



(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)



1-0043279

(51)^{2020.01} A23K 10/12; A23K 20/105; A23K (13) B
20/147; C12N 9/10; A23K 50/80; C12N
1/20; C12N 15/10; C12N 9/04; A23K
20/10; A23K 50/10

(21) 1-2020-02954

(22) 31/10/2018

(86) PCT/US2018/058381 31/10/2018

(87) WO 2019/089711 09/05/2019

(30) 62/579,507 31/10/2017 US

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/08/2020 389

(73) INVISTA TEXTILES (U.K.) LIMITED (GB)

One St. Peter's Square, Manchester M2 3DE, United Kingdom

(72) PEARLMAN, Paul, S. (US); ROJAS, Hugo, Federico, Cueto (GB); SMITH, Gary (GB); KIRBY, Gregory, S. (GB).

(74) Công ty Luật TNHH quốc tế BMVN (BMVN INTERNATIONAL LLC)

(54) THỨC ĂN HOẶC PHỤ GIA THỨC ĂN, PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN KHẢ NĂNG SỐNG SÓT CỦA VẬT NUÔI HOẶC ĐỘNG VẬT THỦY SINH, VÀ PHƯƠNG PHÁP LÀM GIẢM CÁC PHÉ PHÂM TỪ CÁC HOẠT ĐỘNG THƯƠNG MẠI

(21) 1-2020-02954

(57) Sáng chế đề xuất các chế phẩm dinh dưỡng có chứa sinh vật bị suy giảm hoặc không sản xuất poly (3-hydroxybutyrat). Các chế phẩm dinh dưỡng này hữu ích để làm thức ăn, chẳng hạn như thức ăn gia súc và các phụ gia thức ăn cho các động vật nhai lại, các động vật không nhai lại và cho nuôi trồng thủy sản v.v. Sáng chế cũng đề xuất các vật liệu và các phương pháp sản xuất các sinh vật này.

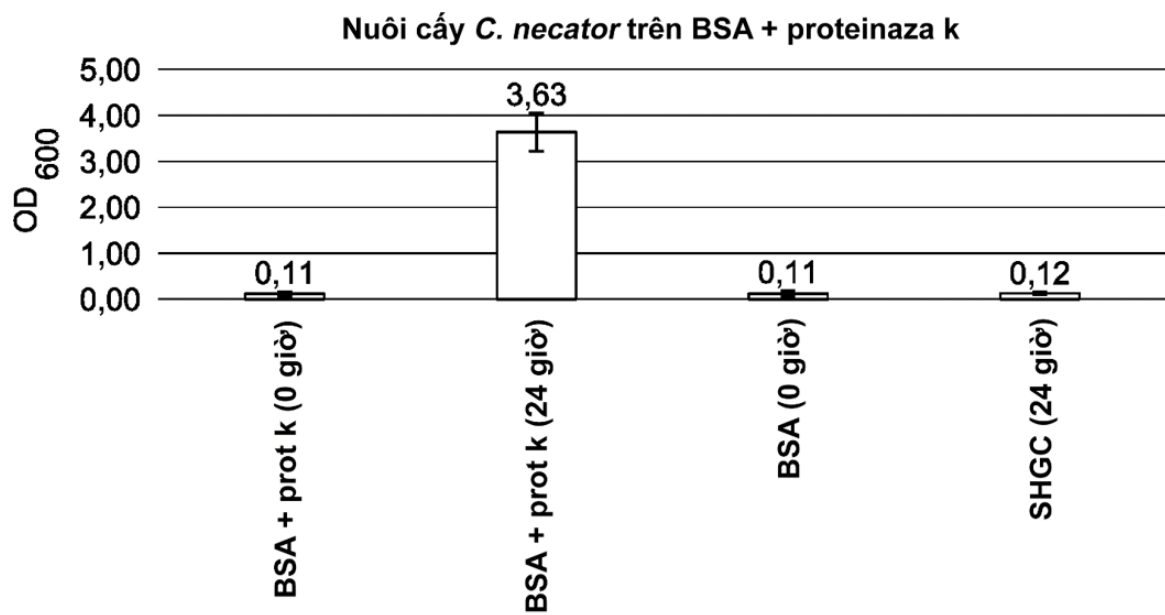


FIG. 2

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các chế phẩm dinh dưỡng có chứa sinh vật ban đầu có khả năng sản xuất poly (3-hydroxybutyrat) (PHB) đã được biến đổi để làm giảm hoặc loại bỏ khả năng sản xuất PHB, các chế phẩm này hữu dụng làm, ví dụ chất dinh dưỡng, thức ăn và/hoặc các phụ gia thức ăn. Các phương pháp sản xuất các sinh vật này để sử dụng trong các chế phẩm dinh dưỡng, thức ăn và các phụ gia thức ăn được đề xuất.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các poly(hydroxyalkonat) (PHA) được tích lũy trong một số lượng lớn prokaryot và dùng làm các hợp chất lưu trữ nội bào cho cacbon và năng lượng. Do tính dẻo nhiệt và khả năng phân hủy sinh học, các PHA có nhiều ứng dụng khác nhau trong công nghiệp và y học.

Ví dụ, protein đơn bào (single cell protein - SCP), cụ thể là vật liệu tế bào vi khuẩn và các sinh vật sản xuất PHA dự định được sử dụng làm thực phẩm hoặc vật liệu thô, đã được xem xét trong vài thập kỷ qua. Ví dụ, xem Kihlberg, R. Annual Review of Microbiology 1972 26:427-466 và Patent Mỹ số 6,207,217.

Protein đơn bào được tạo thành từ các vi sinh vật sản xuất PHA chẳng hạn như *Cupriavidus necator*, được biết đến trước đây là *Ralstonia eutropha*, đã được nghiên cứu trong một số năm như là thành phần trong thức ăn gia súc (Egers, J. và Steinbuchel, A. Applied Environmental Microbiology 2014 80 (24):7702-7709 và Raberg và cộng sự. PLOS ONE 2014 9(5):e95907).

Tuy nhiên, các sinh vật này không được khai thác làm thức ăn vì polyme PHA thường được thấy nhất là poly (3-hydroxybutyrat) (PHB) hiếm khi dễ tiêu hóa và mang lại rất ít hoặc không có giá trị dinh dưỡng. Thành phần PHB này cũng làm giảm hàm lượng protein của sinh vật này. Ngoài ra, hợp chất lưu trữ PHB không dinh dưỡng trong tế bào chất chiếm không gian vật lý, để lại ít không gian hơn cho các hợp chất dinh dưỡng. Hơn nữa, trong một số trường hợp, các thành phần PHB có tác động bất lợi đối với các chức năng sinh học, chẳng hạn như các quá trình của hệ thống tiêu hóa.

Theo nghiên cứu gần đây của Boon (Patent Mỹ số 8,603,518) và Nonato (Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2015149147), đã chứng minh rằng việc bổ sung thêm các enzym PHB depolymeraza vào hỗn hợp thức ăn có thể làm tăng khả năng tiêu hóa của PHB. Tuy nhiên, tổng hàm lượng protein cho các hỗn hợp thức ăn này vẫn bị giảm.

Kunasundari và cộng sự (PLOS ONE 2013 8(10): e78528) bộc lộ quá trình phục hồi sinh học của PHA tạo ra cơ sở cho thức ăn hợp lực kết hợp và quy trình tinh chế và phân tách các hạt PHA từ các tế bào đông khô của *C. Necator* H16.

Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2018/106549 bộc lộ các vi sinh vật và các phương pháp sản xuất PHB và protein để sử dụng trong thức ăn và các chế phẩm bổ sung dinh dưỡng.

Cần có các phương pháp thay thế để giải quyết vấn đề của các PHB trong các chế phẩm dinh dưỡng dựa trên sinh vật và các hỗn hợp thức ăn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Khía cạnh của sáng chế đề cập đến các chế phẩm dinh dưỡng bao gồm sinh vật ban đầu có khả năng sản xuất poly (3-hydroxybutyrat) (PHB) trong đó sinh vật này bị suy giảm và/hoặc không sản xuất PHB.

Theo một phương án không giới hạn, sinh vật của chế phẩm dinh dưỡng này không bao gồm axit nucleic ngoại sinh. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật của chế phẩm dinh dưỡng này có ít nhất một biến đổi của một hoặc nhiều enzym operon phaCAB không bao gồm sự biến đổi phasin. Theo một phương án không giới hạn, sự sản xuất PHB trong sinh vật này được làm suy giảm hoặc được loại bỏ bằng cách loại bỏ hoặc làm suy giảm hoạt động của một hoặc nhiều enzym operon phaCAB không bao gồm sự biến đổi phasin. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật của chế phẩm dinh dưỡng này là *Cupriavidus necator*. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật của chế phẩm dinh dưỡng này có khả năng sản xuất PHB bị suy giảm sản xuất PHB ở mức không thể phát hiện được.

Theo một phương án không giới hạn, protein đơn bào của chế phẩm dinh dưỡng này có nồng độ (các) axit amin, các oligopeptit, các polypeptit hoặc các dẫn xuất của chúng cao hơn so với protein đơn bào của chế phẩm dinh dưỡng không có sinh vật này. Theo một phương án không giới hạn, chế phẩm dinh dưỡng này có hàm lượng protein thô cao hơn so với chế phẩm dinh dưỡng không có sinh vật này. Theo một phương án không giới hạn, protein thô trong sinh vật này chiếm ít nhất từ 40% đến 70% theo khối lượng sinh vật.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến thức ăn và các phụ gia thức ăn bao gồm các chế phẩm dinh dưỡng này. Theo một phương án không giới hạn, chế phẩm dinh dưỡng này được kết hợp với hàm lượng ít nhất từ 10% đến 30% theo khối lượng của thức ăn hoặc phụ gia thức ăn.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất các sinh vật cho các chế phẩm dinh dưỡng này và thức ăn/các phụ gia thức ăn. Theo các phương pháp này, nguyên liệu thô lên men được cấy với sinh vật có khả năng sản xuất PHB được làm suy giảm và/hoặc không sản xuất PHB. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật của chế phẩm dinh dưỡng này không bao gồm axit nucleic ngoại sinh. Theo một phương

án không giới hạn, sinh vật của chế phẩm dinh dưỡng có ít nhất một biến đổi của một hoặc nhiều enzym operon phaCAB không bao gồm sự biến đổi phasin. Theo một phương án không giới hạn, quá trình sản xuất PHB trong sinh vật này được làm suy giảm hoặc được loại bỏ bằng cách loại bỏ hoặc làm suy giảm hoạt động của một hoặc nhiều enzym operon phaCAB không bao gồm sự biến đổi phasin. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật của chế phẩm dinh dưỡng này là *Cupriavidus necator*. Sau đó, sinh vật đã được cấy này được nuôi cấy trong các điều kiện dẫn đến sự phát triển của sinh vật này và/hoặc sự nhân giống, sau đó phân lập hoặc thu hoạch sinh vật này từ nguyên liệu thô lên men. Có thể sử dụng quá trình lên men khí hoặc lỏng. Theo một phương án không giới hạn, sử dụng các điều kiện lên men tạp dưỡng. Theo một phương án không giới hạn, phương pháp này còn bao gồm việc kết hợp sinh vật được phân lập này vào thức ăn hoặc phụ gia thức ăn.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng sống sót của vật nuôi hoặc động vật thủy sinh bằng cách cho động vật này ăn thức ăn hoặc phụ gia thức ăn theo sáng chế.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm phế phẩm hoặc các phế phẩm từ các hoạt động thương mại. Theo phương pháp này, sinh vật ban đầu có khả năng sản xuất poly (3-hydroxybutyrat) (PHB) trong đó sinh vật này đã được làm suy giảm và/hoặc không sản xuất PHB, được phát triển trong phế phẩm hoặc các phế phẩm này. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này không bao gồm axit nucleic ngoại sinh. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này có ít nhất một sự biến đổi của một hoặc nhiều enzym operon phaCAB không bao gồm sự biến đổi phasin. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này là *Cupriavidus necator*. Sau đó, sinh vật này được thu hoạch và được kết hợp vào trong thức ăn hoặc phụ gia thức ăn.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein đơn bào. Phương pháp này bao gồm lựa chọn sinh vật có khả năng sản xuất poly (3-hydroxybutyrat) (PHB) và loại bỏ hoặc làm suy giảm hoạt tính của một hoặc enzym operon PHAcab không bao gồm sự biến đổi phasin trong sinh vật này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

HÌNH 1 là sự minh họa về cấu hình alen tái tổ hợp để thực hiện xóa bỏ, thay thế hoặc chèn chuỗi ADN trong bộ gen của *C. necator*. Alen có thể được xem là có 3 phần; 'A', 'B' và 'C'. Miền là chuỗi ADN được biểu thị bởi 'A' và 'C' giống nhau giữa alen tái tổ hợp và alen bản địa (native allele), chuỗi được biểu thị bởi 'B' có thể bị xóa bỏ (để tạo ra gen 'loại bỏ') hoặc được thay thế (bằng chuỗi được biểu thị bằng '01'). Ngoài ra, chuỗi không phải bản địa (được biểu thị bằng '01',) có thể được chèn vào giữa 'A' và 'B'."

HÌNH 2 là biểu đồ thể hiện sự phát triển của chủng *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB Δ H16_A0006-9 tăng khi môi trường giàu protein BSA được xử lý trước bằng proteinaza K.

Các HÌNH 3A, 3B và 3C thể hiện sự tích lũy polyhydroxybutyrat (PHB) trong tế bào kiểu hoang dã *Cupriavidus necator* 16 (HÌNH 3A) và không có sự tích lũy polyhydroxybutyrat (PHB) trong các chủng *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB (HÌNH 3B) và *Cupriavidus necator* H16 PHB4 (HÌNH 3C).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm dinh dưỡng. Chế phẩm dinh dưỡng này thích hợp để sử dụng, ví dụ, trong thức ăn và các phụ gia thức ăn.

Các thuật ngữ "thức ăn" hoặc "chế phẩm thức ăn" hoặc "phụ gia thức ăn", khi được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, đề cập đến bất kỳ hợp chất, chế phẩm, hỗn hợp hoặc chế phẩm thích hợp dùng để, hoặc được dự định dùng để cho động vật ăn.

Thuật ngữ "dinh dưỡng" hoặc "chế phẩm dinh dưỡng", khi được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, biểu thị tính hữu dụng làm chế phẩm dinh dưỡng, chẳng hạn như trong thức ăn, các chế phẩm thức ăn hoặc các phụ gia thức ăn. Các chế phẩm dinh dưỡng này có thể được sử dụng làm thức ăn gia súc hoàn chỉnh (thức ăn) hoặc làm chất bổ sung cho thức ăn gia súc.

