáng chế bao gồm giai đoạn để sinh sản nhanh vì sinh vật có khả năng để sản xuất chất (giai đoạn sinh sản nhanh) và giai đoạn để sản xuất chất (giai đoạn sản xuất chất), nồng độ amoniac có thể được kiểm soát ở nồng độ xác định ở giai đoạn sản xuất chất, và nồng độ amoniac có thể hoặc không thể được kiểm soát ở nồng độ xác định ở giai đoạn sinh sản nhanh để sinh sản nhanh vì sinh vật.

"Giai đoạn sinh sản nhanh" nghĩa là giai đoạn khi nguồn cacbon được sử dụng ban đầu cho sự phát triển tế bào, nghĩa là, giai đoạn khi vi sinh vật sinh sản nhanh theo lôga, mà có thể là giai đoạn trong 3 tiếng, tốt hơn là 6 tiếng, tốt hơn nữa là 10 tiếng từ khi bắt đầu việc nuôi cấy. "Giai đoạn sản xuất chất" nghĩa là giai đoạn khi nguồn cacbon được sử dụng chủ yếu cho việc sản xuất, mà có thể là giai đoạn sau 3 tiếng, tốt hơn là sau 6 tiếng, tốt hơn nữa là sau 10 tiếng từ khi bắt đầu việc nuôi cấy.

Phạm vi nồng độ xác định có thể được sử dụng cho cả phương pháp thực hiện việc nuôi cấy với việc kiểm soát nồng độ amoniac để nằm trong giai đoạn xác định, và phương pháp thực hiện việc nuôi cấy với việc kiểm soát nồng độ amoniac để không cao hơn so với nồng độ xác định.

Sáng chế có thể được áp dụng tới phương pháp nuôi cấy trong đó các ion cacbonat axit và/hoặc các ion cacbonat dùng các ion trái dấu của các axit amin (dưới đây, có thể được mô tả là quá trình lên men cacbonat). Khi axit amin cơ bản như L-lysin được sản xuất, việc sản xuất có thể được thực hiện bởi phương pháp trong đó quá trình lên men được thực hiện bằng cách kiểm soát áp suất trong bể lên men để duy trì trong khi lên men, hoặc bằng cách cung cấp khí cacbon đioxit hoặc khí được trộn chứa khí cacbon đioxit tới môi trường để cung cấp giai đoạn nuôi cấy ở đó môi trường chứa 20mM hoặc nhiều ion cacbonat axit và/hoặc các

ion cacbonat, sao cho các ion cacbonat axit và/hoặc các ion cacbonat này dùng làm các ion trái dấu của các ion dương chủ yếu bao gồm axit amin cơ bản, và axit amin đích cơ bản tiếp theo được thu thập (đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua xét nghiệm số 2002-65287, đơn xin cấp bằng sáng chế Mỹ số 2002/0025564, EP 1813677 A).

Giai đoạn được yêu cầu trong toàn bộ quy trình nuôi cấy trong khi lên men theo phương pháp nuôi cấy trong đó các ion cacbonat axit và/hoặc các ion cacbonat dùng làm các ion trái dấu của axit amin cơ bản và thu thập axit amin đích cơ bản, không được giới hạn cụ thể được đề xuất rằng năng suất mong muốn đạt được, nhưng cụ thể là, chẳng hạn, có thể không ít hơn so với một phần mười, tốt hơn là không ít hơn so với một phần năm của toàn bộ quy trình nuôi cấy trong việc lên men chính. Cụ thể hơn là, nó có thể bao gồm giai đoạn trong đó pH của môi trường tăng lên do thiếu các ion trái dấu như sunfat và các ion clorua được sử dụng trong môi trường trong khi chất đích cơ bản tích tụ.

Trong việc lên men cacbonat, áp suất trong bể lên men có thể được kiểm soát để dương trong khi lên men, và/hoặc khí cacbon đioxit hoặc khí được trộn chứa khí cacbon đioxit có thể được cung cấp tới môi trường. Cả hai thao tác nêu trên tốt hơn là được thực hiện sao cho có giai đoạn nuôi cấy ở đó tốt hơn là 20mM hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 30mM hoặc nhiều hơn, cụ thể tốt hơn là 40mM hoặc nhiều hơn, của các ion cacbonat axit và/hoặc các ion cacbonat có mặt trong môi trường. Áp suất bên trong của bể lên men, lượng cung cấp của khí cacbon đioxit hoặc khí được trộn chứa khí cacbon đioxit, hoặc khối lượng cung cấp khí bị hạn chế có thể được xác định bằng cách, chẳng hạn, đo các ion cacbonat axit hoặc các ion cacbonat trong môi trường, hoặc pH hoặc nồng độ amoniac của môi trường.

Theo quá trình lên men cacbonat, có thể triệt pH của môi trường thấp sao cho lượng các ion cacbonat axit và/hoặc các ion cacbonat có mặt trong môi trường được yêu cầu là các ion trái dấu nhỏ hơn so với số lượng được sử dụng trong các phương pháp thông thường. Khi pH được kiểm soát với amoniac, amoniac được cung cấp để làm tăng pH, và nó có thể dùng làm nguồn nitơ cho axit amin cơ bản. Các ví dụ về các ion dương khác ngoài axit amin cơ bản trong môi trường bao gồm K, Na, Mg, Ca v.v. có nguồn gốc trong các bộ phận của môi

trường. Điều này tốt hơn là tồn tại theo lượng của 10% hoặc ít hơn, tốt hơn là 5% hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 2% hoặc ít hơn của toàn bộ các ion dương.

Ngoài ra, áp suất bên trong của bể lên men trong khi lên men có thể được thực hiện tích cực bằng cách, chẳng hạn, làm cho áp suất cung cấp khí cao hơn so với áp suất xả. Bằng cách làm cho áp suất bên trong của bể lên men dương, khí cacbon đioxit được tạo ra bởi quá trình lên men phân hủy trong môi trường nuôi cấy để tạo ra các ion cacbonat axit hoặc các ion cacbonat, và các ion này có thể dùng làm các ion trái dấu của axit amin cơ bản. Áp suất bên trong của bể lên men là, cụ thể là, 0,03 tới 0,2 MPa, tốt hơn là 0,05 tới 0,15 MPa, tốt hơn nữa là 0,1 tới 0,3 MPa, về áp suất đo (sự khác biệt áp suất tương ứng với áp suất khí quyển). Ngoài ra, bằng cách cung cấp khí cacbon đioxit hoặc khí được trộn chứa khí cacbon đioxit tới môi trường nuôi cấy, khí cacbon đioxit có thể được phân giải trong môi trường. Ngoài ra, khi cung cấp khí cacbon đioxit hoặc khí được trộn chứa cacbon đioxit tới môi trường, áp suất bên trong của bể lên men có thể được điều chỉnh để dương.

Áp suất bên trong của bể lên men có thể được điều chỉnh để dương bằng cách, chẳng hạn, làm cho áp suất cung cấp khí cao hơn so với áp suất xả. Cụ thể là, điều này được lựa chọn để nuôi cấy bằng cách điều chỉnh một phần áp suất của oxy cao hơn so với áp suất của cacbon đioxit. Ngoài ra, khi khí cacbon đioxit được cung cấp tới môi trường, chẳng hạn, cacbon đioxit tinh khiết hoặc khí được trộn chứa 5 dung tích % hoặc nhiều hơn của cacbon đioxit có thể được nổi bọt trong môi trường.

