



(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)



1-0051417

(51)^{2022.01} C12N 1/04; C12N 1/12

(13) B

(21) 1-2023-00735

(22) 01/10/2021

(86) PCT/KR2021/013515 01/10/2021

(87) WO 2022/154212 21/07/2022

(30) 10-2021-0006814 18/01/2021 KR

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/10/2023 427A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

(Ssangnim-dong) 330, Dongho-ro Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) JANG, Sung Hoon (KR); SHIN, Won Sub (KR); CHOI, Jung Woon (KR); KANG, Hae Won (KR); KIM, Ji Young (KR); OK, Seung Han (KR); JANG, Ho Sun (KR); KIM, Jong Min (KR); LEE, Jin Ho (KR); KIM, Dae Cheol (KR).

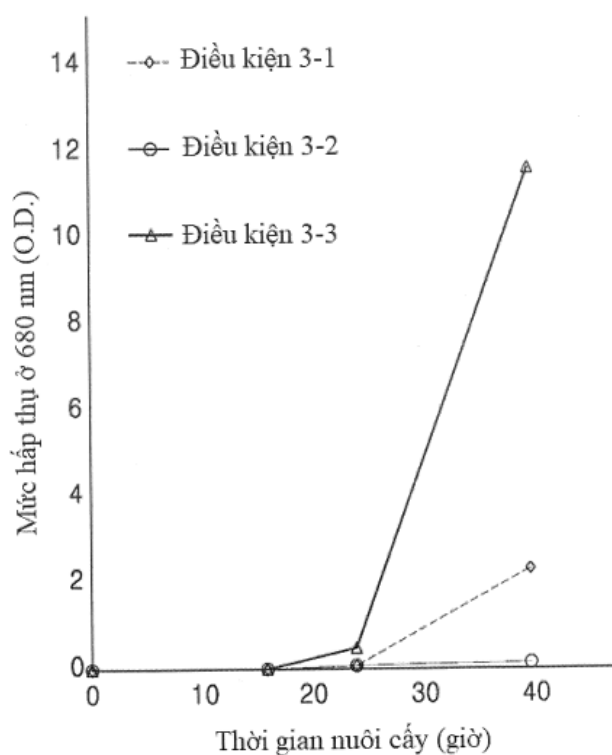
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN ĐÔNG LẠNH VI TẢO THUỘC
HỌ THRAUSTOCHYTRIACEAE BẰNG CÁCH SỬ DỤNG CHẾ PHẨM NÀY VÀ
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SINH KHỐI ĐÔNG KHÔ CỦA VI TẢO THUỘC
HỌ THRAUSTOCHYTRIACEAE

(21) 1-2023-00735

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae và phương pháp bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae bằng cách sử dụng chế phẩm này. Bằng chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae theo một khía cạnh và phương pháp để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae bằng cách sử dụng chế phẩm này, vi tảo có thể bảo quản ổn định trong thời gian dài và chi phí bảo quản vi tảo có thể được giảm bằng cách rút ngắn quy trình. Ngoài ra, theo phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae bằng cách sử dụng chế phẩm, ngay cả khi bảo quản lâu dài ở nhiệt độ trong phòng, sinh khối đông khô ở dạng bột vẫn có thể duy trì hoạt tính của vi khuẩn và dễ bảo quản và vận chuyển có thể được sản xuất qua một quy trình đơn giản.

【FIG. 4】



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae và phương pháp bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi tảo, là thực vật phù du, xếp ở bậc thấp nhất trong chuỗi thức ăn của hệ sinh thái biển. Trong số đó, vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, không giống như các loại vi tảo nói chung, có đặc điểm là dị dưỡng hơn là tự dưỡng có nguồn gốc từ quá trình quang hợp, và đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp axit béo không bão hòa nhiều lần omega-3 bao gồm axit docosahexaenoic và axit eicosapentaenoic cho hệ sinh thái biển bằng cách sản xuất và chứa nồng độ cao của axit béo không bão hòa nhiều lần omega-3 bao gồm axit docosahexaenoic và axit eicosapentaenoic.

Các vi sinh vật nói chung có thể được bảo quản trong một thời gian dài bằng phương pháp bảo quản đông lạnh hoặc phương pháp bảo quản đông khô. Tuy nhiên, các phương pháp bảo quản chung này đối với vi sinh vật không phù hợp để bảo quản vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae với hiệu quả lâu dài. Theo đó, cho đến nay, vi tảo như vậy được bảo quản dưới dạng nuôi cấy thứ cấp. Tuy nhiên, do vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae được đặc trưng là dị dưỡng, chúng đòi hỏi phải cấy chuyển thường xuyên hơn so với các vi sinh vật nói chung tùy thuộc vào môi trường bảo quản, điều đó khiến chúng dễ bị nhiễm bẩn và dẫn đến chi phí bảo quản cao. Do đó, cần phải phát triển phương pháp mới để bảo quản lâu dài vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae.

Tài liệu của tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

(Tài liệu sáng chế 1): Công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 2013/0089901 A1

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Sáng chế đề xuất chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, chế phẩm này chứa sữa tách béo, sucroza, và natri clorua.

Sáng chế đề xuất phương pháp bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae bằng cách sử dụng chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae hoặc phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae.

Sáng chế đề xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae.

Sáng chế mô tả việc sử dụng chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, chế phẩm này chứa sữa tách béo, sucroza, và natri clorua, để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae.

Sáng chế mô tả việc sử dụng chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, chế phẩm này chứa sữa tách béo, sucroza, và natri clorua, để sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae.