Thuật ngữ "động vật" bao gồm tất cả các động vật gồm cả con người. Các ví dụ về động vật là các động vật không nhai lại và các động vật nhai lại. Các động vật nhai lại bao gồm, ví dụ, các động vật chẳng hạn như cừu, dê và gia súc, ví dụ: bò chẳng hạn như bò thịt và bò sữa. Động vật này cũng có thể là động vật không nhai lại. Động vật không nhai lại bao gồm các thú cưng, ví dụ: ngựa, mèo và chó; các động vật có một dạ dày, ví dụ lợn hoặc heo (bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở lợn con, lợn đang phát triển và lợn nái); gia cầm chẳng hạn như gà tây, vịt và gà (bao gồm nhưng không bị giới hạn ở gà thịt, gà đẻ trứng); cá (bao gồm nhưng không bị giới hạn ở cá hồi, cá hương, cá rô phi, cá da trơn và cá chép); và các loài giáp xác (bao gồm nhưng không bị giới hạn ở tôm các loại).

Thuật ngữ "nuôi trồng thủy sản", khi được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, đề cập đến việc nuôi các động vật thủy sinh làm thức ăn.

Các chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế bao gồm sinh vật hoặc SCP có nguồn gốc từ sinh vật ban đầu có khả năng sản xuất poly (3-hydroxybutyrat) (PHB) đã được làm suy giảm và/hoặc không sản xuất PHB. Có thể thu được sinh vật có khả năng sản xuất PHB đã được làm suy giảm và/hoặc không sản xuất PHB thông qua kỹ thuật di truyền, bằng đột biến thích nghi hoặc bằng cách phân lập chọn lọc các chủng đột biến xuất hiện tự nhiên không sản xuất PHB. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này không bao gồm axit nucleic ngoại sinh. Các phương pháp thích hợp để sử dụng theo sáng chế được

mô tả trong, ví dụ, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, ấn bản lần 3, Tập 1, 2 và 3, J.F. Sambrook và D.W. Russell, ấn bản, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Các ví dụ không giới hạn về sinh vật ban đầu có khả năng sản xuất PHB để sử dụng trong các chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế bao gồm các prokaryot từ các chi của Proteobacteria chẳng hạn như *Cupriavidus*, *Ralstonia* và *Rhodobacter*. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này được lựa chọn từ *Cupriavidus necator* hoặc *Rhodobacter sphaeroides*. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này là *Cupriavidus necator*.

Theo một phương án không giới hạn, sản xuất PHB trong sinh vật được làm suy giảm hoặc được loại bỏ bằng cách biến đổi một hoặc nhiều enzym operon phaCAB cho phép chủng này sản xuất PHB. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này là chủng Δ phaCAB H16 *C. necator*. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này là chủng PHB. Theo một phương án không giới hạn, chủng PHB này được tạo ra bởi đột biến điểm G320A trong phaC. Bởi các enzym operon phaCAB, có nghĩa là bao gồm các enzym phaA, phaB và phaC. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này có ít nhất một biến đổi của một hoặc nhiều enzym operon phaCAB không bao gồm sự biến đổi phasin. Thuật ngữ "biến đổi", "đang biến đổi" hoặc "sự biến đổi", khi được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, có nghĩa là bao gồm xóa bỏ gen, thay thế gen hoặc chèn gen vào một hoặc nhiều gen mã hóa phaA, phaB hoặc phaC. Có thể sử dụng các phương pháp khác nhau để biến đổi.

Theo một phương án không giới hạn, sự biến đổi được thực hiện bằng cách trao đổi alen. Theo phương án này, việc chỉnh sửa bộ gen được thực hiện trong sinh vật chẳng hạn như *C. necator* bằng cách trao đổi alen (còn được gọi là trao đổi alen). Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này là chủng Δ phaCAB H16 *C. necator* được tạo ra bằng cách trao đổi alen.

Theo một phương án không giới hạn, sự biến đổi được thực hiện bằng cách đột biến hóa học. Theo một phương án không giới hạn, chủng PHB- *C. necator* được tạo ra thông qua đột biến hóa học. Theo một phương án không giới hạn, đột biến hóa học được sử dụng để sản xuất chủng PHB với đột biến điểm G320A trong phaC.

Thuật ngữ 'alen' thường được sử dụng thay thế cho thuật ngữ 'gen' nói chung hơn, đề cập đến locus gen được xác định. Trong trao đổi alen, mạch chạy cụ thể của chuỗi ADN trong bộ gen của sinh vật (tức là alen bản địa) được trao đổi theo nghĩa đen cho mạch chạy của chuỗi ADN tái tổ hợp/đột biến/tổng hợp (ví dụ, alen tái tổ hợp). Tùy thuộc vào bản chất của alen tái tổ hợp, điều này có thể dẫn đến việc xóa bỏ gen, thay thế gen hoặc chèn gen (xem HÌNH 1).

Theo một phương án không giới hạn, các alen tái tổ hợp/tổng hợp có thể được xây dựng thông qua tổng hợp gen và/hoặc các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Sau đó chúng được nhân bản thành véc-tơ plasmit để chuyển vào trong sinh vật và thực hiện quá trình trao đổi alen. Theo một phương án không giới hạn, véc-tơ plasmit này bao gồm chuỗi ADN gồm có

gen chọn lọc dương tính tạo ra lợi thế chọn lọc cho sinh vật này, chẳng hạn như kháng thuốc kháng sinh và gen chọn lọc âm tính hoặc gen chọn lọc đối loại bỏ hoặc ức chế sự phát triển của sinh vật chủ khi chọn lọc chẳng hạn như thymidin kinaza. Các gen chọn lọc này tạo điều kiện thuận lợi cho việc thực hiện quá trình trao đổi alen này. Vào cuối quá trình này, không có phần nào của véc-tơ plasmit còn lại bên trong tế bào chủ này. Theo đó, trong khi alen biến đổi được di truyền sang các tế bào con cháu, không có phần nào của véc-tơ plasmit được di truyền.

Theo một phương án không giới hạn, SCP của chế phẩm dinh dưỡng này có nồng độ (các) axit amin, các oligopeptit, các polypeptit hoặc các dẫn xuất của chúng cao hơn so với protein đơn bào của chế phẩm dinh dưỡng không có sinh vật này. Theo đó, việc sử dụng sinh vật theo sáng chế có thể tạo ra các chế phẩm dinh dưỡng có nồng độ (các) axit amin, các oligopeptit, các polypeptit hoặc các dẫn xuất của chúng cao hơn so với chế phẩm có sinh vật không được biến đổi. Hơn nữa, các chế phẩm dinh dưỡng có nồng độ tương tự như chế phẩm có sinh vật không được biến đổi có thể được điều chế bằng cách sử dụng ít SCP hoặc sinh vật được biến đổi theo sáng chế.

Theo một phương án không giới hạn, sinh vật được sử dụng trong chế phẩm dinh dưỡng này có tổng mức axit amin lớn hơn 40%. Theo một phương án không giới hạn khác, tổng mức axit amin này lớn hơn 50%. Theo một phương án không giới hạn khác, tổng mức axit amin này lớn hơn 60%. Theo một phương án không giới hạn khác, tổng mức axit amin này lớn hơn 70%. Theo một phương án không giới hạn khác, tổng mức axit amin này lớn hơn 75%. Vẫn theo một phương án không giới hạn khác nữa, tổng mức axit amin này lớn hơn 80%.

Theo một phương án không giới hạn, sinh vật theo sáng chế tạo ra các chế phẩm dinh dưỡng có hàm lượng của tổng các axit amin cao hơn so với các sinh vật tương tự chưa được biến đổi. Theo một phương án không giới hạn khác, có thể sử dụng ít sinh vật theo sáng chế hơn để tạo ra các chế phẩm dinh dưỡng có hàm lượng của tổng các axit amin tương tự so với các chế phẩm có chứa các sinh vật tương tự chưa được biến đổi.

Theo một phương án không giới hạn, protein đơn bào có tổng các mức axit amin theo sáng chế tăng bất ngờ ít nhất 10%, 20% hoặc thậm chí 30% so với dự kiến chỉ giảm theo tỷ lệ một mình mức PHB.

Các sinh vật được biến đổi theo sáng chế thể hiện lượng protein cao hơn so với các sinh vật không được biến đổi. Theo đó, các sinh vật theo sáng chế có thể cung cấp cho các chế phẩm dinh dưỡng này lượng protein cao hơn so với chế phẩm có sinh vật không biến đổi. Theo một phương án không giới hạn, mức protein thô được tăng ít nhất 10%, 20% hoặc thậm chí 30% nhiều hơn so với dự kiến mà chỉ giảm theo tỷ lệ các mức PHB. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật được sử dụng trong chế phẩm dinh dưỡng này có mức protein thô lớn hơn 40% protein như được ước tính bởi tổng lượng nitơ. Theo một phương án không giới hạn khác, mức protein thô này lớn hơn 50% protein như được ước tính bởi tổng lượng nitơ. Theo

một phương án không giới hạn khác, mức protein thô này lớn hơn 60% protein như được ước tính bởi tổng lượng nitơ. Theo một phương án không giới hạn khác, mức protein thô lớn hơn 70% protein như được ước tính bởi tổng lượng nitơ. Theo phương án khác, mức protein thô này lớn hơn 75% protein như được ước tính bởi tổng lượng nitơ. Theo một phương án không giới hạn khác nữa, mức protein thô này lớn hơn 80% protein như được ước tính bởi tổng lượng nitơ. Theo một phương án không giới hạn, sinh vật theo sáng chế cung cấp cho chế phẩm dinh dưỡng có hàm lượng protein cao hơn so với các sinh vật tương tự chưa được biến đổi. Theo một phương án không giới hạn, ít sinh vật theo sáng chế hơn có thể được sử dụng để cung cấp cho chế phẩm dinh dưỡng có các mức protein tương tự so với các chế phẩm có chứa các sinh vật tương tự chưa được biến đổi. Có một số phương pháp đo tổng lượng nitơ trong sinh vật. Ví dụ không giới hạn là phương pháp Kjeldahl (xem <https://people.umass.edu/~mcclemen/581Proteins.html>) trong đó% nitơ được nhân bởi hệ số N để tính toán hàm lượng protein thô. Mặc dù có thể sử dụng các hệ số N khác nhau, theo sáng chế, hệ số N bằng 6,25 là hệ số nhân.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp để sản xuất SCP để sử dụng trong các chế phẩm dinh dưỡng này. Theo một phương án không giới hạn, phương pháp này bao gồm việc lựa chọn sinh vật ban đầu có khả năng sản xuất poly (3-hydroxybutyrat) (PHB) và loại bỏ hoặc làm suy giảm hoạt tính của một hoặc nhiều enzym operon phaCAB không bao gồm sự biến đổi phasin trong sinh vật này. Không bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết nào, người ta tin rằng việc duy trì phương án phasin có thể hoạt động được mang lại các lợi thế sinh học cho sinh vật này.

Có thể sử dụng các phương pháp khác nhau để tạo ra các sinh vật cho chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế.

Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này được tạo ra thông qua quá trình lên men trong các điều kiện trong đó sinh vật này phát triển và/hoặc nhân lên. Ví dụ, đối với một sinh vật hiếu khí như *Cupriavidus*, sinh vật này có thể được nuôi cấy ở nhiệt độ phòng trong các điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,4 đến 6,8 bằng cách trộn bằng các phương pháp khuấy/cơ học hoặc bằng thiết bị phản ứng vòng hoặc không khí. Do người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu khi đọc bản mô tả sáng chế này, tuy nhiên, các điều kiện lên men ví dụ này không làm giới hạn sáng chế và các điều kiện lên men thay thế thường được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng cho các sinh vật khác nhau.

Theo một phương án không giới hạn, việc lên men được tiến hành ở chế độ mẻ.

Theo một phương án không giới hạn, việc lên men được tiến hành ở chế độ mẻ bổ sung dinh dưỡng (fed batch).

Theo một phương án không giới hạn khác, việc lên men được tiến hành ở chế độ liên tục.

Theo một phương án không giới hạn, sinh vật được sản xuất thông qua quá trình lên men lỏng. Theo một phương án không giới hạn, quá trình lên men lỏng này sử dụng một hoặc nhiều thành phần thức ăn có thể lên men được hoặc có thể chuyển hóa được bởi sinh vật này. Các ví dụ không giới hạn về các thành phần thức ăn bao gồm các đường, glyxerol, fructoza, các axit béo, các axit cacboxylic, các monosacarit, các đisacarit, lignoxenluloza, hemixenluloza, xenlulo, lignin, axit levulinic và axit formic, các axit amin, các protein, các triglyxerit, chất thải nông nghiệp, các chất hòa tan của các thiết bị chưng cất ngưng tụ hoặc chất thải đô thị, các rượu và/hoặc các thành phần hòa tan khác làm nguyên liệu. Theo một phương án không giới hạn, nguyên liệu cho quá trình lên men lỏng này có nguồn gốc từ các phụ phẩm hoặc các phế phẩm có giá trị thấp hơn từ các hoạt động thương mại. Theo một phương án không giới hạn, nguyên liệu cho quá trình lên men lỏng có nguồn gốc từ dòng bã cặn etanol. Theo một phương án không giới hạn, nguyên liệu cho quá trình lên men lỏng có nguồn gốc từ dầu ăn.

Theo một phương án không giới hạn khác, sinh vật được tạo ra trong quá trình lên men khí sử dụng nguyên liệu khí bao gồm một hoặc nhiều thành phần thức ăn có thể lên men được hoặc có thể chuyển hóa được bởi sinh vật này. Các ví dụ về các thành phần thức ăn bao gồm, nhưng không giới hạn ở cacbon monoxit, cacbon đioxit, hydro, metan, khí tổng hợp, etan hoặc dòng thải, hoặc dẫn xuất của chúng, của ngành công nghiệp hóa chất hoặc hóa dầu. Theo một khía cạnh của phương án của sáng chế, sinh vật này được tạo ra bằng cách lên men khí, trong đó quá trình lên men khí này bao gồm CO_2/H_2 .

Theo một phương án khác nữa, sinh vật được tạo ra thông qua quá trình lên men tạp dưỡng trong đó các nguyên liệu khí và nguyên liệu không chứa khí được lên men đồng thời.

Sau đó, các chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế được sản xuất từ các sinh vật này có thể được bổ sung thêm vào thức ăn gia súc hoặc được sử dụng làm thức ăn.

Theo một phương án không giới hạn, màng tế bào của sinh vật này được phá vỡ thông qua quá trình ly giải để cải thiện sự sẵn có của protein đối với động vật này. Có thể sử dụng ly giải hóa học hoặc ly giải cơ học.

Theo một phương án không giới hạn, sinh vật này không hoạt động, không sao chép hoặc không sống. Theo một phương án không giới hạn, có thể đạt được điều này thông qua phương pháp thanh trùng ở ví dụ 60°C trong 30 phút. Do người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu khi đọc sáng chế này, tuy nhiên có thể sử dụng các phương pháp thay thế.