Các phương pháp nêu trên để phân hủy các ion cacbonat axit và/hoặc các ion cacbonat trong môi trường có thể được sử dụng một lần, hoặc hai hoặc nhiều lần của chúng có thể được sử dụng kết hợp.

Theo các phương pháp thông thường, lượng đủ của amoni sunfat hoặc amoni clorua thường được bổ sung vào môi trường để dùng làm các anion trái dấu của axit amin cơ bản để được sản xuất, và các sản phẩm phân hủy axit sulfuric hoặc axit hydrochloric của các protein v.v. cũng được bổ sung vào môi trường như thành phần dinh dưỡng. Do đó, các ion sunfat và các ion clorua được tạo ra từ chúng có mặt trong môi trường. Do đó, nồng độ của ion cacbonat axit yếu cực kỳ thấp trong khi nuôi cấy, như thứ tự ppm. Phương án nêu trên của sáng

chế được định rõ đặc điểm trong đó các ion sunfat và các ion clorua này được làm giảm, và khí cacbon đioxit được giải phóng bởi vi sinh vật trong việc lên men được phân giải trong môi trường lên men nêu trên và được sử dụng như các ion trái dấu. Do đó, theo phương án nêu trên của sáng chế, không được yêu cầu để bổ sung các ion sunfat hoặc các ion clorua vào môi trường theo lượng nhiều hơn so với lượng được yêu cầu cho sự phát triển. Điều này được lựa chọn rằng lượng amoni sunfat thích hợp hoặc tương tự được bổ sung vào môi trường ở giai đoạn đầu của việc nuôi cấy, và việc bổ sung được dừng ở giữa việc nuôi cấy. Ngoài ra, amoni sunfat hoặc tương tự có thể được cung cấp trong khi duy trì sự cân bằng với các ion cacbonat hoặc các ion cacbonat axit được phân giải trong môi trường. Ngoài ra, với nguồn nitơ của axit amin cơ bản, amoniac có thể được cung cấp tới môi trường. Amoni có thể được cung cấp tới môi trường một lần, hoặc cùng với các khí khác.

Các nồng độ thấp hơn của các anion khác ngoài các ion cacbonat axit và/hoặc các ion cacbonat trong môi trường nhiều lựa chọn hơn miễn là chúng có mặt trong các lượng mà được yêu cầu cho sự phát triển của vi sinh vật. Các ví dụ về các anion như vậy bao gồm các ion clorua, các ion sunfat, các ion phosphat, các axit hữu cơ được ion hóa, các ion hydroxit, và v.v.. Tổng nồng độ mol của các ion khác này thường tốt hơn là 900mM hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 700mM hoặc thấp hơn, vẫn tốt hơn nữa là 500mM hoặc thấp hơn, còn tốt hơn là 300mM hoặc thấp hơn, cụ thể tốt hơn là 200mM hoặc thấp hơn.

Để làm giảm các lượng của các ion sunfat và/hoặc các ion clorua để được sử dụng là một trong số các đối tượng của phương án nêu trên của sáng chế, và tổng lượng của các ion sunfat hoặc các ion clorua, hoặc cả hai được chứa trong môi trường thường là 700mM hoặc thấp hơn, tốt hơn là 500mM hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 300mM hoặc thấp hơn, vẫn tốt hơn nữa là 200mM hoặc thấp hơn, cụ thể tốt hơn là 100mM hoặc thấp hơn.

Nếu amoni sunfat được bổ sung vào môi trường như nguồn ion trái dấu của axit amin cơ bản, khí cacbon đioxit trong môi trường nuôi cấy thường được loại bỏ bởi các ion sunfat. Tuy nhiên, theo phương án nêu trên của sáng chế, không cần bổ sung lượng vượt quá của amoni sunfat vào môi trường, và do đó khí cacbon đioxit có thể dễ dàng được phân giải trong môi trường lên men.

Ngoài ra, theo phương án nêu trên của sáng chế, mong muốn là kiểm soát tổng nồng độ amoniac trong môi trường đến mức độ mà "việc sản xuất của axit amin cơ bản không bị ức chế". Các ví dụ về các điều kiện để đạt được mục đích như vậy bao gồm, chẳng hạn, các điều kiện để tạo ra sản lượng và/hoặc năng suất của tốt hơn là 50% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 70% hoặc nhiều hơn, cụ thể tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, của sản lượng và/hoặc năng suất thu được theo các điều kiện tối ưu. Cụ thể là, tổng nồng độ amoniac trong môi trường là, chẳng hạn, 300mM hoặc thấp hơn, 250mM hoặc thấp hơn, 200mM hoặc thấp hơn, 100mM hoặc thấp hơn, hoặc 50mM hoặc thấp hơn. Độ phân hủy của amoniac giảm xuống khi pH trở nên cao hơn. Amoni không được ion hóa độc hơn với vi khuẩn so với các ion amoni. Do đó, giới hạn trên của tổng nồng độ amoniac sẽ được xác định tùy thuộc vào pH của môi trường nuôi cấy. Nghĩa là, khi pH của môi trường nuôi cấy tăng lên, có thể chấp nhận được tổng nồng độ amoniac giảm xuống. Do đó, tổng nồng độ amoniac nêu trên "mà không ức chế việc sản xuất axit amin cơ bản" tốt hơn là được xác định cho mỗi trị số pH cụ thể. Tuy nhiên, phạm vi tổng nồng độ amoniac mà có thể chấp nhận được ở mức pH cao nhất trong khi nuôi cấy có thể được sử dụng như giới hạn trên của tổng nồng độ amoniac suốt toàn bộ giai đoạn nuôi cấy.

Mặt khác, tổng nồng độ amoniac mà có chức năng là nguồn nitơ được yêu cầu cho sự phát triển của vi sinh vật và việc sản xuất của chất cơ bản không được giới hạn cụ thể, và có thể được xác định một cách thích hợp, miễn là mức được làm giảm của nguồn nitơ mà có thể dẫn đến sự suy giảm liên tục của amoniac trong khi nuôi cấy không làm giảm năng suất của chất mục tiêu bởi vi sinh vật. Ví dụ, nồng độ amoniac có thể được đo ngoài thời gian trong khi nuôi cấy, và nếu amoniac trong môi trường bị suy giảm, lượng amoniac nhỏ có thể được bổ sung vào môi trường. Mặc dù tổng nồng độ amoniac sau khi việc bổ sung amoniac không được giới hạn cụ thể, tổng nồng độ amoniac có thể, chẳng hạn, tốt hơn là 1mM hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 10mM hoặc cao hơn, cụ thể tốt hơn là 20mM hoặc cao hơn.

Ngoài ra, trong khi lên men axit L-glutamic, việc nuôi cấy có thể được thực hiện với việc ký gửi axit L-glutamic trong môi trường bằng cách sử dụng môi trường lỏng được điều chỉnh để có điều kiện theo đó axit L-glutamic được ký

gửi. Điều kiện theo đó axit L-glutamic được ký gửi là, chẳng hạn, pH 5,0 tới 4,0, tốt hơn là pH 4,5 tới 4,0, tốt hơn nữa là pH 4,3 tới 4,0, cụ thể tốt hơn là pH 4,0 (đơn xin cấp bằng sáng chế châu Âu số 1078989 A).

Ví dụ

Việc sản xuất L-arginin sử dụng thiết bị của sáng chế

Ví dụ này thể hiện ví dụ về việc áp dụng việc nuôi cấy kiểm soát amoniac nhờ sử dụng thiết bị của sáng chế tới việc sản xuất L-arginine bởi vi khuẩn coryneform. Với dòng sản xuất L-arginin, *Corynebacterium glutamicum* AJ12092 (FERM BP-6906) đã được sử dụng.