Giải pháp kỹ thuật

Mỗi phần mô tả và phương án được mô tả trong sáng chế cũng có thể được áp dụng cho mỗi phần mô tả và phương án khác. Nghĩa là, tất cả các kết hợp của các yếu tố khác nhau được mô tả trong sáng chế này đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không được hiểu là bị giới hạn ở phần mô tả cụ thể được mô tả dưới đây. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra hoặc có thể xác định nhiều dạng tương đương với các khía cạnh cụ thể của sáng chế được mô tả trong

sáng chế chỉ bằng cách sử dụng các thí nghiệm thông thường. Hơn nữa, các dạng tương đương như vậy cũng được dự định bao gồm trong sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện hình ảnh của các lọ đông khô (A đến D) được chuẩn bị theo một khía cạnh, và các hình ảnh đã xác nhận rằng khuẩn lạc đã được tạo thành sau khi cấy các thành phần của các lọ lên đĩa thạch (E đến H) (AH: A thể hiện hình ảnh của lọ đông khô được chuẩn bị theo Điều kiện 1-1, E thể hiện hình ảnh đã xác nhận rằng khuẩn lạc đã được tạo thành sau khi các thành phần của lọ của A được cấy lên đĩa thạch, B thể hiện hình ảnh của lọ đông khô được chuẩn bị theo Điều kiện 1-2, F thể hiện hình ảnh đã xác nhận rằng khuẩn lạc đã được tạo thành sau khi các thành phần của lọ của B được cấy lên đĩa thạch, C thể hiện hình ảnh của lọ đông khô được chuẩn bị theo Điều kiện 1-3, G thể hiện hình ảnh đã xác nhận rằng khuẩn lạc đã được tạo thành sau khi các thành phần của lọ của C được cấy lên đĩa thạch, D thể hiện hình ảnh của lọ đông khô được chuẩn bị theo Điều kiện 1-4, và H thể hiện hình ảnh đã xác nhận rằng khuẩn lạc đã được tạo thành sau khi các thành phần của lọ của D được cấy lên đĩa thạch.).

FIG. 2 thể hiện sự xác nhận về khuẩn lạc sau khi sinh khối đông khô theo một khía cạnh được cấy lên đĩa thạch (AE: A thể hiện sự xác nhận về khuẩn lạc sau khi sinh khối đông khô theo Điều kiện 3-1 được cấy lên đĩa thạch, B thể hiện sự xác nhận về khuẩn lạc sau khi sinh khối đông khô theo Điều kiện 3-2 được cấy lên đĩa thạch, C thể hiện sự xác nhận về khuẩn lạc sau khi sinh khối đông khô theo Điều kiện 3-3 được cấy lên đĩa thạch, D thể hiện sự xác nhận về khuẩn lạc sau khi sinh khối đông khô theo Điều kiện 3-4 được cấy lên đĩa thạch, E thể hiện sự xác nhận về khuẩn lạc sau khi sinh khối đông khô theo Điều kiện 3-5 được cấy lên đĩa thạch.).

FIG. 3 thể hiện đồ thị của đường cong sinh trưởng trong đó mức hấp thụ được đo cho mỗi lần nuôi cấy sau khi cấy sinh khối đông khô theo một khía cạnh trong bình nuôi cấy.

FIG. 4 thể hiện đồ thị của đường cong sinh trưởng trong đó mức hấp thụ được đo cho mỗi lần nuôi cấy sau khi sinh khối đông khô theo một khía cạnh được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong 7 ngày và sau đó được cấy trong bình nuôi cấy.

FIG. 5 thể hiện hình ảnh đã xác nhận rằng khuẩn lạc được tạo thành sau khi sinh khối đông khô theo một khía cạnh được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong 12 tuần và sau đó được cấy lên đĩa thạch.

Mô tả chi tiết sáng chế

Một khía cạnh đề xuất chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, chế phẩm này chứa sữa tách béo, sucroza, và natri clorua.

Thuật ngữ “sữa tách béo” để chỉ sữa đã loại bỏ chất béo.

Thuật ngữ “Thraustochytriaceae” được sử dụng ở đây là vi tảo thuộc bộ Thraustochytriales, và vi tảo này có thể bao gồm ít nhất một loại được chọn từ *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp., *Thraustochytriidae* sp., *Japonochytrium* sp., *Monorhizochytrium* sp., *Sicyoidochytrium* sp., *Ulkenia* sp., *Parietichytrium* sp., *Botryochytrium* sp., *Hondaea* sp., và *Labyrinthulochytrium* sp. Tuy nhiên, các phương án của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Chế phẩm này có thể chứa trong khoảng từ 0,5% khối lượng đến 20% khối lượng của sữa tách béo tính theo tổng khối lượng của chế phẩm. Ví dụ, lượng sữa tách béo chứa trong chế phẩm có thể nằm trong khoảng từ 0,5% khối lượng đến 15% khối lượng, từ 0,5% khối lượng đến 10% khối lượng, từ 0,5% khối lượng đến 8% khối lượng, từ 1% khối lượng đến 20% khối lượng, từ 1% khối lượng đến 15% khối lượng, từ 1% khối lượng đến 10% khối lượng, từ 1% khối lượng đến 8% khối lượng, từ 2% khối lượng đến 20% khối lượng, từ 2% khối lượng đến 15% khối lượng, từ 2% khối lượng đến 10% khối lượng, từ 2% khối lượng đến 8% khối lượng, từ 3% khối lượng đến 20% khối lượng, từ 3% khối lượng đến 15% khối lượng, từ 3% khối lượng đến 10% khối lượng, hoặc từ 3% khối lượng đến 8% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chế phẩm.

Chế phẩm này có thể chứa sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 1% khối lượng đến 20% khối lượng tính theo tổng khối lượng của chế phẩm. Ví dụ, lượng sucroza chứa trong chế phẩm có thể nằm trong khoảng từ 1% khối lượng đến 15% khối lượng, từ 1% khối lượng đến 12% khối lượng, từ 2% khối lượng đến 20% khối lượng, từ 2% khối lượng đến 15% khối lượng, từ 2% khối lượng đến 12% khối lượng, từ 4% khối lượng đến 20% khối lượng, từ 4% khối lượng đến 15% khối lượng, từ 4% khối lượng đến 12% khối lượng,

từ 6% khối lượng đến 20% khối lượng, từ 6% khối lượng đến 15% khối lượng, từ 6% khối lượng đến 12% khối lượng, hoặc từ 6% khối lượng đến 9% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chế phẩm.