Theo một phương án không giới hạn, chế phẩm dinh dưỡng này được kết hợp vào trong thức ăn gia súc này với hàm lượng lớn hơn 10% theo khối lượng thức ăn gia súc này. Theo một phương án không giới hạn, chế phẩm dinh dưỡng được kết hợp vào trong thức ăn gia súc này với hàm lượng lớn hơn 20% theo khối lượng thức ăn gia súc này. Theo một

phương án không giới hạn khác nữa, chế phẩm dinh dưỡng này được kết hợp vào trong thức ăn gia súc với hàm lượng lớn hơn 30% theo khối lượng thức ăn gia súc này.

Có thể sử dụng thức ăn gia súc này để cho các động vật nhai lại và các động vật không nhai lại ăn. Các động vật nhai lại bao gồm, ví dụ, các động vật chắt hạn như cừu, các loài dê và gia súc, ví dụ: các loài bò chắt hạn như bò thịt và bò sữa. Động vật này cũng có thể là động vật không nhai lại. Các động vật không nhai lại bao gồm các thú cưng, ví dụ: ngựa, mèo và chó; các động vật có một dạ dày, ví dụ lợn hoặc heo (bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở lợn con, lợn đang phát triển và lợn nái); và gia cầm chắt hạn như gà tây, vịt và gà (bao gồm nhưng không bị giới hạn ở gà thịt, gà đẻ trứng).

Cũng có thể sử dụng thức ăn gia súc này trong nuôi trồng thủy sản cho cá (bao gồm nhưng không bị giới hạn ở cá hồi, cá hương, cá rô phi, cá da trơn và cá chép); và các loài giáp xác (bao gồm nhưng không bị giới hạn ở tôm các loại).

Phần sau đây minh họa thêm về các phương pháp và các chế phẩm của phương án sáng chế. Các ví dụ hoạt động này chỉ nhằm minh họa và không nhằm làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Nuôi cấy ba chủng dưới các điều kiện thử nghiệm đồng nhất để so sánh các mức PHB của chúng. Ba chủng này là *Cupriavidus necator* H16 kiểu hoang dã, *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB ΔA0006-9 (như được mô tả trong đơn đăng ký sáng chế đã công bố US20180100160) và *Cupriavidus necator* H16 PHB4- (xem Schlegel và cộng sự. Arch Mikrobiol 1970 71: 283-294). Nuôi cấy ba chủng này ở 30°C, 220 vòng/phút và độ pH ban đầu 6,6 trong môi trường 1 (xem Bảng 1) trong 24 giờ. Đo mật độ quang ở 600 nm (OD₆₀₀) và điều chế thể tích chất nuôi cấy thích hợp để cho phép OD₆₀₀ bắt đầu là 0,2 trong thí nghiệm Ambr15F tiếp theo (nói tóm lại, thiết kế sự nuôi dưỡng theo mẻ bổ sung dinh dưỡng hạn chế nitơ để tích lũy đủ sinh khối để phân tích axit amin sản phẩm ra).

Tám bình cho mỗi chủng, được thực hiện trên hệ thống lên men vi mô (microfermentation) Sartorius Ambr15f. Tổng thể tích ban đầu là 7,7 ml (môi trường 2 (xem Bảng 1) và bao gồm thể tích chất nuôi cấy được mô tả trên đây) được ủ ở 30 °C, 1500 vòng/phút và nồng độ oxy hòa tan (Dissolved Oxygen - DO) mục tiêu duy trì là 10% (đạt và duy trì thông qua khuấy trộn cố định ở tốc độ 1500 vòng/phút và sục khí từ 0,1 ml/phút đến tiềm năng 60 ml/phút theo yêu cầu). Duy trì độ pH ở 6,6 thông qua việc bổ sung KOH với hàm lượng 10% theo khối lượng thể tích và H₂SO₄ với hàm lượng 10% theo thể tích.

Cho phép các môi trường nuôi cấy tích lũy theo chế độ hoạt động theo mẻ cho đến khi đạt được sự hạn chế nitơ ban đầu (có thể quan sát được là DO tăng mạnh và sau đó được xác nhận thông qua thử nghiệm amoni), tại đó bật chế độ cấp vào với tốc độ 1,5 µ/phút trong khoảng thời gian 48 giờ, cấp vào tổng thể tích là 4,32 ml môi trường 3 (xem Bảng 1).

Sau khi hoàn tất việc phát triển, gộp tất cả 8 bình cho mỗi chủng thành một thể tích duy nhất, thanh trùng (65 °C, 30 phút), ly tâm (4000 vòng/phút, 30 phút) và giữ lại các viên tế bào. Đông khô các viên tế bào này trong 48 giờ (-60 °C và 120 mTor) và gửi đi phân tích.

BẢNG 1

Thành phần	Môi trường 1 g/L	Môi trường 2 g/L	Môi trường 3 g/L
Fructoza	12	19,15	141,89
Axit nitrilotriaxetic	0,15	0,15	0,15
KH ₂ PO ₄	1,4	0,51	2,97
Na ₂ HPO ₄	0,94	0,34	1,98
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,365	3,37	19,63
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,5	0,5	0,5
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,01	0,01	0,01
NH ₄ (Fe-II)SO ₄	0,05	0,05	0,05
Dung dịch kim loại truy vết (xem Bảng 12A)	10	10	10
Chất phá bọt 204	-	0,5	0,5

Thực hiện phân tích các mức PHB bằng cách sử dụng LC-MS. Cũng thu được các kết quả tương tự bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn khác, chẳng hạn như sắc ký khí GC-FID - máy dò ion hóa ngọn lửa). Các thông số LC-MS được thể hiện trong Bảng 2.

BẢNG 2

Thiết bị	Hệ thống Agilent 6890 Series LC-MS (ING 326)
Ngày tạo	Tháng 12 năm 2017
	Ngày điều chỉnh

Các chất phân tích chính có liên quan		3-HBA (axit 3-hydroxybutyric) và 3-HVA (axit 3-hydroxyvaleric) ở dạng đơn trùng.				
Thông số tiêm						
Loại tiêm		Vòng đóng (5 µL)				
Thể tích tiêm		7 µL				
Dung môi rửa 1		Dung môi A				
Dung môi rửa 2		Dung môi B				
Thông số LC						
Loại cột		Kinetex® 2,6 pm HILIC 100 Å				
Các kích thước cột		100 x 2,1 mm				
Đường dung môi A		50:50 ACN/nước với 10 mM amoni focmat				
Đường dung môi B		90:10 ACN/nước với 10 mM amoni focmat				
Tốc độ lưu lượng		0,3 mL phút-1				
Áp lực ngược dự kiến (t = 0)		120 bar				
Nhiệt độ cột		35 °C				
Thành phần dung môi						
Thời gian		Dung môi A		Dung môi B		
phút		%		%		
0		10		90		
Chạy chế độ isocratic ở 90 % B, thời gian chạy 6 phút						
Dò tìm						
Chiều dài sóng UV		210 nm				
Lưu lượng khí khô MS		5 L phút-1				
Máy phun sương MS		45 psig				
Nhiệt độ khí khô MS		250 °C				
Nhiệt độ bộ bay hơi MS		200 °C				
Thời gian ngừng MS		15				
Tín hiệu MS	Thời gian (phút)	Bật /Tắt	Năng lượng phân mảnh	SIM	Tính có cực	Thời gian ngừng (msec)

1	1,0	ON	100	103,1	âm tính	140
2	1,0	ON	100	118,1	âm tính	140
3	1,0	ON	100	85,1	âm tính	140
4	1,0	ON	100	Quét toàn bộ	âm tính	140
Chất phân tích		RT (phút)		Kênh	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Hợp chất monome 3-HBA		2,8		1	0,1	

Phân tích cho thấy rằng các chủng *Cupriavidus necator* H16 $\Delta\text{phaCAB } \Delta\text{A0006-9}$ và *Cupriavidus necator* H16 PHB4- tích lũy thiếu polyhydroxybutyrat (PHB). Chuẩn bị các tấm kính mang vật bằng cách nấu chảy 1% agarose trong nước, thêm 100 μl agarose nóng vào tấm kính mang vật này, đặt lớp phủ lên trên agarose này để trải thành một lớp mỏng và để agarose đông đặc lại. Nhuộm PHB tế bào bằng cách sử dụng Nile Red sử dụng quy trình được điều chỉnh từ quy trình sinh học với phần mở rộng .org/e2748 của mạng lưới toàn cầu. Lắc xoáy 1 ml môi trường cấy qua đêm với tốc độ 12400 vòng/phút trong 2 phút và tái tạo huyền phù trong ~50 μl chất nổi bề mặt hoặc nước. Bổ sung thêm 4 μl dịch huyền phù tế bào vào 1 μl Nile Red (10 $\mu\text{g/ml}$). Loại bỏ lớp phủ trên miếng agarose trên tấm kính mang vật này và bổ sung thêm 1,5 μl dịch huyền phù tế bào đã được nhuộm vào miếng agarose này. Đặt lớp phủ mới lên các tế bào này và quan sát các tế bào này dưới kính hiển vi 100X với bộ lọc DsRed.

Các kết quả được minh họa ở Bảng 3 cũng như các HÌNH 3A, 3B và 3C.

BẢNG 3

Số mẫu	<i>Cupriavidus necator</i> H16 kiểu hoang dã	<i>Cupriavidus necator</i> H16 ΔphaCAB $\Delta\text{A0006-9}$	<i>Cupriavidus necator</i> H16 PHB4-.
	theo khối lượng*	theo khối lượng*	theo khối lượng*
1	46,4	0	0
2	47,3	0	0

% theo khối lượng PHB: % theo khối lượng khối lượng tế bào khô

Các số lượng axit amin được phân tích bởi Analysis Service Laboratory Inc. Boring, Oregon, Hoa Kỳ và được mô tả trong Bảng 4.

BẢNG 4

AXIT AMIN	Kiểu hoang dã		PHB-		Delta CAB	
	Phần trăm		Phần trăm		Phần trăm	
	axit amin		axit amin		axit amin	
	tương đối		tương đối		tương đối	
	trong tổng số		trong tổng số		trong tổng số	
	mg aa	axit amin	mg aa	axit amin	mg aa	axit amin
	mỗi gam		mỗi gam		mỗi gam	
	sản phẩm		sản phẩm		sản phẩm	
CYS02 (C)	3,2	1,1%	5,8	1,1%	5,9	1,1%
HYP (Z)	0,0	0,0%	0,0	0,0%	0,0	0,0%
ASP (D)	27,8	9,8%	52,8	9,8%	51,3	9,8%
THR (T)	15,3	5,4%	28,3	5,2%	27,5	5,3%
SER (S)	11,8	4,1%	22,5	4,2%	21,9	4,2%
GLU (E)	33,7	11,8%	62,5	11,6%	60,1	11,5%
PRO (P)	10,4	3,7%	21,4	4,0%	20,7	3,9%
GLY (G)	15,9	5,6%	31,0	5,7%	30,1	5,8%
ALA (A)	29,8	10,5%	55,4	10,3%	54,5	10,4%
VAL (V)	19,8	6,9%	36,7	6,8%	35,7	6,8%
MET (M)	7,7	2,7%	18,3	3,4%	17,8	3,4%
ILE (I)	11,7	4,1%	22,8	4,2%	22,1	4,2%
LEU (L)	26,1	9,21	50,1	9,3%	48,6	9,3%
NLE	0,0	0,0%	0,0	0,0%	0,0	0,0%
TYR (Y)	11,6	4,1%	21,3	4,0%	20,7	3,9%
PHE (F)	15,0	5,3%	26,6	4,9%	26,0	5,0%
HIS (H)	5,9	2,1%	11,6	2,2%	11,3	2,2%
Tryptophan	0,0	0,0%	0,0	0,0%	0,0	0,0%
LYS (K)	16,97	6,0%	31,38	5,8%	30,08	5,7%
ARG (R)	21,8	7,7%	41,2	7,6%	39,8	7,6%
	284,4		539,7		524,0	

Tổng phần trăm axit amin (% theo khối lượng)	28,40%	54,00%	52,40%
---	--------	--------	--------

Ví dụ 2: *Cupriavidus necator* H16 kiểu hoang dã

Nuôi cấy chủng *Cupriavidus necator* H16 kiểu hoang dã trong tổng số 6 thiết bị phản ứng có bể khuấy liên tục (continuously stirrer tank reactor - CSTR) 1L ở chế độ hoạt động liên tục. Nuôi cấy *Cupriavidus necator* H16 kiểu hoang dã này ở 30 °C, 220 vòng/phút và độ pH ban đầu là 6,6, trong môi trường 1 (xem Bảng 5) trong 24 giờ. Đo mật độ quang ở 600 nm (OD₆₀₀) và chuẩn bị thể tích chất nuôi cấy thích hợp để cho phép (OD₆₀₀) bắt đầu là 0,2 trong các thí nghiệm 1 L tiếp theo (nói tóm lại, thiết kế các nuôi cấy liên tục hạn chế nitơ để tích lũy đủ sinh khối để phân tích phần sản phẩm ra).

Thực hiện sáu bình, mỗi bình có tổng thể tích 0,8 L (môi trường 2 (xem Bảng 5) và bao gồm thể tích chất nuôi cấy được mô tả trên đây) và ủ ở 30 °C, 500 vòng/phút và nồng độ oxy hòa tan (DO) mục tiêu duy trì là 30% (đạt được và duy trì thông qua khuấy theo tầng ở tốc độ 1500 vòng/phút và sục khí cố định 0,15 vvm (thể tích khí/thể tích chất lỏng/phút)). Duy trì độ pH này ở 6,6 thông qua việc bổ sung 10 % theo khối lượng thể tích KOH và 10 % theo thể tích H₂SO₄. Các mẻ cấy được phát triển theo mẻ cho đến khi đạt đến sự hạn chế fructoza (có thể quan sát thấy là DO tăng mạnh) tại điểm hai nguồn cấp vào, mỗi nguồn có tốc độ 20 g/giờ được bật (môi trường 3 và 4 – xem Bảng 5). Ống thải cũng được bật, tốc độ bơm được liên kết với một bộ cân để duy trì khối lượng tịnh là 0,8 Kg (lưu ý rằng bộ cân này đã được hiệu chuẩn để chỉ xem được khối lượng của môi trường ban đầu). Cùng tại ống dẫn 40 g/giờ, đạt được tốc độ pha loãng 0,05 h⁻¹. Chất thải nuôi cấy, có nguồn gốc từ đường ống thải, được thu thập hàng ngày (khoảng 960 g/ngày/bình) và được kết hợp.