Thiết bị của sáng chế được sử dụng trong ví dụ này đã có cấu hình được mô tả dưới đây.

Bộ cảm biến amoniac 10:

Bộ cảm biến amoniac 10 bao gồm bộ cảm biến loại điện cực bên trong sử dụng màng thấm amoniac, và thể hiện việc thay đổi điện áp tương ứng với amoniac không được ion hóa. Nó đã được đưa vào trong bể nuôi cấy 200.

Thiết bị kiểm soát amoniac 100:

Có được sử dụng máy tính có bộ phận lưu trữ 106, bộ phận kiểm soát 103, bộ phận đưa vào tín hiệu 108 được nối với bộ cảm biến amoniac 10, và bộ phận đưa ra kiểm soát 104 được nối với bộ phận cung cấp amoniac 300. Bộ phận lưu trữ 106 lưu trữ đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy 200, và điện áp được đo với bộ cảm biến amoniac 10. Bộ phận kiểm soát 102 thực hiện bước tính nồng độ amoniac để đo điện áp với bộ cảm biến amoniac 10, và tính nồng độ amoniac không được ion hóa trong bể nuôi cấy 200 từ điện áp bằng cách sử dụng đường cong chuẩn, và bước điều khiển cung cấp amoniac để, khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ kiểm soát được thiết đặt, điều khiển bộ phận cung cấp amoniac 300 cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy 200.

Bộ phận cung cấp amoniac 300:

Bộ phận cung cấp amoniac 300 có bộ phận chứa chứa dung dịch amoni sunfat nước, và nó được bố trí sao cho dung dịch amoni sunfat nước có thể được

làm giảm từ bộ phận chứa tới bể nuôi cấy với bơm con lăn, và đổ dung dịch ở tỷ lệ đổ được thiết đặt trên cơ sở của tín hiệu được gửi từ thiết bị kiểm soát amoniac 100.

(1) Việc kiểm soát nồng độ amoniac trong khi lên men Arg nhờ sử dụng thiết bị của sáng chế

L-arginin đã được sản xuất với việc kiểm soát tổng nồng độ amoniac, mà về cơ bản giảm xuống với sự tiến bộ của việc nuôi cấy, để ổn định bằng cách sử dụng thiết bị của sáng chế. Với việc sản xuất này, ba loại điều kiện của 20mM, 100mM, và 300mM đã được thiết đặt khi nồng độ mà ở đó tổng nồng độ amoniac trong môi trường được kiểm soát. 1 N KOH đã được làm giảm tới 300mL của môi trường sản xuất L-arginin được thể hiện trên bảng 1 được chứa trong bình lên men để điều chỉnh pH của môi trường là 6,9. Amoni sunfat đã được trộn trong môi trường sản xuất L-arginin sao cho tổng nồng độ amoniac ban đầu trở thành 20mM, 100mM, hoặc 300mM. Dòng *Corynebacterium glutamicum* AJ12092 đã được áp dụng tới toàn bộ bề mặt của đĩa của môi trường thạch CM-Dex được thể hiện trên bảng 2, và được nuôi cấy ở 31,5°C trong 24 tiếng, và các tế bào được phát triển ở môi trường thạch trắng của một đĩa đã được ghép thành bình lên men. Việc nuôi cấy đã được thực hiện ở tốc độ khuấy của 700 vòng một phút với việc duy trì nhiệt độ 31,5°C và với sự thông gió của 300mL/phút của không khí được khử trùng với bộ lọc. pH của môi trường, mà về cơ bản giảm xuống với sự tiến bộ của việc nuôi cấy, đã được duy trì ở 6,9 bằng cách bổ sung 6 N KOH. Ngoài ra, dung dịch 692 g/L được tiệt trùng riêng biệt của đường glucoza (chứa 0,05mL/L của chất chống bọt GD-113) đã được bổ sung một cách thích hợp sao cho nồng độ đường glucoza trong môi trường, mà về cơ bản giảm xuống với sự tiến bộ của việc nuôi cấy, đã được duy trì ở khoảng 40 g/L. Việc nuôi cấy đã được thực hiện trong 52 tiếng. Khi nồng độ amoniac không được ion hóa trở nên thấp hơn so với giá trị được thiết đặt, dung dịch amoni sunfat nước đã tự động được làm giảm bởi thiết bị của sáng chế sao cho tổng nồng độ amoniac được thiết đặt sẽ được duy trì, và tổng nồng độ amoniac do đó đã được kiểm soát ổn định trong khi nuôi cấy. Cụ thể là, nồng độ amoniac không được ion hóa trong môi trường đã được đo theo thời gian thực với bộ cảm biến amoniac được đưa vào bình lên men, và được tiệt trùng riêng biệt 450 g/L dung dịch amoni sunfat nước đã tự

động được làm giảm tới môi trường từ bộ phận cung cấp amoniac sao cho tổng nồng độ amoniac đích đã được duy trì. Do đó, quá trình lên men Arg có thể được thực hiện với việc tự động duy trì nồng độ amoniac không được ion hóa đích và tổng nồng độ amoniac như được thể hiện trên Fig.7 theo cách mà các dòng sản xuất L-leuxin giảm xuống bằng cách sử dụng thiết bị của sáng chế. Để kiểm soát tổng nồng độ amoniac là 20mM, 100mM, và 300mM, 450 g/L dung dịch amoni sunfat nước đã lần lượt được làm giảm ở các tốc độ của 0,77mL/giờ, 0,90mL/giờ, và 1,30mL/giờ (các tốc độ trung bình trong toàn bộ giai đoạn nuôi cấy). Khi tổng nồng độ amoniac đã được kiểm soát là 300mM, kiểm tra việc sử dụng bộ cảm biến amoniac bên ngoài đã được thực hiện bằng cách sử dụng mẫu được thu thập ở giữa việc nuôi cấy (8 tiếng) và được tạo kiểm một cách đầy đủ để chuyển hóa ion amoni được chứa tới amoniac không được phân hủy.

Theo các kết quả này, điều này đã được giải thích rằng, trong việc sản xuất của axit amin L bởi quá trình lên men, việc nuôi cấy có thể được thực hiện với việc kiểm soát tự động nồng độ amoniac trong môi trường (nồng độ amoniac không được ion hóa và tổng nồng độ amoniac) ổn định theo cách cực kỳ đơn giản bằng cách sử dụng thiết bị của sáng chế.

(2) Việc nâng cao năng suất Arg được tạo ra bằng cách sử dụng thiết bị của sáng chế.