Chế phẩm này có thể chứa natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% khối lượng đến 10% khối lượng tính theo tổng khối lượng của chế phẩm. Ví dụ, lượng natri clorua chứa trong chế phẩm có thể nằm trong khoảng từ 0,1% khối lượng đến 9% khối lượng, từ 0,1% khối lượng đến 8,5% khối lượng, từ 0,5% khối lượng đến 10% khối lượng, từ 0,5% khối lượng đến 9% khối lượng, từ 0,5% khối lượng đến 8,5% khối lượng, từ 1% khối lượng đến 10% khối lượng, từ 1% khối lượng đến 9% khối lượng, từ 1% khối lượng đến 8,5% khối lượng, từ 2% khối lượng đến 10% khối lượng, từ 2% khối lượng đến 9% khối lượng, từ 2% khối lượng đến 8,5% khối lượng, từ 3% khối lượng đến 10% khối lượng, từ 3% khối lượng đến 9% khối lượng, từ 3% khối lượng đến 8,5% khối lượng, từ 5% khối lượng đến 8,5% khối lượng, hoặc từ 6% khối lượng đến 8,5% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chế phẩm.

Chế phẩm này có thể chứa sữa tách béo và sucroza với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10. Ví dụ, chế phẩm này có thể chứa sữa tách béo và sucroza với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:8, 1:0,5 đến 1:5, 1:0,5 đến 1:3, 1:1 đến 1:10, 1:1 đến 1:8, 1:1 đến 1:5, 1:1 đến 1:3, 1:1.2 đến 1:10, 1:1.2 đến 1:8, 1:1.2 đến 1:5, hoặc 1:1.2 đến 1:3.

Chế phẩm này có thể chứa sữa tách béo và natri clorua với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10. Ví dụ, chế phẩm này có thể chứa sữa tách béo và natri clorua với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:8, 1:0,5 đến 1:5, 1:0,5 đến 1:3, 1:1 đến 1:10, 1:1 đến 1:8, 1:1 đến 1:5, 1:1 đến 1:3, 1:1.2 đến 1:10, 1:1.2 đến 1:8, 1:1.2 đến 1:5, hoặc 1:1.2 đến 1:3.

Thuật ngữ "bảo quản đông lạnh" được sử dụng ở đây để chỉ việc bảo quản nguyên liệu ở trạng thái lỏng sau khi đông lạnh chúng ở trạng thái rắn, và có thể bao gồm "bảo quản đông khô". Ví dụ, chế phẩm là chế phẩm để bảo quản đông khô vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae. Thuật ngữ "làm đông khô" được sử dụng ở đây để chỉ phương pháp làm khô trong đó độ ẩm trong mẫu được thăng hoa và loại bỏ khỏi đó bằng cách đông lạnh mẫu ở trạng thái lỏng và để mẫu ở áp suất giảm. Việc làm đông khô có thể được sử dụng

để bảo quản vi sinh vật lâu dài. Tuy nhiên, chất bảo vệ đông lạnh thích hợp nên được sử dụng để ngăn ngừa sự hư hại của các tế bào trong quy trình làm đông khô.

Chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae chứa sữa tách béo, sucroza, và natri clorua có thể được sử dụng cùng với các chất bảo vệ đông lạnh khác. Ví dụ, natri clorua, dimetylsulfoxit (DMSO), dextran, sucroza, glyxerol, mannitol, sorbitol, fructoza, rafinoza, albumin huyết thanh, và các chất tương tự có thể được sử dụng kết hợp tùy thuộc vào mục đích, nhưng các phương án của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác đề xuất phương pháp bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, phương pháp này bao gồm: 1) nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae trong môi trường chứa chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae chứa sữa tách béo, sucroza và natri clorua; 2) thu hồi sản phẩm đã nuôi cấy của bước 1); và 3) làm đông khô sản phẩm đã nuôi cấy để tạo ra sinh khối.

Chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae là giống như được mô tả trên đây.

Thuật ngữ “nuôi cấy” được sử dụng ở đây để chỉ việc cho sinh trưởng vi tảo trong điều kiện môi trường được kiểm soát thích hợp. Quy trình nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện theo môi trường và các điều kiện nuôi cấy thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Quy trình nuôi cấy này có thể dễ dàng được điều chỉnh và sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo loại vi tảo đã chọn.

Cụ thể, việc nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae theo sáng chế có thể được thực hiện trong các điều kiện dị dưỡng, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “dị dưỡng” là phương pháp dinh dưỡng phụ thuộc vào chất hữu cơ thu được từ nguồn năng lượng hoặc nguồn dinh dưỡng bên ngoài cơ thể, là thuật ngữ phân biệt với tự dưỡng, và có thể được sử dụng hoán đổi với thuật ngữ “nuôi cấy trong điều kiện tối”.

Quy trình nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae không bị giới hạn cụ thể ở đó, mà có thể được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy theo mẻ, phương pháp nuôi cấy liên tục, phương pháp nuôi cấy nạp liệu theo mẻ, và các phương pháp tương tự, đều là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Môi trường bất kỳ được sử dụng để nuôi cấy vi tảo theo sáng chế có thể được sử dụng mà không bị giới hạn miễn sao cùng là môi trường nuôi cấy trong đó vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae sinh trưởng. Cụ thể, môi trường thông thường

chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, hợp chất vô cơ, axit amin và/hoặc vitamin thích hợp cho vi tảo theo sáng chế, có thể được sử dụng.

Nguồn cacbon chứa trong môi trường được sử dụng trong nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae có thể ít nhất là một nguồn được chọn từ glucoza, fructoza, maltoza, galactoza, mannoza, sucroza, arabinoza, xyloza và glyxerol. Tuy nhiên, nguồn cacbon bất kỳ cũng có thể được sử dụng miễn sao được sử dụng để nuôi cấy vi tảo.

Nguồn nitơ chứa trong môi trường được sử dụng trong nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae có thể là i) ít nhất một nguồn nitơ hữu cơ được chọn từ chiết phẩm nấm men, chiết phẩm thịt bò, pepton và trypton, hoặc ii) ít nhất một nguồn nitơ vô cơ được chọn từ amoni axetat, amoni nitrat, amoni clorua, amoni sulfat, natri nitrat, ure, và mononatri glutamat (MSG). Tuy nhiên, các phương án của sáng chế không bị giới hạn ở đó, và nguồn nitơ bất kỳ được sử dụng để nuôi cấy vi tảo có thể được sử dụng ở đây.