BẢNG 5

Thành phần	Môi trường 1 g/L	Môi trường 2 g/L	Môi trường 3 g/L	Môi trường 4 g/L
Fructoza	12	13,83	-	160
Axit nitrilotriaxetic	0,15	0,15	0,3	-
KH ₂ PO ₄	1,4	0,55	4,24	-
Na ₂ HPO ₄	0,94	0,37	2,82	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,365	3,37	28	-
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,5	0,5	1	-

CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,01	0,01	0,02	-
NH ₄ (Fe-II)SO ₄	0,05	0,05	0,1	-
Dung dịch kim loại truy vết (xem Bảng 12A)	10	10	20	-
Chất phá bọt 204	-	0,5	1	-

Thanh trùng các tế bào này (65 °C, 30 phút), ly tâm (4000 vòng/phút, 30 phút) và giữ lại các viên tế bào này. Đông khô các viên tế bào này trong thời gian từ 48 giờ đến 96 giờ (-60 °C và 120 mTor) và trộn các viên tế bào này với các viên tế bào từ các ngày trước cho đến khi thu được sinh khối tế bào khô có khối lượng tịnh > 1,5 Kg. Sau khi trộn, gửi phần nhỏ sinh khối thu được này đi phân tích. Thu thập và phân tích các mẫu thử để phân tích protein và thông tin axit amin để cung cấp % theo khối lượng tương đối các axit amin, AA (% theo khối lượng axit amin/% theo khối lượng của tổng số axit amin) trên cơ sở khối lượng khô. Phân tích các mẫu thử tại Experiment Station Chemical Laboratories tại Đại học Missouri, Columbus, Missouri theo Mã 0002 cho Thông tin axit amin và Mã 0054 cho Protein thô/Tổng số Nitơ (Kjeldahl).

So sánh các nồng độ axit amin này được so sánh với các mức axit amin của các chủng *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB được phát triển và được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp lên men liên tục với fructoza. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6. Các kết quả cho thấy hàm lượng của tổng các axit amin trong chủng *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB cao hơn so với *Cupriavidus necator* H16 kiểu hoang dã .

BẢNG 6

Đơn vị	
% theo khối lượng AA/% theo khối lượng của tổng AA	% theo khối lượng AA/% theo khối lượng của tổng AA
Chủng	
<i>Cupriavidus necator</i> H16 ΔphaCAB	<i>Cupriavidus necator</i> H16 kiểu hoang dã
Vật liệu	
Fructoza	Fructoza
Quy trình	
Liên tục	Liên tục
Alanin	9,60
	9,48

Arginin	7,70	7,65
Axit Aspartic	9,64	9,29
Xystein	0,90	0,73
Axit Glutamic	11,95	11,35
Glyxin	6,28	5,82
Histidin	2,18	2,60
Hydroxylysin	0,03	0,38
Hydroxyprolin	0,04	0,00
Isoleuxin	4,65	4,71
Lanthionin	0,00	0,00
Leuxin	8,70	8,88
Lysin	6,32	6,77
Methionin	2,60	2,53
Ornithin	0,05	0,17
Phenylalanin	4,58	5,04
Prolin	4,20	4,62
Serin	3,40	3,15
Taurin	0,05	0,17
Threonin	4,79	4,78
Tryptophan	1,63	0,83
Tyrosin	3,47	3,86
Valin	7,23	7,20
Tổng axit amin (% theo khối lượng)	73,54	57,78
Protein thô*	88,58	67,68
Mức PHB	0%	7%

% theo khối lượng = gam mỗi 100 gam mẫu thử.

Các kết quả được thể hiện trên cơ sở khối lượng khô.

*Protein thô Kjeldahl = (%N) x 6,25

Ví dụ 3: Tạo ra H16 ΔphaCAB *Cupriavidus necator*

Tạo ra chủng ΔphaCAB H16 *C. Necator* bằng trao đổi alen. Một học (cassette) trao đổi alen với các nhánh đồng đẳng 500 bp -1000 bp được tạo cấu trúc bằng phương pháp tổng hợp PCR hoặc ADN và được nhân bản thành p(TcColE1oriTsacB), giữa các học oriT và sacB, bởi Gibson, phân loại giới hạn CPEC hoặc PvuI. Xác nhận sự hợp nhất của lớp đệm bởi phương pháp giải trình tự Sanger bằng cách sử dụng các đoạn môi BDIPRIM0591 (atcgaagagaagcaggacga (SEQ ID số: 1)) và BDIPRIM0589 (aacggcaggtatatgtgatgg (SEG ID số: 2)). Chuyển plasmit vào *E. Coli* bằng phương pháp điện hóa và sau đó vào *C. Necator* bằng phương pháp liên hợp. Lựa chọn các thể nhận tiếp hợp *C. Necator*/các bộ phận cấu thành tập giao đơn trên môi trường được xác định/tối thiểu được bổ sung kháng sinh thích hợp. Ủ các đĩa này và sau đó kiểm tra các khuẩn lạc tích hợp chéo đơn lẻ sau vài ngày ủ.

Lấy một số dòng vô tính được lựa chọn và đánh dấu lại làm độ tinh khiết. Sau đó, lấy các dòng vô tính đơn lẻ vào 1 ml môi trường TSB, không cần chọn lọc kháng sinh và nuôi cấy để cho phép hiện tượng tái tổ hợp thứ hai xảy ra. Sau đó, xếp các phần của mẻ cấy lên đĩa và lựa chọn các dòng vô tính tích hợp chéo. Sau đó xác định và xác nhận các dòng vô tính tái tổ hợp bằng PCR, phương pháp giải trình tự Sanger và các thí nghiệm kiểu hình thích hợp.

Ví dụ 4: Hàm lượng axit amin của protein đơn bào của *Cupriavidus necator* được điều chế từ bã cặn đã lọc etanol.

Cấy 1 mL chủng ΔphaCAB H16 *C. Necator* vào 25 mL bã cặn đã lọc etanol được pha loãng theo tỷ lệ 1:4, ủ trong bình 50 mL ở 30 °C và 200 vòng/phút trong 24 giờ. Bã cặn đã lọc etanol này bao gồm axit lactic 2,61 g/kg; axit axetic 0,41 g/kg; glucoza 0,73 g/kg; và glyxerol 18,3 g/kg.

Sau đó, cấy 20 mL từ bình 50 mL này vào 280 ml bã cặn đã lọc etanol được pha loãng theo tỷ lệ 1: 4 và ủ trong bình 1 L ở 37 °C và 200 vòng/phút trong 24 giờ. Tổng số 300 mL trong bình thứ hai này được sử dụng để cấy vào 2,7 kg nước si-rô đã được lọc tiệt trùng (pha loãng theo tỷ lệ 1:4) trong thiết bị lên men .

Thực hiện quy trình lên men theo mẻ bằng cách sử dụng các điều kiện và các giai đoạn hoạt động được thể hiện trong Bảng 7. Để kiểm soát độ pH trong thiết bị phản ứng sinh học này, duy trì độ pH này bằng cách kiểm soát axit và bazơ của hằng số độ pH không đổi từ đầu quy trình này (độ pH $6,6 \pm 0,05$). Để kiểm soát độ pH, sử dụng các dung dịch được tiệt trùng (0,2 μm) gồm KOH 1 mol/kg và H₂SO₄ 10% (khối lượng) (axit).

BẢNG 7

Thông số	Giai đoạn mẻ
Nhiệt độ	37 °C

Khuấy, theo tầng để kiểm soát DO	500 vòng/phút đến 800 vòng/phút
Độ pH	6,6
Tổng khối lượng (bao gồm cả chất nuôi cấy)	3 kg
Điểm thiết lập bộ điều khiển DO	≥ 20% bão hòa
Tốc độ lưu lượng khí (F _{AIR})	0,4 SLPM
Thời lượng	54 giờ

Chạy thiết bị phản ứng sinh học song song sử dụng chủng H16 *C. Necator* kiểu hoang dã dưới cùng các điều kiện.

Sau quá trình lên men, ly tâm các hỗn hợp chứa trong của thiết bị phản ứng sinh học này và thu gom viên. Phân tích các mức axit amin và protein trong viên này bằng cách sử dụng quy trình phân tích axit amin tiêu chuẩn đã được biết rõ Dược điển Châu Âu (Ph. Eur.). Các kết quả phân tích được thể hiện trong Bảng 8. Trong Bảng này, F của mẫu thử ID này đề cập đến số lượng thiết bị lên men trong khi T đề cập đến số giờ từ lúc cấy truyền thiết bị lên men này và thu hoạch mẫu thử này để phân tích.

BẢNG 8

	Mẫu thử ID		
	Viên tế bào H16 ΔCAB – F3-T51 (Được rửa)	Viên tế bào H16 ΔCAB – F4-T51 (Được rửa)	Viên tế bào H16 "Kiểu hoang dã "- F1-T50 (Được rửa)
	Mẫu thử ID FHR		
	2 Trung bình (n=3) % theo khối lượng	4 Trung bình (n=3) % theo khối lượng	6 Trung bình (n=3) % theo khối lượng
Asparagin ₁	9,4%	9,2%	9,3%
Glutamin ₁	12,7%	12,4%	11,9%
Serin	3,8%	3,9%	3,8%
Histidin	1,8%	1,9%	1,7%
Glyxin	6,1%	6,2%	5,6%
Threonin	5,1%	5,1%	5,2%

Arginin	8,6%	8,9%	8,3%
Alanin	10,7%	10,7%	10,6%
Tyrosin	5,1%	5,3%	5,5%
Xystin / Xysten ₃	0,1%	0,1%	0,1%
Valin	8,5%	8,3%	8,2%
Methionin ₃	2,9%	3,0%	2,7%
Tryptophan ₂	1,3%	0,7%	2,4%
Phenylalanin	4,8%	4,9%	5,0%
Isoleuxin	4,0%	3,9%	3,7%
Leuxin	8,6%	8,8%	8,6%
Lysin	6,0%	6,2%	6,6%
Hydroxyprolin	0,9%	0,8%	0,7%
Prolin	NA	NA	NA
Tổng	100,4%	100, 2%	100,0%
% Protein (Cơ sở khô)	59,0%	55,2%	33,0%
Protein bằng kết hợp (%)	84,5%	81,3%	55,6%

¹ Asparagin và Glutamin được chuyển đổi thành axit Aspartic và axit Glutamic trong quá trình thủy phân

² Thủy phân bằng Phương pháp biến đổi 3 EP 2.2.56

³ Thủy phân bằng Phương pháp biến đổi 1 EP 2.2.56

(4) NA = Không được bao gồm trong phân tích

Ví dụ 5: Sản xuất quy mô lớn Protein Đơn Bào của *Cupriavidus necator* cho các thử nghiệm cá từ bã cặn đã lọc tổng hợp

Chủng H16 ΔphaCAB *Cupriavidus necator* này, như được mô tả trong ví dụ 3, được làm thích nghi để phát triển trong glyxerol bằng phương pháp nuôi cấy sơ cấp trong môi trường tối thiểu với glyxerol 8 g/L.

Sử dụng phương pháp sản xuất tế bào giống hai-bước để làm tăng sự phát triển của chủng trước khi cấy vào thiết bị lên men có thể tích 50 L có chứa bã cặn đã lọc tổng hợp. Thành phần của bã cặn đã lọc tổng hợp này là: glyxerol 18,3 g/kg, natri axetat 0,5575 g/kg, glucoza 0,7275 g/kg, axit lactic (86,7%) 2,5 ml/kg, chiết xuất nấm men 12,5 g/kg, KH₂PO₄ 3,25 g/kg, MgSO₄ • 7H₂O 1,25 g/kg, sắt amoni xitrat 11,25 mg/kg và chất phá bọt 204 0,1 mL/kg. Bã cặn

đã lọc tổng hợp này được điều chế như sau: hòa tan hoàn toàn các thành phần sau đây (theo thứ tự) trong nước khử ion: glyxerol, natri axetat, glucoza, axit lactic trong 70% theo thể tích cuối này. Sau khi hòa tan hoàn toàn tất cả các thành phần, bổ sung thêm KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và sắt amoni citrat vào, và đưa thể tích của dung dịch đến 90%, trong khi bảo đảm hòa tan tất cả các thành phần. Bổ sung thêm chất phá bọt vào và điều chỉnh độ pH bằng NH_3 10% theo khối lượng và H_2SO_4 10% theo thể tích đến $6,60 \pm 0,05$. Đưa thể tích của dung dịch này đến 100% theo thể tích cuối này và lọc tiệt trùng dung dịch này bằng các bộ lọc 0,2 μm .

Lọc tiệt trùng 49-L bã cặn đã lọc tổng hợp vào thiết bị lên men có thể tích làm việc 50-L; độ pH tự nhiên của môi trường này đạt gần 4,5, tiến hành điều chỉnh độ pH trong bể (độ pH cuối = $6,6 \pm 0,1$), bằng NH_3 10% theo khối lượng và H_2SO_4 10% theo thể tích đã được lọc tiệt trùng. Toàn bộ chất trong hai bình Fernbach 2,8-L được chuyển vào thiết bị lên men làm chất nuôi cấy, đến thể tích làm việc cuối 50-L. Mật độ tế bào ban đầu được thiết kế là 0,2 AU/mL $< \text{OD}_{600} < 0,5$ AU/mL.

Kiểm soát độ pH của quá trình lên men này ở $6,6 \pm 0,1$, bằng NH_3 10% theo khối lượng và H_2SO_4 10% theo thể tích đã được lọc tiệt trùng. Kiểm soát lượng pO_2 trên 15% bão hòa, đạt 100% DO bão hòa nồng độ oxy hòa tan ở trạng thái cân bằng trong không khí ở 1 bar (áp suất tuyệt đối). Thông thường, quá trình lên men này kết thúc sau 36 giờ hoạt động nếu OD_{600} ban đầu $\sim 0,5$. Thông số quan trọng của quy trình là mật độ tế bào với mục tiêu > 8 gCDW/kg ($\text{OD}_{600} \sim 20$ AU/mL). Các thông số kỹ thuật khác ở cuối mẻ cần phải đạt được là: %DO $> 90\%$ bão hòa, và chuyển đổi glyxerol $> 95\%$. Một khi đạt được các thông số này, mẻ cấy này được sử dụng làm giống để lên men chính.

Bình 50-L này là mẻ cấy cho hai thiết bị lên men 750-L. 750 L môi trường sản xuất được lọc tiệt trùng vào từng thiết bị lên men 750 L; độ pH tự nhiên của môi trường này gần với mức 4,5, tiến hành điều chỉnh độ pH bên trong bể, với độ pH cuối = $6,6 \pm 0,1$. 25 L của thiết bị lên men 50 L được sử dụng làm mẻ cấy và được chuyển vào các thiết bị lên men 750 L với tổng thể tích làm việc là 775 L.