Tiếp theo, lượng sản xuất Arg thu được bằng cách kiểm soát tổng nồng độ amoniac nhờ sử dụng thiết bị của sáng chế và lượng tương tự thu được bằng cách kiểm soát tổng nồng độ amoniac nhờ sử dụng phương pháp kiểm soát bằng tay phổ biến đã được so sánh. Tổng nồng độ amoniac mà nồng độ đã được kiểm soát đã được thiết đặt là 300mM. 1 N KOH đã được làm giảm tới 300mL của môi trường sản xuất L-arginin được thể hiện trên bảng 1 được chứa trong bình lên men để điều chỉnh pH của môi trường là 6,9. Amoni sunfat đã được trộn trong môi trường sản xuất L-arginin sao cho nồng độ amoniac ban đầu trở thành 300mM. Dòng *Corynebacterium glutamicum* AJ12092 đã được áp dụng tới toàn bộ bề mặt của đĩa của môi trường thạch CM-Dex được thể hiện trên bảng 2, và được nuôi cấy ở 31,5°C trong 24 tiếng, và các tế bào được phát triển ở môi trường thạch trắng của một đĩa đã được ghép thành bình lên men. Việc nuôi cấy đã được thực hiện ở tốc độ khuấy của 700 vòng một phút với việc duy trì nhiệt độ

là 31,5°C và với sự thông gió của 300mL/phút của không khí được khử trùng với bộ lọc. pH của môi trường, mà về cơ bản giảm xuống với sự tiến bộ của việc nuôi cấy, đã được duy trì ở 6,9 bằng cách bổ sung 6 N KOH. Ngoài ra, dung dịch 692 g/L được tiết trùng riêng biệt của đường glucoza (chứa 0,05mL/L của chất chống bọt GD-113) đã được bổ sung một cách thích hợp sao cho nồng độ đường glucoza trong môi trường, mà về cơ bản giảm xuống với sự tiến bộ của việc nuôi cấy, đã được duy trì ở khoảng 40 g/L. Việc nuôi cấy đã được thực hiện trong 52 tiếng. Tổng nồng độ amoniac đã được kiểm soát bởi hai loại phương pháp, chẳng hạn, phương pháp sử dụng thiết bị của sáng chế như cách được mô tả ở phần trước, và phương pháp bổ sung bằng tay 3mL của 450 g/L dung dịch amoni sunfat nước khi tổng nồng độ amoniac trở nên thấp hơn so với giá trị được thiết đặt (giá trị kiểm soát). Do đó, khi thiết bị của sáng chế đã được sử dụng, tổng nồng độ amoniac có thể được kiểm soát tự động. Mặt khác, khi tổng nồng độ amoniac đã được kiểm soát bằng tay, amoni sunfat dung dịch lỏng đã được bổ sung bằng tay 17 lần trong khi nuôi cấy trong 52 tiếng. Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.8, khi thiết bị của sáng chế đã được sử dụng, arginin được tích tụ ở nồng độ cao hơn so với trường hợp ở đó tổng nồng độ amoniac đã được kiểm soát bằng tay. Ngoài ra, đối với tổng lượng sản xuất arginin, 11,1 g arginin đã được sản xuất trong trường hợp sử dụng thiết bị của sáng chế, trong khi 9,5 g arginin đã được sản xuất trong trường hợp kiểm soát bằng tay.

Việc kiểm tra sử dụng bộ cảm biến amoniac bên ngoài đã được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy được thu thập ở giữa việc nuôi cấy (8 tiếng) và được tạo kiềm một cách đầy đủ để chuyển hóa ion amoni được chứa tới amoniac không được phân hủy.

Theo các kết quả này, điều này đã được giải thích rằng, trong việc sản xuất axit amin L bởi quá trình lên men, việc nuôi cấy có thể được thực hiện với việc kiểm soát tự động nồng độ amoniac trong môi trường (nồng độ amoniac không được ion hóa và tổng nồng độ amoniac) ổn định theo cách cực kỳ đơn giản, và ngoài ra, khả năng sản xuất axit amin L cũng có thể được nâng cao bằng cách sử dụng thiết bị của sáng chế.

[Bảng 1]

Bảng 1: Môi trường sản xuất L-arginin

	Với nồng độ aminiac ban đầu là 20mM	Với nồng độ aminiac ban đầu là 100mM	Với nồng độ aminiac ban đầu là 300mM
Đường glucoza	40 g/L	40 g/L	40 g/L
Thuỷ phân protein đậu nành (6.57mL/L của thuỷ phân có 35 g/L của trọng lượng nitơ)	0,23 g/L (về mặt trọng lượng nitơ)	0,23 g/L (về mặt trọng lượng nitơ)	0,23 g/L (về mặt trọng lượng nitơ)
KH_2PO_4	1,00 g/L	1,00 g/L	1,00 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,32 g/L	6,6 g/L	19,8 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,40 g/L	0,40 g/L	0,40 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L
Thiamin hydrochlorit	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L
Biotin	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L
GD-113 (chất chống bọt)	0,05mL/L	0,05mL/L	0,05mL/L

Môi trường đã được điều chỉnh tới pH 6,0 với dung dịch lỏng KOH, và được hấp ở 120°C trong 120 phút.

[Bảng 2]

Bảng 2: Môi trường thạch CM-Dex

Đường glucoza	5,0	g/L
Polypeptone	10,0	g/L
Chiết xuất nấm men	10,0	g/L
KH_2PO_4	1,0	g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,0	mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10,0	mg/L
Urê	3,0	g/L
Thủy phân protein đậu nành	1,2	g/L
(34.3mL/L của thủy phân có (về mặt trọng 35 g/L của trọng lượng nito)	lượng nito)	
Biotin	10,0	$\mu\text{g/L}$
Agar	20,0	g/L

Môi trường đã được điều chỉnh tới pH 7,5 với dung dịch lỏng KOH, và được hấp ở 120°C trong 120 phút. Sau khi hấp, môi trường đã được đổ vào đĩa petri và được đóng đông.

Theo các kết quả này, điều này đã được giải thích là, trong việc sản xuất axit amin L bởi quá trình lên men, việc nuôi cấy có thể được thực hiện với việc kiểm soát nồng độ amoniac trong môi trường ổn định theo cách cực kỳ đơn giản bằng cách sử dụng thiết bị của sáng chế.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Như được giải thích chi tiết ở trên, theo sáng chế, việc nuôi cấy có thể được thực hiện với việc kiểm soát liên tục và một cách tùy ý nồng độ amoniac trong môi trường nuôi cấy, và do đó nó có thể được sử dụng trong các lĩnh vực của các ngành công nghiệp hóa học bao gồm ngành công nghiệp vi sinh, và v.v..

Danh mục các số chỉ dẫn

- 100 Thiết bị kiểm soát amoniac
- 102 Bộ phận kiểm soát
 - 102a Bộ phận tạo đường cong chuẩn
 - 102b Bộ phận tính nồng độ amoniac không được ion hóa
 - 102c Bộ phận đo trị số pH
 - 102d Bộ phận tính tổng nồng độ amoniac
 - 102e Bộ phận điều khiển cung cấp amoniac
 - 102f Điện áp để kiểm tra bộ phận đo
 - 102g Bộ phận kiểm tra
- 104 Bộ phận đưa ra kiểm soát
- 106 Bộ phận lưu trữ
 - 106a Tập tin đường cong phân ly amoniac
 - 106b Tập tin đường cong chuẩn
 - 106c Tập tin nồng độ amoniac không được ion hóa
 - 106d Tập tin trị số pH
 - 106e Tập tin tổng nồng độ amoniac
- 108 Bộ phận đưa vào tín hiệu
- 10 Bộ cảm biến amoniac
- 11, 13 Bộ khuếch đại NH_3
- 12 Bộ cảm biến amoniac bên ngoài
- 20 Bộ cảm biến pH
- 21 Bộ khuếch đại
- 200 Bể nuôi cấy
- 300 Bộ phận cung cấp amoniac

- 30 Bể amoniac
- 31 Công tắc
- 32 Van

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp kiểm soát amoniac cho quá trình lên men, mà để kiểm soát nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200), trong đó nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy (200) được kiểm soát bằng cách sử dụng thiết bị kiểm soát amoniac (100) bao gồm ít nhất bộ phận cung cấp amoniac (300) để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy (200), bộ cảm biến amoniac (10) mà phản ứng với amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200), và bộ phận kiểm soát (102) được nối với bộ phận cung cấp amoniac (300) và bộ cảm biến amoniac (10), và phương pháp này bao gồm các bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát (102):

bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa để tính nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy bằng cách thay thế tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (10) thành đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (10), và

bước điều khiển cung cấp amoniac để điều khiển bộ phận cung cấp amoniac (300) cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy (200) khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ định trước, trong đó thiết bị kiểm soát amoniac (100) còn được nối với bộ cảm biến pH (20) để đo trị số pH của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200),

trong đó phương pháp này còn bao gồm bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát (102):

bước tính tổng nồng độ amoniac để tính tổng nồng độ amoniac từ nồng độ amoniac không được ion hóa được tính ở bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa và trị số pH được đo với bộ cảm biến pH (20) trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac thể hiện tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ ion amoni trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200) ở mỗi trị số pH, và

trong đó ở bước điều khiển cung cấp amoniac, tổng nồng độ amoniac được sử dụng thay cho nồng độ amoniac không được ion hóa.