Môi trường được sử dụng trong nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae có thể bao gồm, dưới dạng nguồn phospho, kali dihydro phosphat, dikali hydro phosphat, muối chứa natri tương ứng của chúng, hoặc hỗn hợp của chúng. Tuy nhiên, nguồn phospho không bị giới hạn ở đó.

Các điều kiện nuôi cấy để nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae có thể là điều kiện nuôi cấy bất kỳ miễn sao vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae sinh trưởng trong đó. Ví dụ, việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong khi kiểm soát nhiệt độ, độ pH, v.v. trong điều kiện hiếu khí.

Cụ thể, hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sunfuric) được sử dụng để điều chỉnh độ pH ở mức thích hợp (ví dụ, độ pH từ 5 đến 9, cụ thể là độ pH từ 6 đến 8) của môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, các phương án của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, để duy trì trạng thái hiếu khí của môi trường nuôi cấy, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy; hoặc để duy trì các điều kiện yếm khí và vi hiếu khí, có thể không bơm khí hoặc có thể bơm khí nitơ, hydro hoặc cacbon dioxit. Tuy nhiên, các phương án của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, nhiệt độ môi trường nuôi cấy có thể được duy trì trong khoảng từ 20°C đến khoảng 45°C, hoặc từ khoảng 25°C đến khoảng 40°C, từ khoảng 10 giờ đến khoảng

160 giờ, từ khoảng 10 giờ đến khoảng 120 giờ, từ khoảng 10 giờ đến khoảng 80 giờ, từ khoảng 10 giờ đến khoảng 50 giờ, hoặc từ khoảng 10 giờ đến khoảng 40 giờ. Tuy nhiên, các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy, chất chống tạo bọt như polyglycol este của axit béo có thể được sử dụng để ngăn chặn việc tạo ra các bong bóng, nhưng các phương án của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Việc thu hồi môi trường nuôi cấy có thể là thu thập môi trường nuôi cấy đích bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, phương pháp ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, v.v. có thể được sử dụng, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuật ngữ "sinh khối" được sử dụng ở đây để chỉ các sinh vật như thực vật, động vật, và vi sinh vật có thể được sử dụng làm năng lượng hóa học, nghĩa là nguồn năng lượng của năng lượng sinh học, và có thể đề cập đến, về khía cạnh sinh thái, khối lượng hoặc lượng năng lượng của một sinh vật tồn tại trong một đơn vị thời gian và không gian. Ngoài ra, sinh khối bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hợp chất được tiết ra bởi tế bào, và có thể chứa nguyên liệu ngoại bào cũng như tế bào và/hoặc thành phần nội bào. Theo sáng chế, sinh khối có thể là vi tảo của chính Thraustochytriaceae, môi trường nuôi cấy của nó, hoặc sản phẩm được sản xuất bằng cách nuôi cấy hoặc lên men vi tảo, hoặc có thể là sản phẩm cô đặc của sinh khối. Tuy nhiên, sinh khối không bị giới hạn ở đó.

"Sản phẩm đã nuôi cấy" của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae để chỉ sản phẩm được sản xuất bằng cách nuôi cấy vi tảo. Cụ thể, sản phẩm đã nuôi cấy có thể là môi trường nuôi cấy chứa vi tảo hoặc dịch lọc nuôi cấy mà từ đó vi tảo đã được loại bỏ khỏi môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, sản phẩm đã nuôi cấy không bị giới hạn ở đó. Sản phẩm đã nuôi cấy của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae có thể được sản xuất bằng cách cấy vi tảo trong môi trường nuôi cấy vi tảo và sau đó tiến hành quy trình nuôi cấy theo phương pháp nuôi cấy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc tạo ra sinh khối bằng cách làm đông khô sản phẩm đã nuôi cấy có thể được thực hiện theo phương pháp làm đông khô đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, sản phẩm đã nuôi cấy vi tảo được thu hồi, cho vào lọ đông khô (lọ FD) và được nối với thiết bị làm đông khô trong khi vẫn duy trì điều kiện chân không, và sau đó nước được loại bỏ khỏi đó trong khi vẫn duy trì điều kiện nhiệt độ và áp suất không đổi. Điều kiện nhiệt độ không

đổi có thể là, ví dụ, nhiệt độ bằng -50°C hoặc thấp hơn, và điều kiện áp suất không đổi có thể là áp suất bằng 0,133 mba hoặc thấp hơn, nhưng các điều kiện nhiệt độ và áp suất không bị giới hạn ở đó.

Phương pháp bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae có thể còn không bao gồm bước làm đông lạnh vi tảo cả trước và sau bước 3). Ví dụ, quy trình đông lạnh sơ bộ có thể không được thực hiện trước quy trình 3). Theo phương pháp này, vi tảo có thể được bảo quản với chi phí thấp thông qua một quy trình đơn giản bằng cách sản xuất sinh khối đông khô mà không bao gồm quy trình đông lạnh sơ bộ.

Khía cạnh khác đề xuất phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, phương pháp này bao gồm: 1) nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae trong môi trường chứa chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae chứa sữa tách béo, sucroza, và natri clorua; 2) thu hồi sản phẩm đã nuôi cấy của bước 1); và 3) làm đông khô sản phẩm đã nuôi cấy để tạo ra sinh khối.

Chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, thu hồi sản phẩm đã nuôi cấy, và sản xuất sinh khối đông khô là như được mô tả trên đây.

Phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae có thể còn không bao gồm bước làm đông lạnh vi tảo cả trước và sau bước 3). Ví dụ, quy trình làm đông lạnh sơ bộ có thể không được thực hiện trước quy trình 3). Theo phương pháp này, sinh khối đông khô có thể được sản xuất với chi phí thấp thông qua một quy trình đơn giản bằng cách sản xuất sinh khối đông khô mà không bao gồm quy trình đông lạnh sơ bộ.

Khía cạnh khác đề xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae bao gồm: a) chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, chế phẩm này chứa sữa tách béo, sucroza, và natri clorua; và b) vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, trong đó sinh khối đông khô được sản xuất bằng phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae.

Chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae và phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae là như được mô tả trên đây.

Sinh khối đông khô có thể được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 25°C trong 12 tuần hoặc lâu hơn. Ví dụ, sinh khối đông khô có thể được bảo quản ở nhiệt độ phòng từ 3 tháng đến 5 năm, 3 tháng đến 3 năm, 3 tháng đến 2 năm, 3 tháng đến 1 năm, 3 tháng đến 10 tháng, 3 tháng đến 8 tháng, 3 tháng đến 6 tháng.

Thuật ngữ “nhiệt độ trong phòng” được sử dụng ở đây có thể đề cập đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 25°C, và có thể được sử dụng hoán đổi với thuật ngữ “nhiệt độ bình thường”.

Thuật ngữ “có thể bảo quản” được sử dụng ở đây có thể đề cập đến đặc điểm mà các tế bào có thể sinh trưởng khi sinh khối đông khô được bảo quản và sau đó được nuôi cấy lại trong môi trường, hoặc hoạt tính của tế bào được duy trì ở 60% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, hoặc 90% hoặc cao hơn, so với tế bào sống không được làm đông khô.

Sinh khối đông khô có thể chứa $1,0 \times 10^7$ đến $1,0 \times 10^{12}$ tế bào sống trong 1 mL sinh khối sau khi bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 25°C trong ít nhất 12 tuần. Ví dụ, sau khi bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 25°C trong ít nhất 12 tuần, sinh khối đông khô có thể chứa, trong 1 mL, $1,0 \times 10^7$ đến $1,0 \times 10^{11}$, $1,0 \times 10^7$ đến $1,0 \times 10^{10}$, $1,0 \times 10^8$ đến $1,0 \times 10^{12}$, $1,0 \times 10^8$ đến $1,0 \times 10^{11}$, $1,0 \times 10^8$ đến $1,0 \times 10^{10}$, $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{12}$, $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{11}$, hoặc $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{10}$ tế bào sống.

Sinh khối đông khô có thể chứa $1,0 \times 10^7$ đến $1,0 \times 10^{12}$ CFU (đơn vị tạo thành khuẩn lạc)/mL tế bào sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 25°C trong ít nhất 12 tuần. Ví dụ, sau khi bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 25°C trong ít nhất 12 tuần, sinh khối đông khô có thể chứa $1,0 \times 10^7$ đến $1,0 \times 10^{11}$, $1,0 \times 10^7$ đến $1,0 \times 10^{10}$, $1,0 \times 10^8$ đến $1,0 \times 10^{12}$, $1,0 \times 10^8$ đến $1,0 \times 10^{11}$, $1,0 \times 10^8$ đến $1,0 \times 10^{10}$, $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{12}$, $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{11}$, hoặc $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{10}$ CFU/mL tế bào sống.

Khía cạnh khác mô tả việc sử dụng chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, chế phẩm này chứa sữa tách béo, sucroza, và natri clorua, để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae.

Khía cạnh khác mô tả việc sử dụng chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, chế phẩm này chứa sữa tách béo, sucroza, và natri clorua, để sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae.

Chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, phương pháp bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, và phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae là như được mô tả trên đây.

Hiệu quả có lợi

Theo chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae và phương pháp bảo quản đông lạnh bằng cách sử dụng chế phẩm này, vi tảo có thể được bảo quản ổn định trong một thời gian dài, và có thể giảm chi phí bảo quản vi tảo bằng cách rút ngắn quy trình. Ngoài ra, theo phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae bằng cách sử dụng chế phẩm này, hoạt tính của vi sinh vật được duy trì ngay cả khi bảo quản trong một thời gian dài ở nhiệt độ trong phòng, và sinh khối đông khô ở dạng bột, là dạng dễ bảo quản và vận chuyển, được sản xuất bằng quy trình đơn giản.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này được cung cấp để mô tả một hoặc nhiều phương án nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1. Xác nhận khả năng sống sót của tế bào theo điều kiện làm đông khô vi tảo

Ví dụ 1-1. Sản xuất chất bảo quản đông khô

Tổng cộng 4 mL chất bảo quản đông khô được sản xuất bằng cách trộn 0,8 mL dung dịch sữa tách béo 4%, 1,6 mL dung dịch sucroza 20%, và 1,6 mL dung dịch natri clorua 20%, mỗi loại được hòa tan trong nước cất.

Ví dụ 1-2. Làm đông khô vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae

Loài vi tảo *Schizochytrium* CD01-5004 (Số truy nhập: KCTC14345BP) được cấy lên môi trường GYEP (10 g/L glucoza, 1 g/L chiết phẩm nấm men, 1 g/L pepton, 2 g/L

MgSO₄·7H₂O, 20 g/L muối biển, 5,0 mg/L H₃BO₃, 3,0 mg/L MnCl₂, 0,2 mg/L CuSO₄, 0,05 mg/L NaMoO₄·2H₂O, 0,05 mg/L CoSO₄, và 0.7 mg/L ZnSO₄·7H₂O), là môi trường trong đó vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae có thể sinh trưởng, và được ủ qua đêm trong bình dung tích 500 mL ở 28°C và ở tốc độ 180 vòng/phút. Môi trường nuôi cấy được thu hồi và ly tâm, và dịch nổi bề mặt được loại bỏ khỏi đó. Sản phẩm thu được còn lại được tạo huyền phù trong chất bảo quản đông khô được chuẩn bị trong Ví dụ 1-1 để tạo ra huyền phù chứa sinh khối vi tảo. Sau khi huyền phù chứa sinh khối được tạo ra được đặt trong lọ đông khô dạng ống (lọ FD), trong trường hợp của các Điều kiện 1-1 đến 1-3, việc làm đông lạnh sơ bộ được thực hiện trong các điều kiện như được thể hiện trong Bảng 1, và huyền phù không được làm đông lạnh sơ bộ, được điều chế như Điều kiện 1-4.