Mật độ tế bào ban đầu được thiết kế là $\text{OD}_{600} \sim 0,8$ AU/mL, với thời gian ủ mẻ khoảng 36 giờ. Tương tự trên đây, thông số quan trọng của quy trình này là mật độ tế bào với mục tiêu > 8 gCDW/kg ($\text{OD}_{600} \sim 20$ AU/mL). Kiểm soát độ pH của quá trình lên men này ở $6,6 \pm 0,1$, bằng NH_3 10% theo khối lượng và H_2SO_4 10% theo thể tích đã được lọc tiệt trùng. Kiểm soát lượng pO_2 này trên 15% bão hòa, đạt 100% DO bão hòa nồng độ oxy hòa tan ở trạng thái cân bằng trong không khí ở 1 bar (áp suất tuyệt đối).

Trộn các mẻ từ hai thiết bị lên men 750 L này với nhau và ly tâm. Thanh trùng các chất rắn cô đặc để tạo ra sinh khối bất hoạt sinh học.

Sau đó, đông khô các viên tế bào và đóng gói và sau đó sử dụng cho các thí nghiệm cho cá. Theo ví dụ này, tạo ra 15 kg viên tế bào.

Ví dụ 6: Đánh giá thức ăn cho cá Protein đơn bào (SCP) *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB

Đánh giá sự tiêu thụ của protein đơn bào *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB và khả năng tiếp cận các axit amin và tỷ lệ ở cá. Do các loài cá ăn thịt (nghĩa là cá hồi) có các tỷ lệ chuyển đổi protein cao nhất, cần các chế độ ăn giàu protein nhất và rất kén chọn các nguồn thức ăn, thí nghiệm tiêu hóa thức ăn của cá hồi Đại Tây Dương trong 28 ngày đã được thực hiện. Chuẩn bị 15 kg protein đơn bào (SCP) *Cupriavidus necator* H16ΔphaCAB, đã được đông khô, được thanh trùng như được mô tả ở ví dụ 5.

Trong thí nghiệm tiêu hóa này, có 12 bể cá, mỗi bể có chứa 25 con cá hồi, được chia thành 3 nhóm mỗi nhóm 4 bể. Mỗi bể trong 3 nhóm chứa cá hồi này được cho ăn một trong 4 chế độ ăn với hàm lượng % *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB SCP (Chế độ ăn tham khảo, 10% SCP, 20% SCP và 30% SCP) khác nhau và đo sự gia tăng khối lượng và lượng thức ăn được tiêu hóa. Khối lượng của mỗi con cá hồi này khi bắt đầu thử nghiệm là 50 g và con số này tăng lên khoảng 100 g khi kết thúc thử nghiệm này. Ngoài ra, thu thập phân để xác định lượng từng axit amin được tiêu hóa trong thức ăn được cấp cho cá này. Các dữ liệu sau đây được thu thập: nhiệt độ nước, oxy hòa tan, tỷ lệ tử vong (nếu có), khối lượng cơ thể trung bình ban đầu và cuối cùng của cá, lượng thức ăn hàng ngày, khối lượng phân. Hành vi cho ăn và khả năng chấp nhận thức ăn được theo dõi để bảo đảm cá hồi thích nghi với chế độ ăn mới.

Dựa trên nghiên cứu về khả năng tiêu hóa trong 28 ngày, *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB SCP (được điều chế theo ví dụ 5 bằng cách sử dụng thức ăn bã cặn đã lọc tổng hợp làm nguyên liệu thô) được cá hồi tiêu hóa tốt cho thấy sự phát triển cao hơn chế độ ăn Tham khảo và sự tiêu hóa axit amin rất tốt.

The *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB SCP không chỉ có chứa các hàm lượng protein cao hơn so với chế độ ăn Tham khảo, mà còn chứng minh rằng protein và các axit amin của nó có chất lượng vượt trội hơn dựa trên lượng thức ăn tiêu thụ (feed intake= FI) và các kết quả FCR (xem Bảng 9). Có mối quan hệ nghịch đảo giữa chế độ ăn bao gồm *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB SCP và FI và FCR. Các giá trị FI và FCR này giảm đáng kể khi mức độ SCP tăng.

Tỷ lệ sống của cá là 100% và cho thấy rằng *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB SCP là nguyên liệu an toàn cho cá hồi Đại Tây Dương.

BẢNG 9

Khối lượng cơ thể ban đầu (Initial body weight - IBW - Ngày 0) và khối lượng cơ thể cuối cùng (final body weight - FBW - Ngày 28), tăng cân (weight gain - WG), hệ số phát triển đơn vị nhiệt (thermal – unit growth coefficient - TGC), lượng thức ăn tiêu thụ (feed intake - FI) và tỷ lệ chuyển đổi thức ăn (feed conversion ratio - FCR) của các chế độ ăn cho cá hồi Đại Tây Dương chứa SCP (*Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB). Dữ liệu là

giá trị trung bình (các lỗi tiêu chuẩn); giá trị trung bình trong cột không có số mũ chung khác nhau đáng kể dựa trên thí nghiệm Tukey (không có số mũ nghĩa là không có sự khác biệt).

Chế độ ăn	IBW (g/cá)	FBW (g/cá)	WG (g/cá)	TGC	FI (g/cá)	FCR
A (Tham chiếu)	47,2(0,8)	85,1, (1,1)	37,9(0,6)	0,195(0,003)	28,7(0,5) ^a	0,76(0,00) ^a
B (10% SCP)	48,1(0,6)	86,3(1,1)	38,3(1,0)	0,195(0,004)	27,6(0,8) ^{ab}	0,72(0,00) ^b
C (20%SCP)	47,0(0,8)	84,1 (1,0)	37,1 (0,6)	0,192(0,002)	25,4(0,4) ^{bc}	0,69(0,00) ^c
D (30%SCP)	47,3(0,3)	84,2(0,8)	36,9(0,5)	0,191 (0,002)	24,4(0,2) ^c	0,66(0,01) ^c

Cupriavidus necator H16 Δ phaCAB chứa SCP không ảnh hưởng đến khả năng tiêu hóa protein, không quan sát thấy sự khác biệt giữa bốn chế độ ăn thử nghiệm, như được thể hiện trong Bảng 10. Cả khả năng tiêu hóa lipid và năng lượng thô đều tăng ở hàm lượng chứa SCP $\geq 20\%$.

BẢNG 10

Các hệ số tiêu hóa rõ ràng (Apparent digestibility coefficient - ADC) của chất khô (dry matter - DM), protein (P), lipid (L) và năng lượng thô (gross energy - GE) trong các chế độ ăn của các chế độ ăn cấp cho ăn cá hồi Đại Tây Dương với SCP (*Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB).

Chế độ ăn	ADC (% chất khô)			
	DM	P	L	GE
A (Tham chiếu)	90,1 (0,7) ^c	90,6(0,4)	90,8 (1,4) ^c	80,1(0,6) ^c
B (10% SCP)	90,7(0,6) ^{bc}	90,2(0,4)	92,3(0,5) ^{bc}	80,8(0,3) ^{bc}
C (20%SCP)	91,9(0,7) ^{ab}	90,4(0,2)	93,3(1,0) ^{ab}	82,0(0,5) ^b
D (30%SCP)	93,5(0,8) ^a	90,9(0,5)	95,6(0,6) ^a	83,5(0,6) ^a

Dữ liệu là giá trị trung bình (các lỗi tiêu chuẩn); giá trị trung bình trong cột không có số mũ chung khác nhau đáng kể dựa trên thí nghiệm Tukey (không có số mũ nghĩa là không có sự khác biệt).

Khả năng tiêu hóa của mười axit amin thiết yếu được giữ ở hàm lượng hoặc gần 90% trong cả bốn chế độ ăn thí nghiệm (Bảng 10). Do đó, *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB SCP không ảnh hưởng đến sự sẵn có của các axit amin, bất kể mức độ bao gồm các axit amin này. Mặc dù thu được các khả năng tiêu hóa khác nhau về mặt thống kê, các sự khác biệt là

rất nhỏ và rất có thể là do sự thiếu chính xác của phương pháp phân tích axit amin này và các lỗi thí nghiệm điển hình liên quan đến phương pháp tiêu hóa. Các sai số chuẩn hợp này cho thấy các kết quả có sự đồng nhất cao giữa các bản sao.

Chế phẩm thức ăn cho cá được sử dụng trong thí nghiệm này được thể hiện trong Bảng 11.

BẢNG 11

Mã	Thành phần	Mức (%)			
		A (Tham chiếu)	B (10)	C (20)	D (30)
55	Đicaxi phosphat (40% P ₂ O ₅)	3,165	2,849	2,532	2,216
59	Biolys	0,563	0,506	0,450	0,394
60	DL Methionin	0,126	0,113	0,101	0,088
300	Cá trích làm bột cá	15,000	13,5000	12,000	10,500
320	Hỗn hợp vitamin & khoáng	0,300	0,270	0,240	0,210
500	Cá trích làm thức ăn cho cá	20,000	18,000	16,000	14,000
510	Thức ăn gia cầm (loại thức ăn thú cưng)	12,136	10,922	9,709	8,495
515	Bột máu (Phun- sấy khô)	7,000	6,300	5,600	4,900
550	Protein đậu nành cô đặc	5,000	4,500	4,000	3,500
561	Protein ngô cô đặc	10,000	9,000	8,000	7,000
565	Bột đậm từ lúa mì	7,845	7,061	6,276	5,492
567	Bột mì	18,365	16,479	14,592	12,706
	Protein đơn bào	0,000	10,000	20,000	30,000
	Titan đioxit (TiO ₂)	0,500	0,500	0,500	0,500
Mã	Dinh dưỡng	Hàm lượng		Đơn vị	
1	Thể tích	100,000		%	
2	Chất khô	91,838		%	
3	Lipid thô	20,000		%	
5	Protein thô	48,000		%	
6	Xơ thô	0,799		%	
7	Tro	6,205		%	

11	Canxi	1,255	%
12	Phospho	1,065	%
13	Phospho dễ tiêu	0,670	%
74	Leuxin	4,341	%
75	Isoleuxin	1,914	%
77	Phenylalanin	2,177	%
84	Histidin	1,262	%
85	Arginin	2,440	%
800	Lysin dễ tiêu	3,000	%
801	Methionin dễ tiêu	1,000	%
802	Lysin	3,480	%
803	Methionin	1,158	%
820	Năng lượng thô	23,563	MJ/kg
821	Năng lượng thô	20,193	MJ/kg
830	Astaxanthin	0,000	%
840	DHA	0,725	%
841	EPA	1,015	%

Ví dụ 7: Sản xuất sinh khối bằng cách sử dụng chế độ lên men liên tục lấy Glyxerol làm nguyên liệu

Sử dụng 200 μL các tế bào cô đặc từ *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB đã được làm thích nghi để phát triển trong glyxerol để cấy 10 mL môi trường nuôi cấy (xem Bảng 12) cộng glyxerol ở 18 g L^{-1} trong các ống tiệt trùng 50 mL và ủ ở 30°C , 220 vòng/phút trong 24 giờ. Sử dụng mẻ cấy này để cấy các ống khác nhau với 10 mL môi trường mới với glyxerol có OD600 ban đầu 0,2 AU/mL. Ủ các ống này ở 30°C , 220 vòng/phút trong 24 giờ đến OD600 xấp xỉ 2 AU/mL. $2 \times 100 \text{ mL}$ hỗn hợp trong các ống này được chuyển vào các bình cấy 1 L sẵn sàng để nuôi cấy.

BẢNG 12

Môi trường nuôi cấy (lọc tiệt trùng $0,2 \mu\text{m}$)		
Thành phần	Nồng độ	Đơn vị

Axit nitrilotriaxetic	0,15	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,4	g L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	0,94	g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,365	g L ⁻¹
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,5	g L ⁻¹
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,01	g L ⁻¹
NH ₄ (Fe-II)SO ₄ •6H ₂ O	0,05	g L ⁻¹
Dung dịch kim loại truy vết (xem Bảng 12A)	10	mL L ⁻¹

BẢNG 12A

Dung dịch kim loại truy vết		
Thành phần	Nồng độ	Đơn vị
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,100	g L ⁻¹
MnCl ₂ •4H ₂ O	0,030	g L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,300	g L ⁻¹
CoCl ₂ •6H ₂ O	0,200	g L ⁻¹
NiSO ₄ •6H ₂ O	0,025	g L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,030	g L ⁻¹
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,015	g L ⁻¹
Độ pH được điều chỉnh đến 2,0±0,5 sử dụng 6N HCl		

Nạp vào hai thiết bị lên men 1 kg điện tích ban đầu (xem Bảng 13) có chứa glyxerol làm nguồn cacbon với hàm lượng 14,77 g kg⁻¹ và cấy 100 g môi trường chất nuôi cấy như được mô tả trong đoạn trên đây. OD₆₀₀ sau khi cấy là 0,2 AU/mL.

BẢNG 13

Điện tích ban đầu cho giai đoạn mẻ (bộ lọc tiệt trùng 0,2 µm)		
Thành phần	Nồng độ	Đơn vị
Na ₂ HPO ₄	0,37	g kg ⁻¹

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,47	g kg^{-1}
KH_2PO_4	0,55	g kg^{-1}
Axit nitrilotriaxetic	0,15	g kg^{-1}
$\text{NH}_4 (\text{Fe-II})\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05	g kg^{-1}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	g kg^{-1}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01	g kg^{-1}
Dung dịch kim loại truy vết (xem Bảng 12A)	10	mL kg^{-1}
Chất phá bọt 204	0,5	mL kg^{-1}

Sau khi cấy, chạy cả hai quá trình lên men ở chế độ mẻ với sự phát triển dị dưỡng hiếu khí cho đến giai đoạn tĩnh (có đủ nguồn cacbon trong mỗi quá trình để duy trì sự nuôi cấy mẻ trong từ 24 giờ đến 48 giờ). Quá trình nuôi cấy theo mẻ dị dưỡng hiếu khí được theo dõi và sau khi được thiết lập, các thức ăn này được bắt đầu ở chế độ lưu giữ tế bào, loại bỏ sự thâm thấu để duy trì mức giữ là 1,1 kg.

Khi ở trong giai đoạn tĩnh, cả hai thiết bị lên men được đưa vào chế độ hóa trị với việc lưu giữ một phần tế bào đồng thời loại bỏ sự thâm thấu để duy trì mức giữ là 1,1 kg nhằm đạt được sự phát triển dị dưỡng hiếu khí hạn chế cacbon.

Cả hai thiết bị lên men được cấp hai loại thức ăn riêng biệt, thức ăn khoáng (xem Bảng 14) cộng 15 g/Kg Glyxerol với tốc độ 100 g/giờ và thức ăn phosphat (xem Bảng 15) với tốc độ 20 g/giờ. Điều chỉnh độ pH bằng NH_4OH (10% theo khối lượng) và H_2SO_4 10% (theo thể tích). Tỷ lệ pha loãng tế bào là $D = 0,025 \text{ h}^{-1}$.