2. Phương pháp kiểm soát amoniac theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tạo đường cong chuẩn để tạo ra đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (10).

3. Phương pháp kiểm soát amoniac theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm việc bố trí bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12) ở bên ngoài bể nuôi cấy (200) để đo nồng độ amoniac không được ion hóa, và

thu được tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12) bằng cách đo nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy, mà, sau khi thu thập từ bể nuôi cấy (200), được tạo kiềm một cách đầy đủ để chuyển hóa ion amoni thành amoniac không được ion hóa với bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12), như tín hiệu để kiểm tra, và

trong đó phương pháp này còn bao gồm bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát (102):

bước kiểm tra để kiểm tra đường cong chuẩn sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa được tính từ tín hiệu để kiểm tra trên cơ sở của các lượng đường cong chuẩn tới tổng nồng độ amoniac được tính ở bước tính tổng nồng độ amoniac.

4. Phương pháp kiểm soát amoniac theo điểm 3, trong đó thiết bị kiểm soát amoniac (100) được nối với bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12), và phương pháp này còn bao gồm bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát (102):

bước đưa vào tín hiệu để kiểm tra để đưa vào tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12), như tín hiệu để kiểm tra.

5. Phương pháp sản xuất chất đích bằng quá trình lên men bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật có khả năng để sản xuất chất đích trong bể nuôi cấy (200) chứa môi trường nuôi cấy, và thu thập chất đích từ việc nuôi cấy, trong đó vi sinh vật được nuôi cấy với việc kiểm soát nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy bằng phương pháp kiểm soát amoniac, trong đó nồng độ amoniac trong bể nuôi cấy (200) được kiểm soát bằng cách sử dụng thiết bị kiểm soát amoniac (100) bao gồm ít nhất bộ phận cung cấp amoniac (300) để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy

(200), bộ cảm biến amoniac (10) mà phản ứng với amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200), và bộ phận kiểm soát (102) được nối với bộ phận cung cấp amoniac (300) và bộ cảm biến amoniac (10), và phương pháp này bao gồm các bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát (102):

bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa để tính nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy bằng cách thay thế tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (10) thành đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (10), và

bước điều khiển cung cấp amoniac để điều khiển bộ phận cung cấp amoniac (300) cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy (200) khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ định trước, trong đó thiết bị kiểm soát amoniac (100) còn được nối với bộ cảm biến pH (20) để đo trị số pH của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200), phương pháp này còn bao gồm bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát (102):

bước tính tổng nồng độ amoniac để tính tổng nồng độ amoniac từ nồng độ amoniac không được ion hóa được tính ở bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa và trị số pH được đo với bộ cảm biến pH (20) trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac thể hiện tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ ion amoni trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200) ở mỗi trị số pH, và

trong đó ở bước điều khiển cung cấp amoniac, tổng nồng độ amoniac được sử dụng thay cho nồng độ amoniac không được ion hóa.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó phương pháp kiểm soát amoniac này còn bao gồm bước tạo đường cong chuẩn để tạo ra đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (10).

7. Phương pháp theo điểm 5 hoặc 6, trong đó phương pháp kiểm soát amoniac này bao gồm việc bố trí bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12) ở phía ngoài bể nuôi cấy (200) để đo nồng độ amoniac không được ion hóa, và

thu được tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12) bằng cách đo nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy, mà, sau khi thu thập từ bể nuôi cấy (200), được tạo kiềm một cách đầy đủ để chuyển hóa ion amoni thành amoniac không được ion hóa với bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12), như tín hiệu để kiểm tra, và phương pháp này còn bao gồm bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát (102):

bước kiểm tra để kiểm tra đường cong chuẩn sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa được tính từ tín hiệu để kiểm tra trên cơ sở của các lượng đường cong chuẩn tới tổng nồng độ amoniac được tính ở bước tính tổng nồng độ amoniac.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó thiết bị kiểm soát amoniac (100) được nối với bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12), và

trong đó phương pháp này còn bao gồm bước dưới đây được thực hiện bởi bộ phận kiểm soát (102):

bước đưa vào tín hiệu để kiểm tra để đưa vào tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12), như tín hiệu để kiểm tra.

9. Phương pháp điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 8, trong đó chất đích là axit amin L, axit hữu cơ, axit nucleic, rượu, hoặc protein.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó chất đích là axit amin có tính bazơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm L-lysin, L-arginin, và L-histidin.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp này bao gồm việc làm giảm số lượng các ion sulfat và/hoặc ion clorua được sử dụng như các ion trái dấu của axit amin có tính bazơ bằng cách điều chỉnh tổng nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy nằm trong phạm vi nồng độ xác định trong ít nhất một phần của toàn bộ quy trình nuôi cấy.

12. Thiết bị kiểm soát amoniac (100) bao gồm ít nhất bộ phận cung cấp amoniac (300) được lắp vào để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy (200) cho quá trình lên men, bộ cảm biến amoniac (10), và bộ phận kiểm soát (102), trong đó:

bộ cảm biến amoniac (10) được lắp vào để phản ứng với amoniac không được ion hóa trong môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200),

bộ phận kiểm soát (102) được nối với bộ phận cung cấp amoniac (300) và bộ cảm biến amoniac (10),

bộ phận kiểm soát (102) được tạo kết cấu để tạo ra đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy và tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (10),

được tạo kết cấu để tính nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy bằng cách thay thế tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac (10) thành đường cong chuẩn, và

được tạo kết cấu để điều khiển bộ phận cung cấp amoniac (300) cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy (200) khi nồng độ amoniac không được ion hóa được tính thấp hơn so với nồng độ định trước, mà còn được nối với bộ cảm biến pH (20) được lắp vào để đo trị số pH của môi trường nuôi cấy được chứa trong bể nuôi cấy (200), và

trong đó bộ phận kiểm soát (102) còn được tạo kết cấu để tính tổng nồng độ amoniac từ nồng độ amoniac không được ion hóa được tính và trị số pH được đo với bộ cảm biến pH (20) trên cơ sở của đường cong phân ly amoniac thể hiện tỷ lệ hiện thời của nồng độ amoniac không được ion hóa và nồng độ ion amoni trong môi trường nuôi cấy ở mỗi trị số pH, và

tổng nồng độ amoniac được sử dụng thay cho nồng độ amoniac không được ion hóa.