Bảng 1

Nhóm thí nghiệm	Điều kiện làm đông lạnh sơ bộ	
Điều kiện 1-1	Làm đông lạnh bình thường bằng cách sử dụng hỗn hợp làm đông lạnh	Huyền phù chứa sinh khối được làm đông lạnh sơ bộ bằng cách sử dụng hỗn hợp làm đông lạnh bao gồm 99% etanol và đá khô
Điều kiện 1-2	Làm đông lạnh nhẹ	Huyền phù chứa sinh khối được để ở 4°C trong 60 phút, sau đó ở -20°C trong 60 phút, và sau đó để ở -80°C trong 60 phút để thực hiện việc làm đông lạnh sơ bộ trong các điều kiện êm dịu.
Điều kiện 1-3	Làm đông lạnh nhẹ + Làm khô ở nhiệt độ trong phòng	Sau khi làm đông lạnh sơ bộ trong cùng các điều kiện như trong Điều kiện 1-2, việc làm khô được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng (25°C).
Điều kiện 1-4	Không làm đông lạnh sơ bộ	-

Các lọ đông khô của mỗi điều kiện được nối với thiết bị làm đông khô, và được làm đông khô trong các điều kiện duy trì nhiệt độ bằng -50°C hoặc thấp hơn và áp suất bằng 0,133 mba hoặc thấp hơn ở trạng thái chân không. Khi một lượng lớn các ống được nối với

thiết bị làm đông khô, áp suất của thiết bị được tăng và do đó tác động đến sự sinh trưởng của các tế bào đông khô. Theo đó, một ống được nối, và sau đó, sau khi áp suất của thiết bị được giảm đến 0,133 mba hoặc thấp hơn, ống tiếp theo được nối bổ sung vào đó. Sau khi tất cả các ống được nối với thiết bị, việc làm đông khô được thực hiện trong khoảng 3 giờ, và các ống đã được làm đông khô được bít kín bằng mỏ đốt hàn xì để có thể duy trì được điều kiện chân không.

Ví dụ 1-3. Xác nhận khả năng sống sót của các tế bào đông khô

Để xác nhận khả năng sống sót của các tế bào đông khô được chuẩn bị trong Ví dụ 1-2, mẫu sinh khối khô ở dạng bột được tạo huyền phù trong nước cất và dàn trải lên đĩa thạch GYEP, và sau đó mức sinh trưởng khuẩn lạc được kiểm tra bằng trực quan.

Kết quả là, như được thể hiện trên FIG. 1, trong trường hợp của sinh khối đông khô của các Điều kiện 1-1 đến 1-3 đã trải qua quy trình đông lạnh sơ bộ, các khuẩn lạc không được sinh trưởng hoặc tạo thành trên đĩa thạch, và chỉ trong trường hợp của Điều kiện 1-4 không trải qua quy trình đông lạnh sơ bộ, đã xác nhận được rằng sinh khối đông khô cho phép sinh trưởng và tạo thành khuẩn lạc trên đĩa thạch.

Ví dụ 2. Xác nhận khả năng sống sót của các tế bào đông khô theo các thành phần của chất bảo quản đông khô

Để đánh giá hiệu quả bảo quản đông khô theo các thành phần của chất bảo quản đông khô, như được thể hiện trong Bảng 2, cho mỗi điều kiện, 4 mL chất bảo quản đông khô chứa các thành phần tương ứng ở nồng độ cuối cùng được chỉ ra được điều chế.

Bảng 2

Nhóm thí nghiệm	Sữa tách béo (%)	Sucroza (%)	Trehaloza (%)	Metanol (%)	Pepton (%)	Glyxerol (%)	Natri Clorua (%)
Điều kiện 2-1	10	10	-	-	-	-	-
Điều kiện 2-2	10	-	10	-	-	-	-
Điều kiện 2-3	10	-	-	10	-	-	-
Điều kiện 2-4	-	-	10	-	5	-	-
Điều kiện 2-5	10	4	4	-	-	-	-

Điều kiện 2-6	6	8	-	-	-	-	4
Điều kiện 2-7	10	-	-	-	-	10	-

Phương pháp giống như được sử dụng trong Ví dụ 1-2 được sử dụng để điều chế huyền phù chứa sinh khối, tiếp theo là làm đông khô mà không cần quy trình làm đông lạnh sơ bộ, ngoại trừ là vi tảo *Schizochytrium* sp. CD01-5004 (Số truy nhập: KCTC14345BP) được cấy vào môi trường GYEP chứa 30 g/L glucoza, và chất bảo quản đông khô được điều chế trong chế phẩm của Bảng 2 được sử dụng.

Mẫu sinh khối khô ở dạng bột được tạo huyền phù trong nước cất và được pha loãng để mức hấp thụ (Mật độ quang: OD) ở 680 nm là 0,1. Dung dịch thu được được dàn trải với lượng là 1 mL lên đĩa thạch GYEP, và số lượng khuẩn lạc được tạo thành trong mỗi đĩa được đếm. Đối với mẫu đối chứng, không có việc tạo huyền phù một phần môi trường nuôi cấy tế bào được thu hồi trước khi điều chế huyền phù chứa sinh khối trong chất bảo quản đông khô, 1 mL dung dịch được hòa tan đến giá trị OD là 0,1 ở 680 nm được dàn trải lên đĩa thạch GYEP, và số lượng khuẩn lạc tạo thành được đếm. Do có 1×10^6 tế bào trong mỗi khuẩn lạc, số lượng tế bào sống sót trong 1 mL môi trường nuôi cấy được tính toán bằng cách nhân số lượng khuẩn lạc được tạo thành cho mỗi nhóm thí nghiệm với 10^6 , và khả năng sống sót của mỗi điều kiện được tính toán là phần trăm của nhóm đối chứng.