Bảng 14

Thức ăn khoáng tiết trùng được cung cấp ở 100 g h ⁻¹ (bộc lọc tiết trùng 0,2 μm)		
Thành phần	Nồng độ	Đơn vị
Axit nitrilotriaxetic	0,15	g kg^{-1}
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3	g kg^{-1}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	g kg^{-1}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01	g kg^{-1}
$\text{NH}_4 (\text{Fe-II})\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05	g kg^{-1}

Dung dịch kim loại truy vết (xem Bảng 12A)	10	mL kg ⁻¹
Chất phá bọt 204	0,5	mL kg ⁻¹

Bảng 15

Thức ăn phosphat tiết trùng ở 20 g h ⁻¹ (bộc lọc tiết trùng 0,2 µm)		
Thành phần	Nồng độ	Đơn vị
KH ₂ PO ₄	3	g kg ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	2	g kg ⁻¹

Thu thập các mẫu thử dùng cho phân tích protein và thông tin axit amin và phân tích để cung cấp % theo khối lượng tương đối các axit amin, AA (% theo khối lượng axit amin/% theo khối lượng tổng số axit amin) trên cơ sở khối lượng khô được thể hiện ở Bảng 16. Các mẫu thử được phân tích tại Experiment Station Chemical Laboratories tại Đại học Missouri, Columbus, Missouri theo Mã 0002 cho Thông tin axit amin và Mã 0054 cho Protein thô/Tổng số Nitơ (Kjeldahl).

Bảng 16

Các đơn vị	
% theo khối lượng AA/% theo khối lượng của tổng AA	
Chủng	
<i>Cupriavidus necator</i> H16 ΔphaCAB	
Nguyên liệu	
Glyxerol	
Quy trình	Liên tục
Alanin	9,88
Arginin	7,51
Axit Aspartic	9,64
Xystein	0,80
Axit Glutamic	12,06
Glyxin	6,24

Histidin	2,08
Hydroxylysin	0,01
Hydroxyprolin	0,06
Isoleuxin	4,51
Lanthionin	0,00
Leuxin	8,57
Lysin	6,24
Methionin	2,59
Ornithin	0,04
Phenylalanin	4,59
Prolin	4,33
Serin	3,58
Taurin	0,07
Threonin	4,90
Tryptophan	1,87
Tyrosin	3,32
Valin	7,10
Tổng axit amin (% theo khối lượng)	72,08
Protein thô*	88,80

% theo khối lượng = gam mỗi 100 gam mẫu thử.

Các kết quả được thể hiện trên cơ sở khối lượng khô.

*Protein thô Kjeldahl = (%N) x 6,25

Ví dụ 8: Sản xuất sinh khối sử dụng quá trình lên men chế độ liên tục với vật liệu thô là fructoza.

Chủng được sử dụng cho thí nghiệm này là *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB. Khác với chủng ở Ví dụ 7, chủng này chưa được làm thích nghi để phát triển trong glyxerol bằng phương pháp nuôi cấy sơ cấp trong môi trường tối thiểu với glyxerol.

4×10 ml môi trường nuôi cấy (xem Bảng 12 trong Ví dụ 7) cộng fructoza ở hàm lượng 12 g L^{-1} trong ống ly tâm vô trùng 50 mL được cấy khuẩn lạc từ đĩa TSB và được phát triển trong 24 giờ ở 30°C và 220 vòng/phút.

Sử dụng phương pháp nuôi cấy sơ bộ này để cấy 3×100 ml môi trường nuôi cấy (xem Bảng 12 ở ví dụ 7) với fructoza ở hàm lượng 12 g L^{-1} trong các bình 1 L đến OD 600 nm ban đầu 0,2, sau đó ủ trong 11 giờ ở 30°C và 220 vòng/phút để đạt được OD 600 nm cuối cùng $\sim 2,2$. Hai lần 100mL trong các bình này được chuyển riêng lẻ vào các bình cấy 1 L sẵn sàng để nuôi cấy. Nạp vào hai thiết bị lên men dạng bể được khuấy 1,5 L 1 kg môi trường điện tích ban đầu (Bảng 13 trong ví dụ 7) chứa fructoza với hàm lượng $13,83 \text{ g kg}^{-1}$ là nguồn cacbon và cấy 100 g môi trường chất nuôi cấy như được mô tả trên đây. OD₆₀₀ sau khi cấy là 0,2 AU/mL.

Sau khi nuôi cấy, cả hai quá trình lên men được tiến hành ở chế độ mẻ với sự phát triển dị dưỡng hiếu khí đến giai đoạn tĩnh (có đủ nguồn cacbon trong mỗi quá trình để duy trì nuôi cấy mẻ trong thời gian từ 24 giờ đến 48 giờ). Theo dõi sự phát triển theo mẻ dị dưỡng hiếu khí và sau khi được thiết lập, các thức ăn này được bắt đầu ở chế độ lưu giữ tế bào, loại bỏ sự thâm thấu để duy trì mức giữ là 1,1 kg.

Khi ở trong giai đoạn tĩnh, cả hai thiết bị lên men được đưa vào chế độ hóa trị với việc lưu giữ một phần tế bào đồng thời loại bỏ sự thâm thấu để duy trì mức giữ là 1,1 kg nhằm đạt được sự phát triển dị dưỡng hiếu khí hạn chế cacbon.

Cả hai thiết bị lên men được cấp hai loại thức ăn riêng biệt, thức ăn khoáng (xem Bảng 12A ở Ví dụ 7) cộng 14 g/Kg fructoza với tốc độ 100 g/giờ và thức ăn phosphat (xem Bảng 13 ở Ví dụ 7) với tốc độ 20 g/giờ . Điều chỉnh độ pH bằng NH_4OH (10% theo khối lượng thể tích) và H_2SO_4 10% (theo thể tích). Tốc độ pha loãng môi trường nuôi cấy là $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$.

Thu thập các mẫu thử dùng để phân tích protein và thông tin axit amin và phân tích để cung cấp % theo khối lượng tương đối các axit amin, AA (% theo khối lượng axit amin/% theo khối lượng tổng số axit amin) các axit amin trên cơ sở khối lượng khô, như được thể hiện trong Bảng 17. Các mẫu thử này được phân tích tại Experiment Station Chemical Laboratories tại Đại học Missouri, Columbus, Missouri theo Mã 0002 cho Thông tin axit amin và Mã 0054 cho Protein thô/Tổng số Nito (Kjeldahl).

BẢNG 17

Các đơn vị
% theo khối lượng AA/% theo khối lượng của tổng AA
Chúng

Cupriavidus necator H16 ΔphaCAB

Nguyên liệu

Fructoza

Quy trình	Liên tục
Alanin	9,60
Arginin	7,70
Axit Aspartic	9,64
Xystein	0,90
Axit Glutamic	11,95
Glyxin	6,28
Histidin	2,18
Hydroxylysin	0,03
Hydroxyprolin	0,04
Isoleuxin	4,65
Lanthionin	0,00
Leuxin	8,70
Lysin	6,32
Methionin	2,60
Ornithin	0,05
Phenylalanin	4,58
Prolin	4,20
Serin	3,40
Taurin	0,05
Threonin	4,79
Tryptophan	1,63
Tyrosin	3,47
Valin	7,23
Tổng axit amin (% theo khối lượng)	73,54

Protein thô* 88,58

% theo khối lượng = gam mỗi 100 gam mẫu.

Các kết quả được thể hiện trên cơ sở khối lượng khô.

*Protein thô Kjeldahl = (%N) x 6,25

Ví dụ 9: Sản xuất protein đơn bào từ quá trình lên men khí

Các mẫu thử của chủng *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB này được phát triển vô cơ dưỡng hóa học trong quá trình lên men khí (H_2 , CO_2 và khí) liên tục hạn chế cacbon.

Phân tích tổng hàm lượng axit amin và các thông tin axit amin từ các mẫu thử này và tiến hành so sánh với các mẫu thử được phân tích từ các tế bào được phát triển dị dưỡng trên bã cặn đã lọc được làm sạch và môi trường glycerol khác.

Các lọ Glycerol chứa 1 ml các chủng của chủng *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB đã được làm thích nghi để phát triển trong glycerol được sử dụng để cấy vào bình có vách ngăn 0,25 L có chứa 25 mL môi trường nuôi cấy (Bảng 12 từ Ví dụ 7) cộng glycerol ở hàm lượng 18 g L. Chất nuôi cấy này được ủ trong từ 3 ngày đến 4 ngày (30 °C, 220 vòng/phút) đến OD 600 nm cuối cùng ~ 2,2 AU/mL. Tỷ lệ phát triển mong muốn là 0,08 h⁻¹. Sau đó, chuyển 10 mL chất nuôi cấy này vào hai bình có vách ngăn dung tích 1 L có chứa 90 ml môi trường nuôi cấy (Bảng 12 từ ví dụ 7) cùng với glycerol ở hàm lượng 18 g L⁻¹. Ủ các chất nuôi cấy này trong từ 20 giờ đến 24 giờ (30 °C, 220 vòng/phút) đến mật độ tế bào ~ 1,6-2,5 AU/mL (~ 0,75 g/L), với chất nuôi cấy này vẫn trong giai đoạn tăng trưởng theo cấp số nhân. Tỷ lệ phát triển mong muốn là 0,12 h⁻¹.

Thiết bị phản ứng sinh học có bể khuấy thể tích 2 L có hai tuabin Rushton và hệ thống màng lưu lượng chéo tái chế tế bào được cấy với mục tiêu OD600 ~ 0,2 AU/mL (0,1 g/L) với 200 mL chất nuôi cấy *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB phát triển theo cấp số nhân từ hai bình cấy vào 1,3 L môi trường điện tích ban đầu (Bảng 13 từ ví dụ 7) có chứa glycerol với hàm lượng 14 g kg⁻¹ làm nguồn cacbon.

Sau khi cấy, các quá trình lên men được tiến hành ở chế độ mẻ với sựw phát triển dị dưỡng hiếu khí cho đến giai đoạn tĩnh (hết glycerol). Tổng lưu lượng khí cấp (tốc độ cấp khí) ban đầu được thiết lập là 0,050 SLPM và tốc độ khuấy được chuyển đến bộ điều khiển DO theo tăng để đạt được điểm thiết lập bão hòa DO 30% cho đến khi điểm thiết lập khuấy tối đa ban đầu này đạt 900 vòng/phút.

Khi mẻ nuôi cấy này bước vào giai đoạn tĩnh, bắt đầu cấp H_2 và CO_2 vào, và thiết lập sự phát triển tự dưỡng. Kiểm soát các tốc độ lưu lượng khí cung cấp riêng biệt (H_2 , CO_2 và khí) bởi sự kết hợp giữa các tỷ lệ lưu lượng do người vận hành thiết lập và điều khiển theo tăng. Tỷ lệ cung cấp CO_2 này (lưu lượng cấp CO_2 vào tổng lưu lượng cấp khí) được điều chỉnh để thu được CO_2 % theo thể tích mong muốn. Tỷ lệ cấp O_2 này (lưu lượng cấp khí

trên tổng lưu lượng cấp khí) được điều chỉnh thủ công để đạt được mục tiêu lượng oxy hòa tan % nằm trong khoảng từ 1% đến 10% (bão hòa). Tổng lưu lượng cấp khí (khí + H_2 + CO_2) được chuyển đến bộ điều khiển nồng độ khí thải O_2 có điểm thiết lập ban đầu là 3% theo thể tích O_2 và điểm thiết lập tối đa là 3,5% theo thể tích O_2 để giữ thấp hơn nồng độ oxy giới hạn. Điểm thiết lập khuấy này được tăng thủ công và duy trì ở tốc độ cố định 950 vòng/phút (tốc độ duy trì tối đa cho phép mà không cần quan tâm đến hư hỏng động cơ máy khuấy) trong suốt thời gian thử nghiệm.

Bắt đầu cấp phosphat và khoáng vào, và kiểm soát việc cấp CO_2 đến 4% theo thể tích của tổng lượng khí cấp (CO_2 , H_2 và khí). Có 100% sự lưu giữ tế bào và duy trì mức giữ này (tổng thể tích hệ thống) ở mức 1,5 L bởi lưu lượng thẩm thấu từ màng dòng chéo. Điểm thiết lập nồng độ khí thải ăng tăng từ 3 đến 3,5% theo thể tích. Với việc cấp khoáng được thiết lập đến $0,148 \text{ L h}^{-1}$ và việc cấp phosphat được thiết lập đến $0,045 \text{ L h}^{-1}$ chất thải mẻ cấy (chất thải) được bắt đầu; ở chế độ lưu giữ một phần tế bào. Ở chế độ này, lưu lượng thẩm thấu được cố định trong khi lưu lượng thải được sử dụng để kiểm soát mức giữ của thiết bị phản ứng. Tốc độ pha loãng tế bào ban đầu này $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ và CO_2 trong tổng lượng cấp khí được kiểm soát đến 4% theo thể tích.

Với các tốc độ cấp, các tốc độ thẩm thấu và tốc độ thải được thiết lập % CO_2 trong tổng lượng cấp khí giảm từ 4% xuống 2% theo thể tích để thu được sự hạn chế cacbon. Tốc độ cấp khoáng ban đầu tăng đến $0,163 \text{ L h}^{-1}$, được điều chỉnh đến $0,158 \text{ L h}^{-1}$. Lượng cấp phosphat cũng được điều chỉnh đến $0,036 \text{ L h}^{-1}$. Tốc độ pha loãng D được tăng đến $0,05 \text{ h}^{-1}$ bằng cách điều chỉnh tốc độ thẩm thấu. Toàn bộ các mẫu thử nuôi cấy đều được sử dụng để làm đông khô và để phân tích hàm lượng protein và axit amin; mẫu thử ban đầu được sử dụng không đá và sau đó, mẫu thử khác được sử dụng trên đá từ ống thải mẻ cấy.

Tất cả các khí được lọc từ hệ thống lên men với 100% N_2 ở 0,5 SLPM.

Sẽ rất khó để thiết lập trạng thái ổn định trong hệ thống này vì các lưu lượng khí không bất biến. Các khí đầu vào và khí đầu ra của quá trình lên men này liên tục được theo dõi trực tuyến bằng micro-GC. Sinh khối (g L^{-1}) axit Phosphoric (g L^{-1}) và Glyxerol (g L^{-1}) được theo dõi ngoại tuyến.

Bảng 18 thể hiện tóm tắt các điểm thiết lập thông số lên men cho chế độ lưu giữ tế bào.