13. Thiết bị kiểm soát amoniac theo điểm 12, trong đó bộ phận kiểm soát (102) còn được tạo kết cấu để kiểm tra đường cong chuẩn sao cho nồng độ amoniac không được ion hóa được tính từ tín hiệu để kiểm tra trên cơ sở của các lượng đường cong chuẩn tới tổng nồng độ amoniac được tính bởi phương tiện tính tổng nồng độ amoniac, và tín hiệu để kiểm tra là:

tín hiệu thu được với bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12) được bố trí bên ngoài bể nuôi cấy (200) để đo nồng độ amoniac không được ion hóa bằng cách chuẩn bị bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12), và

đo nồng độ amoniac không được ion hóa của môi trường nuôi cấy, mà, sau khi thu thập từ bể nuôi cấy (200), được tạo thêm một cách đầy đủ để chuyển

hóa ion amoni thành amoniac không được ion hóa với bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12).

14. Thiết bị kiểm soát amoniac theo điểm 13, trong đó thiết bị này được nối với bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12), và trong đó bộ phận kiểm soát (102) còn được lắp vào để đưa vào tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac bên ngoài (12), như tín hiệu để kiểm tra.

15. Thiết bị kiểm soát amoniac theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 14, trong đó thiết bị này được tạo kết cấu để kiểm soát amoniac theo thời gian thực trong môi trường nuôi cấy.

16. Phương pháp sản xuất chất đích bằng quá trình lên men bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật có khả năng để sản xuất chất đích trong bể nuôi cấy (200) chứa môi trường nuôi cấy để sản xuất và tích tụ chất đích trong môi trường nuôi cấy, trong đó tổng nồng độ amoniac của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh để nằm trong phạm vi nồng độ xác định trong ít nhất một phần của toàn bộ quy trình nuôi cấy bằng cách sử dụng thiết bị kiểm soát amoniac (100) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 15.

Đưa vào tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac tương ứng với amoniac không được ion hóa ở môi trường nuôi cấy trong bể nuôi cấy



Thiết bị kiểm soát amoniac thực hiện các bước sau:

Bước tạo đường cong chuẩn

Bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa

Bước điều khiển cung cấp amoniac



Điều khiển bộ phận cung cấp amoniac để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy

Fig. 1A

Đưa vào tín hiệu từ bộ cảm biến amoniac tương ứng với amoniac không được ion hóa ở môi trường nuôi cấy trong bể nuôi cấy

Đưa vào pH được đo của môi trường nuôi cấy trong bể nuôi cấy



Thiết bị kiểm soát amoniac thực hiện các bước sau:

Bước tạo đường cong chuẩn

Bước tính nồng độ amoniac không được ion hóa

Bước tính tổng nồng độ amoniac

Bước điều khiển cung cấp amoniac



Điều khiển bộ phận cung cấp amoniac để cung cấp amoniac tới bể nuôi cấy

Fig. 1B

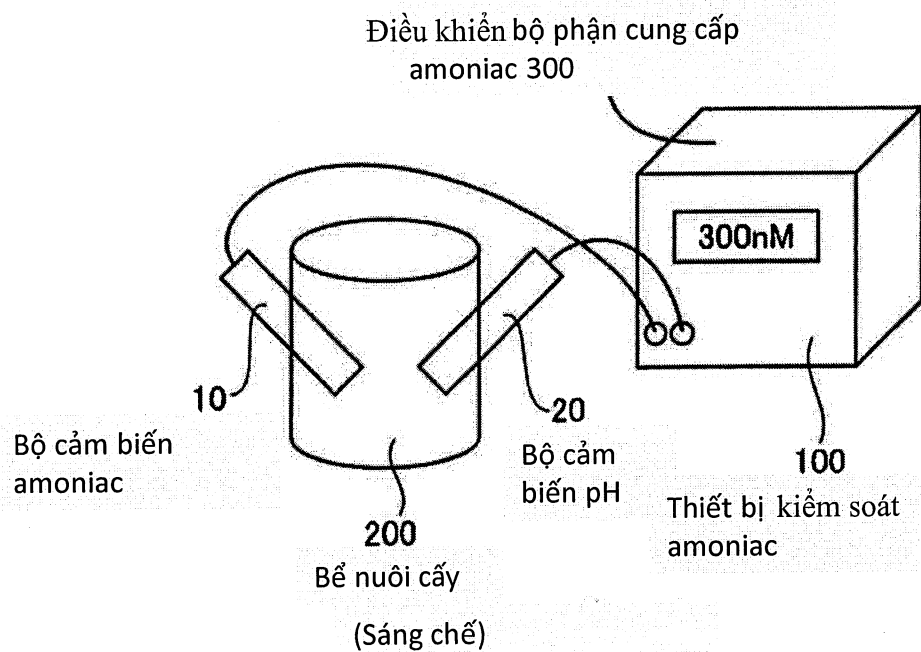


Fig. 2

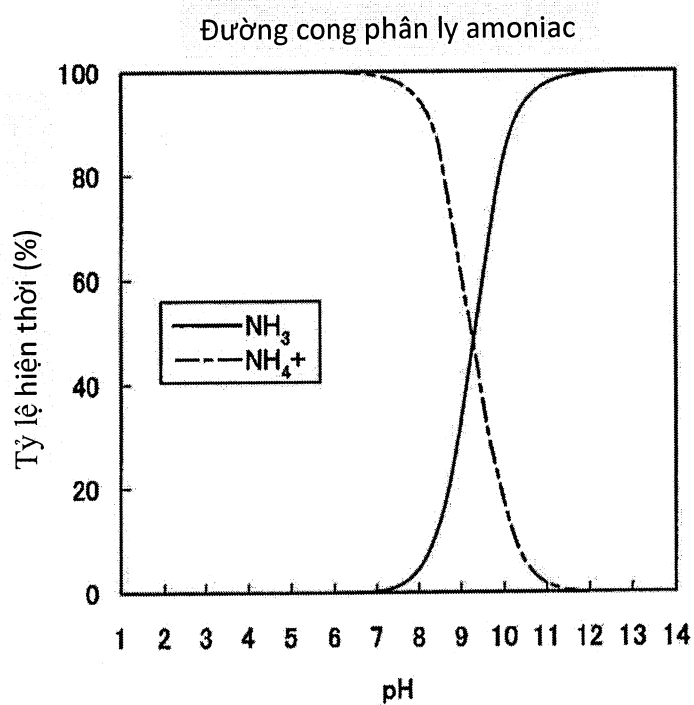


Fig. 3