Bảng 3

Nhóm thí nghiệm	Số lượng khuẩn lạc được tạo thành	Số lượng tế bào sống	Khả năng sống sót
Đối chứng	1500	$1,5 \times 10^9$	100%
Điều kiện 2-1	20	$2,0 \times 10^7$	1,33%
Điều kiện 2-2	0	0	0%
Điều kiện 2-3	0	0	0%
Điều kiện 2-4	0	0	0%
Điều kiện 2-5	2	$2,0 \times 10^6$	0,13%
Điều kiện 2-6	250	$2,5 \times 10^8$	16,67%
Điều kiện 2-7	0	0	0%

Kết quả là, như được thể hiện trong Bảng 3, đã xác nhận được rằng các khuẩn lạc được tạo thành trong vòng 72 giờ sau khi dàn trải lên đĩa trong các điều kiện 2-1, 2-5, và 2-6. Các chất bảo quản đông khô được sử dụng trong các điều kiện này thường chứa từ 6 đến 10% sữa tách béo và 4 đến 10% sucroza, và đặc biệt là, trong Điều kiện 2-6 bằng cách sử dụng chất bảo quản đông khô chứa sữa tách béo, sucroza và natri clorua, khả năng sống sót cao đáng kể ở 16,67%.

Ví dụ 3. Xác nhận mức sinh trưởng của các tế bào đông khô theo tỷ lệ của các thành phần của chất bảo quản đông khô

Ví dụ 3-1. Xác nhận sự tạo thành khuẩn lạc trên đĩa thạch

Để đánh giá hiệu quả bảo quản đông khô theo tỷ lệ nồng độ của sữa tách béo, sucroza và natri clorua, là các thành phần bảo quản hiệu quả nhất thu được từ Ví dụ 2, như được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây, cho mỗi điều kiện, 4 mL chất bảo quản đông khô chứa các thành phần tương ứng ở nồng độ cuối cùng được chỉ ra được điều chế. Sau khi làm đông khô vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae theo cách giống như được mô tả trong Ví dụ 2 bằng cách sử dụng chất bảo quản đông khô cho mỗi điều kiện, số lượng khuẩn lạc tạo thành được đếm bằng cách tạo huyền phù trong nước cất và dàn trải chúng lên đĩa thạch GYEP. Trong các nhóm điều kiện trong đó các khuẩn lạc được tạo thành, sự tạo thành khuẩn lạc được xác nhận bằng trực quan từ 24 giờ sau khi dàn trải, và sự có mặt hoặc không có mặt của mức sống sót của tế bào và mức độ tạo thành khuẩn lạc có thể được phân biệt rõ ràng từ 40 giờ.

Bảng 4

Nhóm thí nghiệm	Sữa tách béo (%)	Sucroza (%)	Natri clorua (%)	Số lượng khuẩn lạc
Điều kiện 3-1	6	8	4	30
Điều kiện 3-2	-	10	5	32
Điều kiện 3-3	4	8	8	34
Điều kiện 3-4	10	-	-	0
Điều kiện 3-5	5	-	5	0

Kết quả là, như được thể hiện trên FIG. 2 và Bảng 4, khuẩn lạc không được tạo thành trong Điều kiện 3-4 bằng cách sử dụng chất bảo quản chứa sữa tách béo 10% một mình, và Điều kiện 3-5 bằng cách sử dụng chất bảo quản chứa sữa tách béo 5% và natri clorua 5%, và trong các điều kiện khác thì sự tạo thành khuẩn lạc được xác nhận.

Ví dụ 3-2. Xác nhận sự sinh trưởng tế bào trong các bình nuôi cấy

Đối với các tế bào đông khô của các Điều kiện 3-1 đến 3-3 trong đó sự tạo thành khuẩn lạc được xác nhận trong Ví dụ 3-1, mức sinh trưởng tế bào trong bình chứa môi trường nuôi cấy được đo.

Cụ thể, môi trường GYEP chứa 30 g/L glucoza được đặt trong bình dung tích 500 mL, và sinh khối đông khô của các Điều kiện 3-1 đến 3-3 được cấy vào đó và được nuôi cấy ở 28°C và ở tốc độ 180 vòng/phút. Môi trường nuôi cấy của mỗi điều kiện được lấy cho mỗi lần nuôi cấy, và giá trị OD được đo ở 680 nm bằng cách sử dụng quang phổ kế để xác nhận mức sinh trưởng của tế bào.

Kết quả là, như được thể hiện trên FIG. 3, các tế bào đông khô của các Điều kiện 3-1 đến 3-3 đã cho thấy mức tăng về giá trị OD thông qua sự sinh trưởng tế bào trên quy mô đầy đủ từ khoảng 12 giờ sau khi nuôi cấy, và mức sinh trưởng tương tự trong tất cả các nhóm điều kiện.

Ví dụ 4. Xác nhận khả năng ổn định bảo quản của các mẫu đông khô theo tỷ lệ của các thành phần của chất bảo quản đông khô

Sau khi bảo quản sinh khối đông khô của các Điều kiện 3-1 đến 3-3 được chuẩn bị trong Ví dụ 3-1 ở nhiệt độ trong phòng trong 7 ngày trong lọ đông khô, sinh khối được nuôi cấy trong bình bằng cách sử dụng phương pháp giống như được mô tả trong Ví dụ 3-2, và mức sinh trưởng của tế bào được xác nhận bằng cách đo mức hấp thụ cho mỗi lần nuôi cấy.

Kết quả là, như được thể hiện trên FIG. 4, đã xác nhận được rằng có sự sai khác về mức sinh trưởng tế bào giữa các điều kiện. Cụ thể, Điều kiện 3-3 đã thể hiện tốc độ sinh trưởng nhanh nhất, Điều kiện 3-1 đã cho thấy sự sinh trưởng hơi chậm, và Điều kiện 3-2 đã không cho thấy sự sinh trưởng tế bào cho đến 40 giờ sau khi nuôi cấy.

Ví dụ 5. Khả năng ổn định bảo quản lâu dài của các mẫu sinh khối đông khô

Để xác nhận khả năng ổn định bảo quản lâu dài của các mẫu sinh khối đông khô, chất bảo quản đông khô chứa sữa tách béo 4%, sucroza 8% và natri clorua 8%, mà có cùng thành phần chất bảo quản đông khô như trong Điều kiện 3-3 của Ví dụ 3-1, được điều chế, và sau đó, vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae được làm đông khô theo cách giống như được mô tả trong Ví dụ 2. Sinh khối đông khô đã tạo ra được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong 12 tuần (84 ngày), sau đó được tạo huyền phù trong nước cất và dần trải lên đĩa thạch GYEP để đếm số lượng khuẩn lạc được tạo thành.