BẢNG 18

Thông số	Trạng thái ổn định tự dưỡng (lưu giữ tế bào một phần chế độ liên tục) $115,92^{-1}$ 70,16 giờ hạn chế C [tốc độ cấp thấp 2% CO_2]
Điểm thiết lập nhiệt độ	30

Điểm thiết lập khuấy	950
Độ pH (chỉ số pH trung bình)	6,54
Tổng thể tích hệ thống	1,5
Điểm thiết lập khí thải O ₂ (chỉ số trung bình)	3,84
Điểm thiết lập O ₂ hòa tan (chỉ số trung bình)	2,38
Tốc độ lưu lượng cấp khí (điểm thiết lập MFC) tối thiểu-tối đa (trung bình)	0,147
Tốc độ lưu lượng cấp CO ₂ (điểm thiết lập MFC) tối thiểu-tối đa (trung bình)	0,00803
% CO ₂ trong lượng cấp tối thiểu-tối đa (trung bình)	2,2
Tốc độ lưu lượng cấp H ₂ (điểm thiết lập MFC) tối thiểu-tối đa (trung bình)	0,313
% H ₂ trong lượng cấp tối thiểu-tối đa (trung bình)	62,46
Các thiết lập tốc độ lưu lượng cấp khoáng	0,163 @ 116,4 giờ, 0,158 @ 123,12 giờ
Các thiết lập tốc độ lưu lượng cấp Phosphat	0,045 @ 116,4 h, 0,0358 @ 123,12 giờ
Các thiết lập tốc độ lưu lượng thẩm thấu ²	0,100 @ 116,4 h, 0,1208 @ 123,12, 0,150 @ 138 giờ
Tốc độ pha loãng <i>D</i> (Chất thải) ³	0,0417 @ 92,16 h, 0,05 @ 123,12 giờ
Tỷ lệ cấp CO ₂ (CO ₂ /(CO ₂ +H ₂ +Khí)) ⁴ tối thiểu-tối đa (trung bình)	0,0171
Tỷ lệ cấp O ₂ (Khí/(CO ₂ +H ₂ +Khí)) ⁵ tối thiểu-tối đa (trung bình)	0,313
Tổng tốc độ lưu lượng khí cấp (Điểm thiết lập MFC) tối thiểu-tối đa (trung bình)	0,467
Sắp xếp theo tầng	Tổng lưu lượng khí cấp so với % theo thể tích O ₂ khí thải

% theo khối lượng tương đối các axit amin này (% theo khối lượng của axit amin /% theo khối lượng tổng số axit amin) các axit amin trên cơ sở khối lượng khô được thể hiện trong

Bảng 19. Các mẫu thử được phân tích tại Experiment Station Chemical Laboratories tại Đại học Missouri, Columbus, Missouri theo Mã 0002 cho Thông tin axit amin và Mã 0054 cho Protein thô/Tổng số Nito (Kjeldahl).

BẢNG 19

Quy trình	Đơn vị
	% theo khối lượng AA/% theo khối lượng của tổng AA
	Chủng
	<i>Cupriavidus necator</i> H16 ΔphaCAB
	Nguyên liệu
	CO ₂ /H ₂
	Liên tục
Alanin	8,64
Arginin	8,22
Axit Aspartic	10,01
Xystein	0,93
Axit Glutamic	11,47
Glyxin	5,91
Histidin	2,51
Hydroxylysin	0,02
Hydroxyprolin	0,04
Isoleuxin	4,92
Lanthionin	0,00
Leuxin	8,70
Lysin	5,52
Methionin	2,96
Ornithin	0,06
Phenylalanin	4,97
Prolin	4,22

Serin	3,34
Taurin	0,04
Threonin	5,04
Tryptophan	1,59
Tyrosin	3,74
Valin	7,14
Tổng axit amin (% theo khối lượng)	81,34
Protein thô*	93,45

% theo khối lượng = gam mỗi 100 gam mẫu.

Kết quả được thể hiện trên cơ sở khối lượng khô.

*Protein thô Kjeldahl = (%N) x 6,25

Ví dụ 10: Sản xuất protein đơn bào của *Cupriavidus necator* quy mô phòng thí nghiệm từ dầu ăn đã qua sử dụng

C. necator có thể sử dụng các axit béo và các dầu làm các nguồn cacbon và năng lượng trong các điều kiện hiếu khí (Verlinden và cộng sự. 2011 AMB Express. 11 doi: 10.1186/2191-0855-1-11, 2011; Taniguchi I. và cộng sự. 2003 Microbial production of poly (hydroxyalkanoates) from waste edible oils, 5: pp 545). An economically attractive stream is used cooking oil (Nielsen và cộng sự. 2017 Microbial Biotechnology 10:6 pp 1338-1352 doi: 10.1111/1751-7915.12776) và người ta đã chứng minh rằng *C. necator* có thể sử dụng hiệu quả các luồng này để tạo PHB (Obruca và cộng sự, 2014 Appl. Microbiol. Biotechnol. 98: pp 5883-5890).

Do đó, nghiên cứu được thực hiện để đánh giá độ khả thi của việc sử dụng *C. necator* để sản xuất protein đơn bào (SCP) với dầu ăn đã qua sử dụng làm nguyên liệu lên men. Các điều kiện lên men theo mẻ và mẻ bổ sung dinh dưỡng được thử nghiệm để thu được đủ sinh khối để phân tích hàm lượng protein và thông tin axit amin.

Chủng *C. necator* H16 ΔphaCAB như được sử dụng trong các ví dụ phía trên được làm thích nghi để phát triển trong glyxerol.

200 μl các tế bào cô đặc từ chất nuôi cấy của chủng *C. necator* H16 ΔphaCAB được sử dụng để nuôi cấy 10 mL môi trường nuôi cấy cộng glyxerol ở hàm lượng 18 g L⁻¹ (xem Bảng 12 ở Ví dụ 7) trong các ống tiệt trùng 50 mL và được ủ ở 30 °C, 220 vòng/phút trong 24 giờ. Mẻ nuôi cấy này được sử dụng để cấy các ống khác nhau với 10 ml môi trường mới với

glyxerol có OD600 ban đầu là 0,2 AU/mL. Các ống này được ủ ở 30 °C, 220 vòng/phút trong 24 giờ đến OD600 xấp xỉ 2 AU/mL.

Các ống mẻ nuôi cấy sơ bộ này được sử dụng để cấy 100 mL môi trường mới cộng glyxerol trong các bình 1 L đến OD600 ban đầu là 0,2 AU/mL, các bình này được phát triển trong khoảng 40 giờ đến OD600 cuối cùng là 0,2 AU/mL, ở điểm các thiết bị lên men này được cấy với tỷ lệ 1:10 đến OD600 ban đầu là 0,2 AU/mL. Các thí nghiệm này được thực hiện trong các đơn vị lên men, mỗi đơn vị được nạp 700 g môi trường điện tích ban đầu cộng glyxerol với hàm lượng 14,77 g kg⁻¹ làm nguồn cacbon (xem Bảng 13 ở ví dụ 7) và được gieo giống bằng 70 g chất nuôi cấy.

Trong tất cả các trường hợp, việc kiểm soát nhiệt này độ được thiết lập ở 30 °C, và độ pH được đo và kiểm soát ở mức $6,6 \pm 0,05$ bằng (0,2 μm) NH₃ 10% theo khối lượng và H₂SO₄ 10% theo thể tích đã được lọc tiệt trùng. Trong quá trình lên men, oxy hòa tan (% DO bão hòa) được đo và được kiểm soát trên 30% DO bão hòa; ở 100% DO bão hòa, nồng độ oxy hòa tan này ở trạng thái cân bằng với không khí ở 1 bar (áp suất tuyệt đối). Đạt được sự kiểm soát oxy hòa tan bằng cách xếp tầng tốc độ khuấy giữa 582 vòng/phút và 1500 vòng/phút và tốc độ dòng khí được duy trì không đổi ở mức 0,390 SLPM.

Sự kết thúc của giai đoạn mẻ này được đánh dấu bằng sự tăng mạnh của % DO bão hòa và sự giảm đột ngột % khí thải CO₂. Tất cả các chất nuôi cấy bị bỏ đói để đảm bảo tiêu thụ đầy đủ nguồn C ban đầu. Giai đoạn cấp theo mẻ (mẻ bổ sung dinh dưỡng) được thực hiện trong 6 giờ, hoạt động này được thiết kế để dừng khi thể tích tổng thể trong thiết bị lên men đạt khoảng 620 g. Tại thời điểm đó, các thiết bị lên men này được thu hoạch để lấy mẫu thử để phân tích axit amin. Trong tất cả các trường hợp, bắt đầu mẻ bổ sung dinh dưỡng bằng cách cấp đồng thời 20 g/giờ thức ăn khoáng và 1 g/giờ dầu ăn đã qua sử dụng được hấp khử trùng; các mẫu thử của mẻ bổ sung dinh dưỡng này được lấy ra 30 phút sau khi dừng cấp đồng thời.

Thu được 240 mL các mẫu thử ở cuối các giai đoạn mẻ và mẻ bổ sung dinh dưỡng. Các mẫu thử này được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút, 4 °C, 10 phút trong các ống vô trùng 50mL. Các viên tế bào này được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C trong 24 giờ, sau đó được làm lạnh khô trong khoảng 48 giờ ở áp suất thấp hơn 120 Torr với sấy ngưng tụ hoạt động ở -50 °C. Các chất rắn khô được phân tích để xác định hàm lượng axit amin và protein trong sinh khối khô.

Trong hoạt động mẻ và mẻ bổ sung dinh dưỡng, thông tin axit amin đã thay đổi với độ biến thiên nhỏ hơn 30% được đo trên các axit amin khác nhau. Dữ liệu cho thấy nguồn C này và chế độ hoạt động đóng vai trò quyết định thông tin axit amin.

Các kết quả cho thấy rằng *C. necator* sử dụng dầu ăn làm nguồn cacbon duy nhất với năng suất sinh khối được tính toán là 0,8 gCDW/g dầu, tốc độ phát triển cụ thể là 0,27 1/giờ và năng suất sinh khối khoảng 1 gCDW/kg/giờ.

Có thể quan sát thấy sự khác biệt giữa các chế độ hoạt động sau khi phân tích thông tin axit amin và hàm lượng protein. Bằng chứng thực nghiệm cho thấy rằng hàm lượng protein giảm trong hoạt động mẽ bổ sung dinh dưỡng, hàm lượng protein là tổng của các axit amin (g các axit amin/g CDW) biến thiên trong khoảng từ 35% đến 47%. Các hoạt động theo mẽ đường như liên tục tạo ra sinh khối với hàm lượng protein 45%, tương đương với mẽ tiêu chuẩn trong bã cặn đã lọc được sử dụng trong các thử nghiệm cá này. Mặt khác, các hoạt động theo mẽ bổ sung dinh dưỡng tạo ra sinh khối với hàm lượng protein 37%.

Tỷ lệ % theo khối lượng tương đối các axit amin (% theo khối lượng axit amin/% theo khối lượng tổng axit amin) trên cơ sở khối lượng khô được thể hiện trong Bảng 20. Các mẫu thử được phân tích tại Experiment Station Chemical Laboratories tại Đại học Missouri, Columbus, Missouri theo Mã 0002 cho Thông tin axit amin và Mã 0054 cho Protein thô/Tổng số Nito (Kjeldahl).

BẢNG 20

Quy trình	Đơn vị
	% theo khối lượng AA/% theo khối lượng của tổng AA
	Chủng
	<i>C. necator</i> H16 ΔphaCAB
	Nguyên liệu
	Dầu ăn đã qua sử dụng
	Mẻ bổ sung dinh dưỡng
Alanin	9,71
Arginin	7,52
Axit Aspartic	9,57
Xystein	0,75
Axit Glutamic	12,30
Glyxin	6,48
Histidin	2,05
Hydroxylysin	0,05
Hydroxyprolin	0,10
Isoleuxin	4,89

Lanthionin	0,00
Leuxin	8,66
Lysin	6,43
Methionin	2,71
Ornithin	0,07
Phenylalanin	4,68
Prolin	4,15
Serin	3,40
Taurin	0,05
Threonin	4,94
Tryptophan	1,08
Tyrosin	3,15
Valin	7,27
Tổng axit amin (% theo khối lượng)	60,07
Protein thô*	78,12

% theo khối lượng = gam mỗi 100 gam mẫu.

Kết quả được thể hiện trên cơ sở khối lượng khô.

*Protein thô Kjeldahl = (%N) x 6,25

Ví dụ 11: Sử dụng xử lý sơ bộ bằng enzym (hoặc đồng xử lý) để tăng sự chuyển đổi các hydratcacbon hoặc các protein phức hợp thành SCP

Chủng *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB có loại bỏ thêm (ΔH16_A0006-9) được thực hiện để tăng hiệu quả chuyển đổi (như được mô tả trong đơn đăng ký sáng chế đã công bố US20180100160) được làm thích nghi để phát triển bằng cách sử dụng glucoza làm nguồn cacbon duy nhất bằng cách ủ mở rộng trong môi trường tối thiểu có chứa glucoza.

Các tế bào cô đặc từ chủng *Cupriavidus necator* H16 ΔphaCAB ΔH16_A0006-9 được sử dụng để cấy môi trường nuôi cấy (xem Bảng 12 trong ví dụ 7) có chứa glucoza ở hàm lượng 12 g L⁻¹ được ủ ở 30 °C và lắc trong 48 giờ.

Mỗi mẻ nuôi cấy trong số các mẻ nuôi cấy sơ bộ này được chuyển vào ống vô trùng 50 mL và được ly tâm để tạo viên các tế bào. Loại bỏ chất nổi bề mặt và rửa viên này trong 20 mL môi trường nuôi cấy mới (xem Bảng 12 trong ví dụ 7) không có nguồn

cacbon bổ sung. Cuối cùng, tái tạo huyền phù viên này trong môi trường nuôi cấy mới (xem Bảng 12 trong ví dụ 7) không có các nguồn cacbon hoặc ddH₂O và OD600 được đo.

Các chủng *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB Δ H16_A 0006-9 khi được nuôi cấy một mình trên môi trường gốc hydratcacbon phức hợp, hoặc khi được xử lý trước bằng các enzym để phá vỡ hydratcacbon phức hợp đã được nghiên cứu. Các hydratcacbon đã thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 15.

Các hydratcacbon - Chưa được xử lý:

Môi trường nuôi cấy 2X (Bảng 12 trong ví dụ 7) + 2% các hydratcacbon (độ pH được điều chỉnh và được lọc qua màng 0,2 μ m) được ủ qua đêm ở 30 °C ở 220 vòng/phút, sau đó được cấy khoảng OD600 0,4. ½ thể tích cuối cùng được chia ra bình tùy ý và ddH₂O vô trùng được thêm vào thể tích cuối cùng. Theo dõi sự phát triển bởi OD600. Các điều kiện được thiết lập thành ba phần tương ứng và lỗi được tính toán là 2xSTDEV. Các hydratcacbon được liệt kê trong Bảng 22.