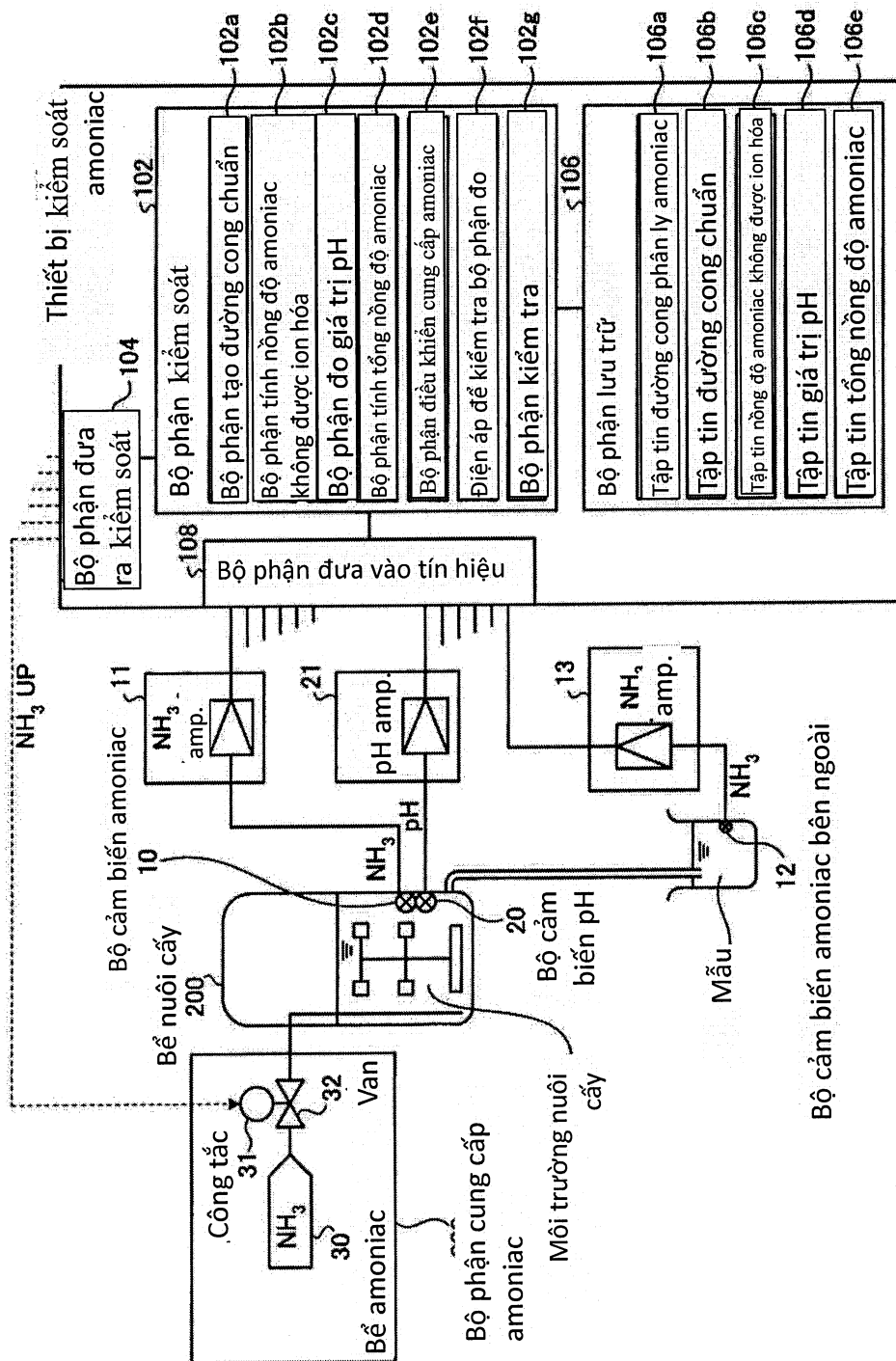


Fig. 4

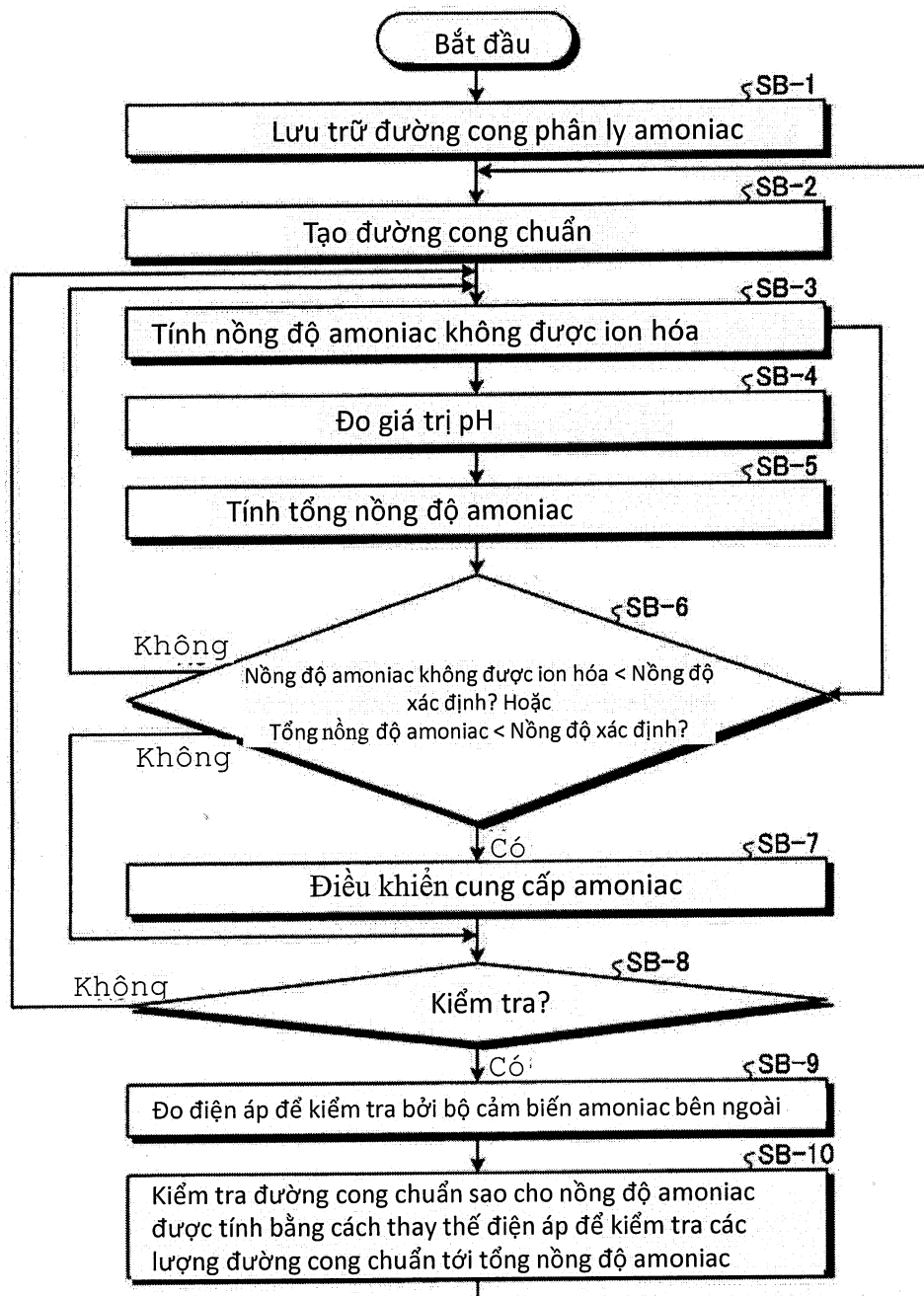


Fig. 5

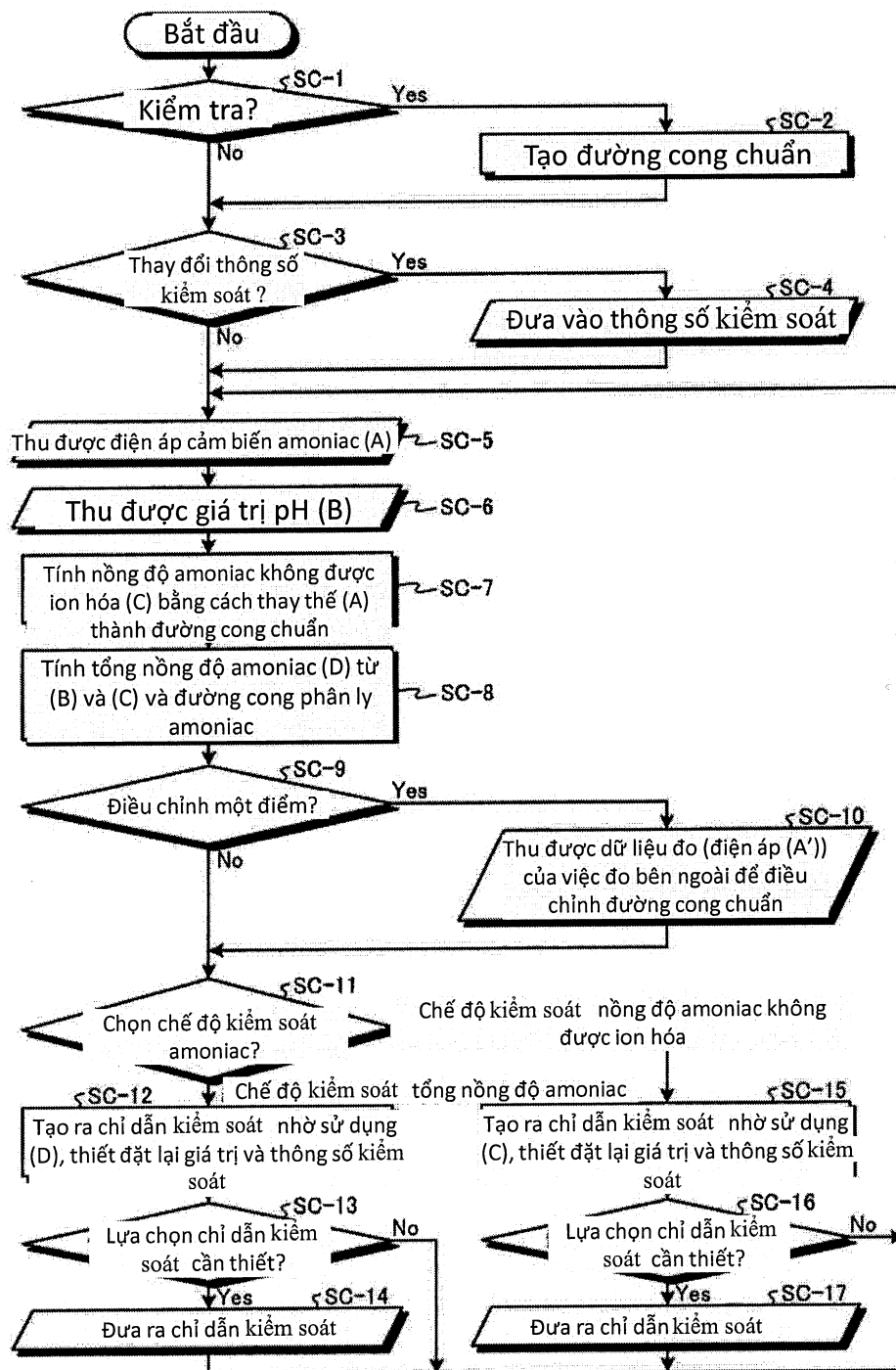


Fig. 6

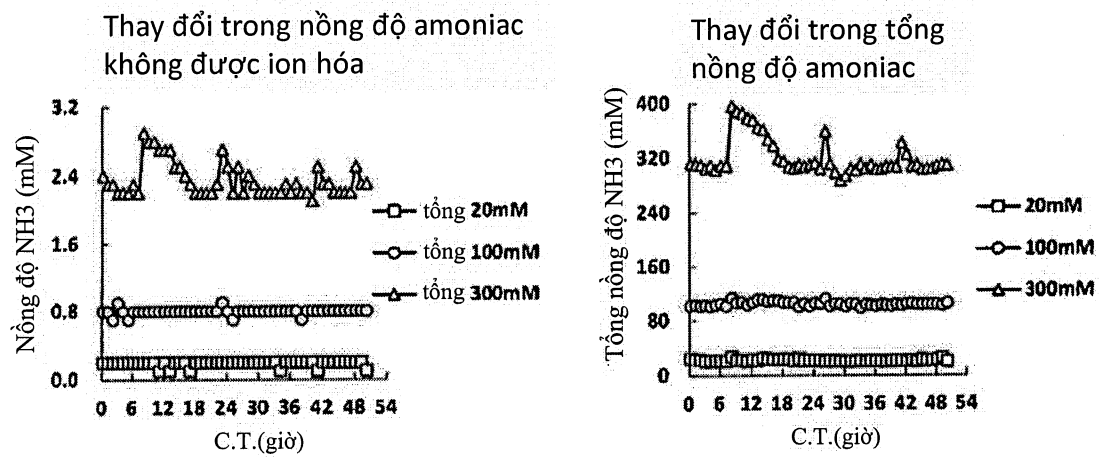


Fig. 7

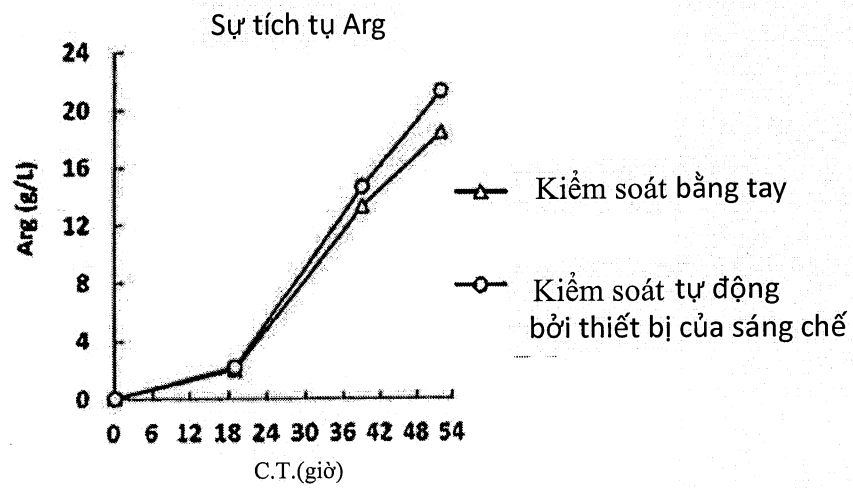
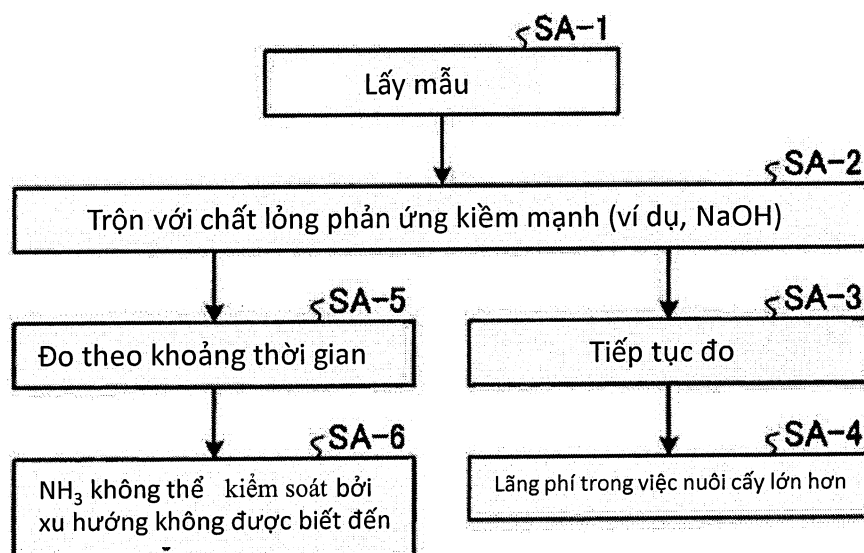


Fig. 8



(Kỹ thuật liên quan)

Fig. 9