Các hydratcacbon - Xử lý enzym:

2x môi trường nuôi cấy mới + 2% các hydratcacbon + các enzym (như thể hiện trong Bảng 14) được điều chỉnh độ pH đến 6,6, được lọc qua màng 0,2 mm và được ủ qua đêm ở 30 °C, 220 vòng/phút. Trước tiên, tinh bột và pectin được tái tạo huyền phù trực tiếp trong khoảng 500 μ L enzym cô đặc và sau đó bổ sung thêm 2x môi trường nuôi cấy mới vào để điều chỉnh theo thể tích cuối cùng cần thiết. 250 μ L hỗn hợp này được chia vào đĩa vuông có 96 lỗ sâu. Chất nuôi cấy này được tái tạo huyền phù trong ddH₂O vô trùng đến khoảng OD600 0,4 và được bổ sung thêm vào hỗn hợp này trong đĩa nuôi cấy. Theo dõi sự phát triển bởi OD600. Các điều kiện được thiết lập thành ba phần tương ứng và lỗi được tính toán là 2xSTDEV.S

BẢNG 21

Enzym được thí nghiệm		
Enzym	Nồng độ	Phạm vi được thí nghiệm
Maltaza (α -Glucosidaza)	≥ 100 đơn vị/mg protein	15 – 90 U (đối với Mantoza), 25 – 200 U (đối với tinh bột)
Invertaza (β -D-Fructofuranosidaza)	200-300 đơn vị/mg	15, -50
Lactaza (β -Galactosidaza)	>2600 đơn vị/gr	2 – 20 μ l
α -Amylaza (1,4- α -D-Glucan-glucanohydrolaza)		1 – 7 μ l (đối với Mantoza), 10 – 500 μ l (đối với tinh bột)

Amyloglucosidaza (1,4- α -D-Glucan glucohydrolaza)	>260 đơn vị/ml	15 – 90 U (đối với Mantoza), 60 -500 U (đối với tinh bột)
Amyloglucosidaza (1,4- α -D-Glucan glucohydrolaza)	30-60 đơn vị/mg	15 – 50 U (đối với Mantoza), 50 -300 U (đối với tinh bột)
Proteinaza K	800 đơn vị/mL	

Các kết quả của các nghiên cứu sử dụng các hydratcacbon chưa được xử lý và các hydratcacbon + xử lý enzyme được thể hiện trong Bảng 22 dưới đây.

Bảng 22

Đường	Enzym	Nồng độ	OD 600 72 giờ	OD600 96 giờ
Glyxerol	Không có	1%	0,17	0,43
Glucosa	Không có	2%	0,78	
Mantoza	Không có	1%	0,16	0,18
Mantoza	100 μ L Amyloglucosidaza	1%	1,24	1,41
Tinh bột	Không có	1%	0,17	0,17
Tinh bột	100 μ L Amilaza +100 μ L Amyloglucosidaza	1%	2,03	2,22
Sucroza	Không có	1%	0,16	0,17
Sucroza	15 Invectaza đơn vị	1%	0,68	0,82
Lactoza	Không có	1%	0,16	0,17
Lactoza	2 μ L Lactaza	1%	0,53	0,98
Raffinoza	Không có	1%	0,16	0,18
Raffinoza	2 μ L Lactaza +15 Invectaza đơn vị	1%	1,01	1,12
Không có nguồn cacbon	Không có		0,16	0,17
Trống	Không có		0,07	0,07

Dữ liệu cho thấy rằng *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB Δ H16_A0006-9 không thể sử dụng các hydratcacbon phức hợp chưa được xử lý (các di- và oligosacarit) làm nguồn

cacbon duy nhất. Tuy nhiên, khi được phát triển trên các hydratcacbon phức hợp chịu sự thủy phân enzym để giải phóng các monosacarit, quan sát thấy sự phát triển trong một số điều kiện nhất định.

Sau đó, cuộc điều tra đã được thực hiện để nghiên cứu *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB Δ H16_A0006-9 khi được phát triển trên các cơ chất gốc protein được và không được xử lý proteaza. Đã có 96 lỗ được sử dụng để đo sự phát triển trong môi trường sau đây có chứa các protein hoặc các axit amin là nguồn cacbon duy nhất ở nồng độ đã nêu: BSA 1% và 2%, các axit casamino (tức là dịch thủy phân axit casein) 1% và 2%, trypton (tức là dịch thủy phân axit casein) 1% và 2%, axit aspartic 0,25% và 0,125%, glutamin 0,5% và 1%, lysin 1% và 2% và D-Fructoza (1%) hoặc D-glucoza 1% là mẫu đối chứng dương tính. Các bổ sung nguồn cacbon được thực hiện cho môi trường các muối khoáng vô trùng và độ pH được điều chỉnh về 6,6. Mỗi lỗ của đĩa có chứa 100 μ L môi trường và được cấy *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB Δ H16_A0006-9 ở OD₆₀₀ ban đầu (được đo bằng thiết bị đọc đĩa) $\sim$ 0,1.

Sử dụng dạng ống Falcon 10 ml để đo sự phát triển trong môi trường có chứa 2% BSA, được xử lý trước bằng proteinaza K. Cụ thể, dung dịch 2% BSA được lọc tiệt trùng được ủ trong 24 giờ với proteinaza K (100 μ L proteinaza K trên 2 ml dung dịch BSA, độ pH 6,6), được cấy (bắt đầu OD₆₀₀ = 0,1) bằng môi trường nuôi cấy giai đoạn tĩnh *C. necator* H16 Δ phaCAB Δ H16_A0006-9 được phát triển trên fructoza 1%. Mẫu đối chứng có chứa BSA không được xử lý trước cũng được chuẩn bị. Mẫu trống là môi trường nuôi cấy (xem Bảng 12 của ví dụ 7) cộng 2% BSA, không có chất nuôi cấy. Tất cả các mẫu thử được chuẩn bị thành ba phần tương ứng.

Như được thể hiện trong Hình 2, sự phát triển của *Cupriavidus necator* H16 Δ phaCAB Δ H16_A0006-9 tăng lên khi môi trường giàu protein BSA được xử lý trước bằng proteinaza K.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thức ăn hoặc phụ gia thức ăn bao gồm ít nhất từ 10% đến 30% chủng *Cupriavidus necator* H16 được tạo ra để làm giảm hoặc loại bỏ sự sản xuất poly (3-hydroxybutyrat) (PHB) bằng cách sử dụng trao đổi alen (Δ phaCAB) và thức ăn gia cầm.

2. Phương pháp cải thiện khả năng sống sót của vật nuôi hoặc động vật thủy sinh, phương pháp này bao gồm cho động vật này ăn thức ăn hoặc phụ gia thức ăn theo điểm 1.

3. Phương pháp làm giảm các phế phẩm từ các hoạt động thương mại, phương pháp này bao gồm:

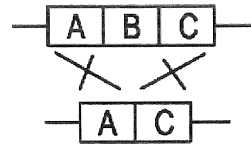
nuôi dưỡng sinh vật ban đầu có khả năng sản xuất poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) trong các phế phẩm, trong đó sinh vật này bị suy giảm và/hoặc không sản xuất PHB, trong đó sinh vật này không chứa axit nucleic ngoại sinh, trong đó sinh vật này có ít nhất một biến đổi của một hoặc nhiều enzym operon phaCAB không bao gồm sự biến đổi phasin, và trong đó sinh vật này là *Cupriavidus necator*;

thu hoạch sinh vật này; và

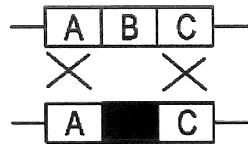
kết hợp sinh vật đã thu hoạch này vào thức ăn hoặc phụ gia thức ăn theo điểm 1.

Alen bản địa:

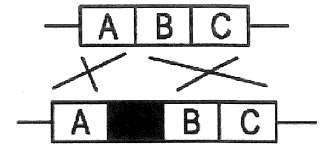
Alen tái tổ hợp:



Xóa

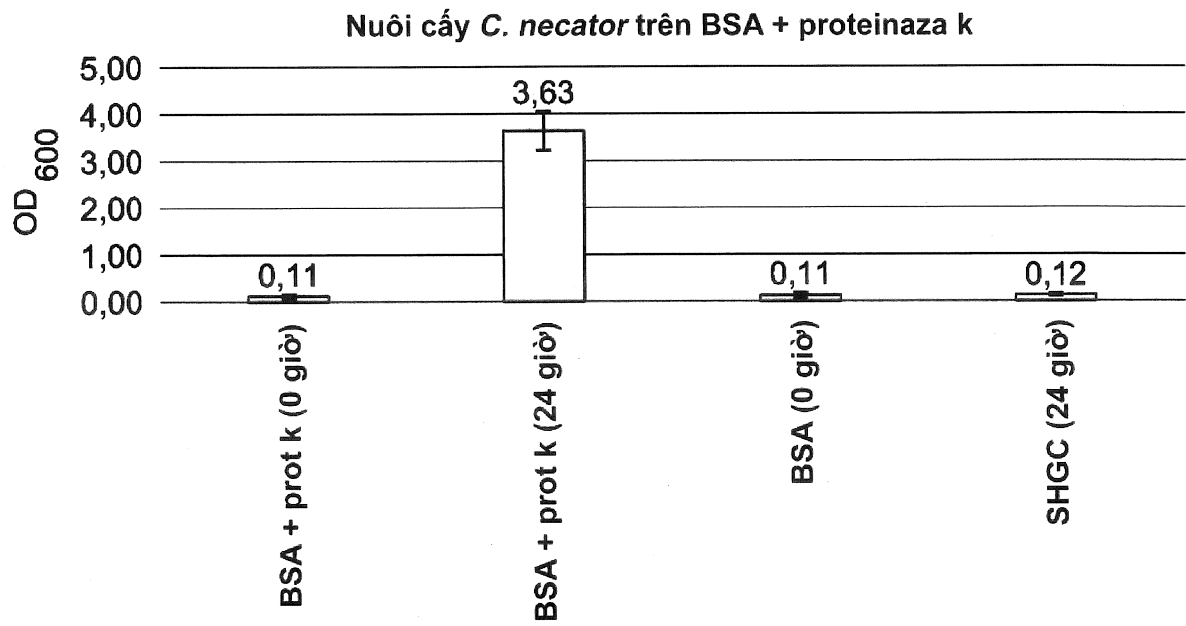


Thay thế

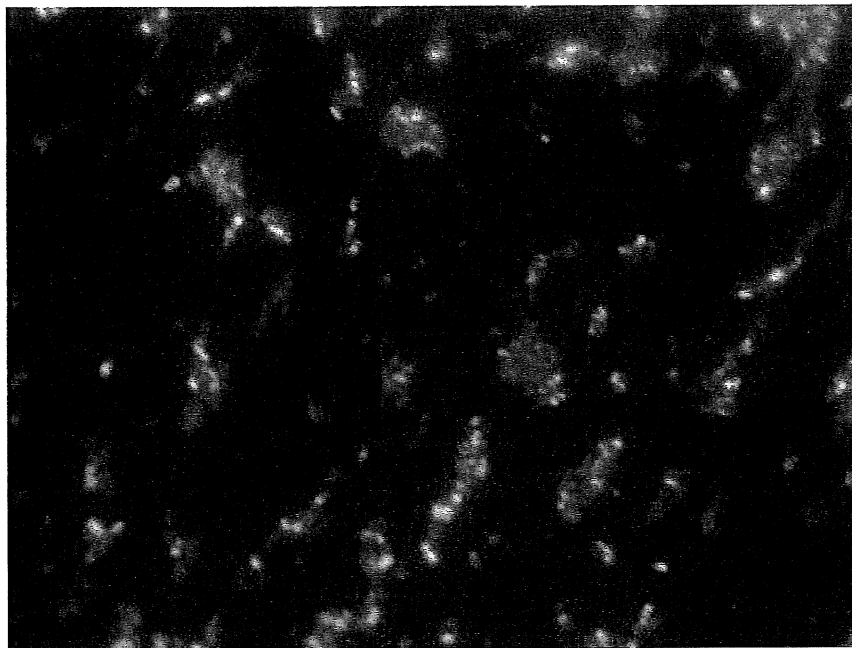


Chèn

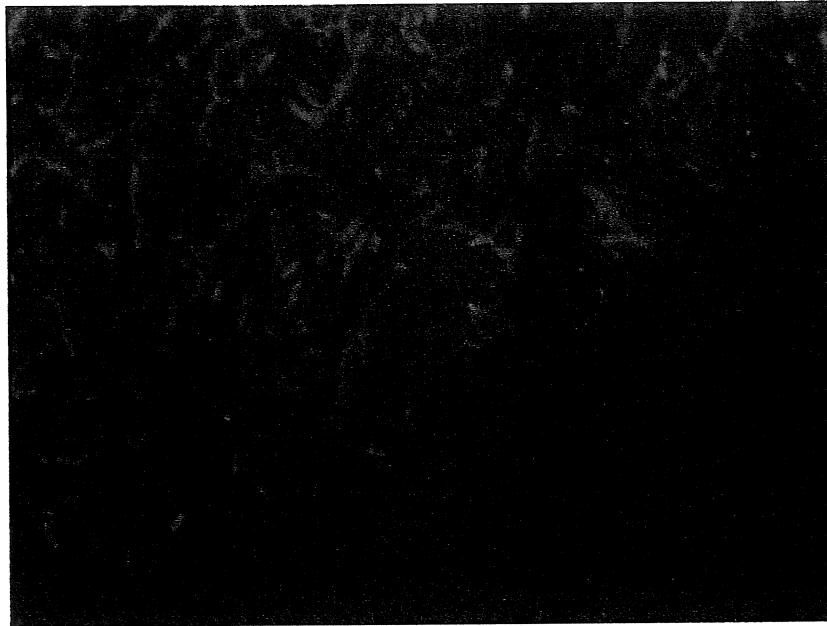
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3A



HÌNH 3B



HÌNH 3C

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> INVISTA TEXTILES (U.K.) LIMITED

PEARLMAN, Paul

ROJAS, Hugo

SMITH, Gary

KIRBY, Gregory

<120> Thức ăn hoặc phụ gia thức ăn, phương pháp cải thiện khả năng sống sót của vật nuôi hoặc động vật thủy sinh, và phương pháp làm giảm các phế phẩm từ các hoạt động thương mại

<130> TÀI LIỆU THAM CHIẾU: INV0146WO

<150> SỐ ĐƠN ƯU TIÊN: US 62/579,507

<151> NGÀY NỘP ĐƠN ƯU TIÊN: 31/10/2017

<160> SỐ LƯỢNG SEQ ID SỐ: 2

<170> PHẦN MỀM: sáng chế phiên bản 3.5

<210> SEQ ID NO. 1

<211> CHIỀU DÀI: 20

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC ĐIỂM

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp

<400> TRÌNH TỰ: 1

atcgaagaga agcaggacga

20

<210> SEQ ID NO.2

<211> CHIỀU DÀI: 21

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC ĐIỂM

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp

<400> TRÌNH TỰ: 2

aacggcaggt atatgtgatg g

21