Kết quả là, như được thể hiện trên FIG. 5, khoảng 47 các khuẩn lạc được tạo thành trong mẫu pha loãng 10^{-2} lần, và đã phát hiện ra rằng số lượng tế bào sống sót trong 1 mL môi trường nuôi cấy là khoảng $4,7 \times 10^9$. Do đó, đã xác nhận được rằng sinh khối đông khô được sản xuất bằng cách sử dụng chất bảo quản đông khô theo sáng chế đã đảm bảo số lượng tế bào sống sót trong một lượng nhất định hoặc thậm chí nhiều hơn khi được bảo quản trong ít nhất 12 tuần.

Từ phần mô tả trên đây, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế liên quan sẽ có thể hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không làm thay đổi ý nghĩa về mặt kỹ thuật hoặc dấu hiệu cơ bản của sáng chế. Về vấn đề này, cần hiểu rằng các phương án được mô tả trên đây được cung cấp chỉ nhằm mục đích minh họa trong tất cả các khía cạnh và không giới hạn phạm vi của sáng chế. Phạm vi của sáng chế nên được hiểu là bao gồm tất cả các thay đổi hoặc cải biến bắt nguồn từ nghĩa và phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ được mô tả dưới đây và các khái niệm tương đương của chúng, thay vì chỉ giới hạn ở phần mô tả chi tiết trên đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, chế phẩm này chứa: sữa tách béo, sucroza, và natri clorua.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa sữa tách béo với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% khối lượng đến 20% khối lượng tính theo tổng khối lượng của chế phẩm.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 1% khối lượng đến 20% khối lượng tính theo tổng khối lượng của chế phẩm.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% khối lượng đến 10% khối lượng tính theo tổng khối lượng của chế phẩm.
5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa sữa tách béo và sucroza với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa sữa tách béo và natri clorua với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10.
7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae bao gồm ít nhất một loại được chọn từ *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp., *Thraustochytriidae* sp., *Japonochytrium* sp., *Monorhizochytrium* sp., *Sicyoidochytrium* sp., *Ulkenia* sp., *Parietichytrium* sp., *Botryochytrium* sp., *Hondaea* sp., và *Labyrinthulochytrium* sp..
8. Phương pháp bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, phương pháp này bao gồm các bước:
 - 1) nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae trong môi trường chứa chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae theo điểm 1;

- 2) thu hồi sản phẩm đã nuôi cấy của bước 1); và
- 3) làm đông khô sản phẩm nuôi cấy đã thu hồi để tạo ra sinh khối.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó việc làm đông lạnh vi tảo không được thực hiện cả trước và sau bước 3.

10. Phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, phương pháp này bao gồm các bước:

- 1) nuôi cấy vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae trong môi trường chứa chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae theo điểm 1;
- 2) thu hồi sản phẩm đã nuôi cấy của bước 1); và
- 3) làm đông khô sản phẩm nuôi cấy đã thu hồi để tạo ra sinh khối.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó việc làm đông lạnh vi tảo không được thực hiện cả trước và sau bước 3.

12. Sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, sinh khối đông khô này bao gồm:

- a) chế phẩm để bảo quản đông lạnh vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae, chế phẩm này chứa: sữa tách béo; sucroza; và natri clorua; và
- b) vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae,
trong đó sinh khối đông khô được sản xuất bằng phương pháp sản xuất sinh khối đông khô của vi tảo thuộc họ Thraustochytriaceae theo điểm 10.

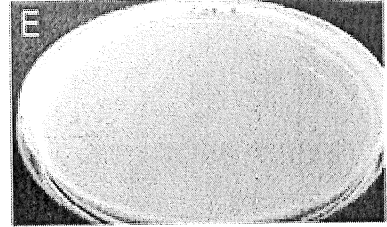
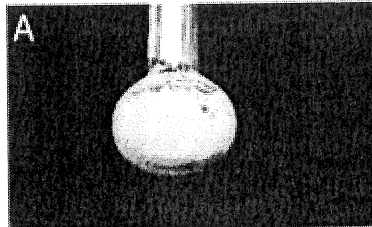
13. Sinh khối đông khô theo điểm 12, trong đó sinh khối đông khô có thể được bảo quản trong ít nhất 12 tuần ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 25°C.

14. Sinh khối đông khô theo điểm 13, trong đó sinh khối đông khô chứa $1,0 \times 10^7$ đến $1,0 \times 10^{12}$ tế bào sống trong 1 mL sinh khối đông khô sau khi bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 25°C trong ít nhất 12 tuần.

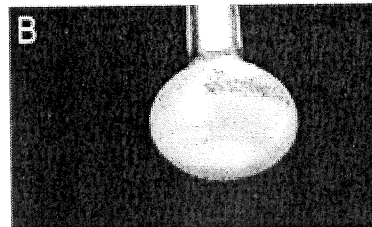
HÌNH VẼ

【FIG. 1】

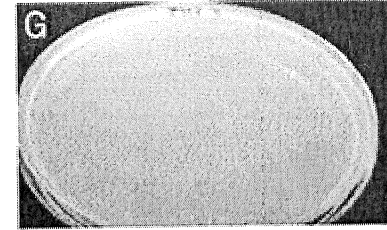
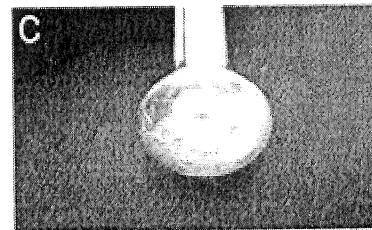
Điều kiện 1-1



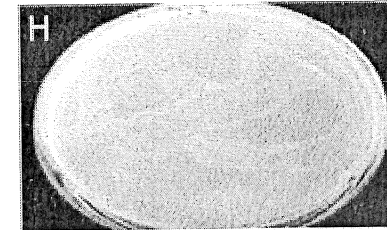
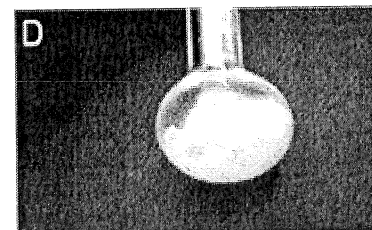
Điều kiện 1-2



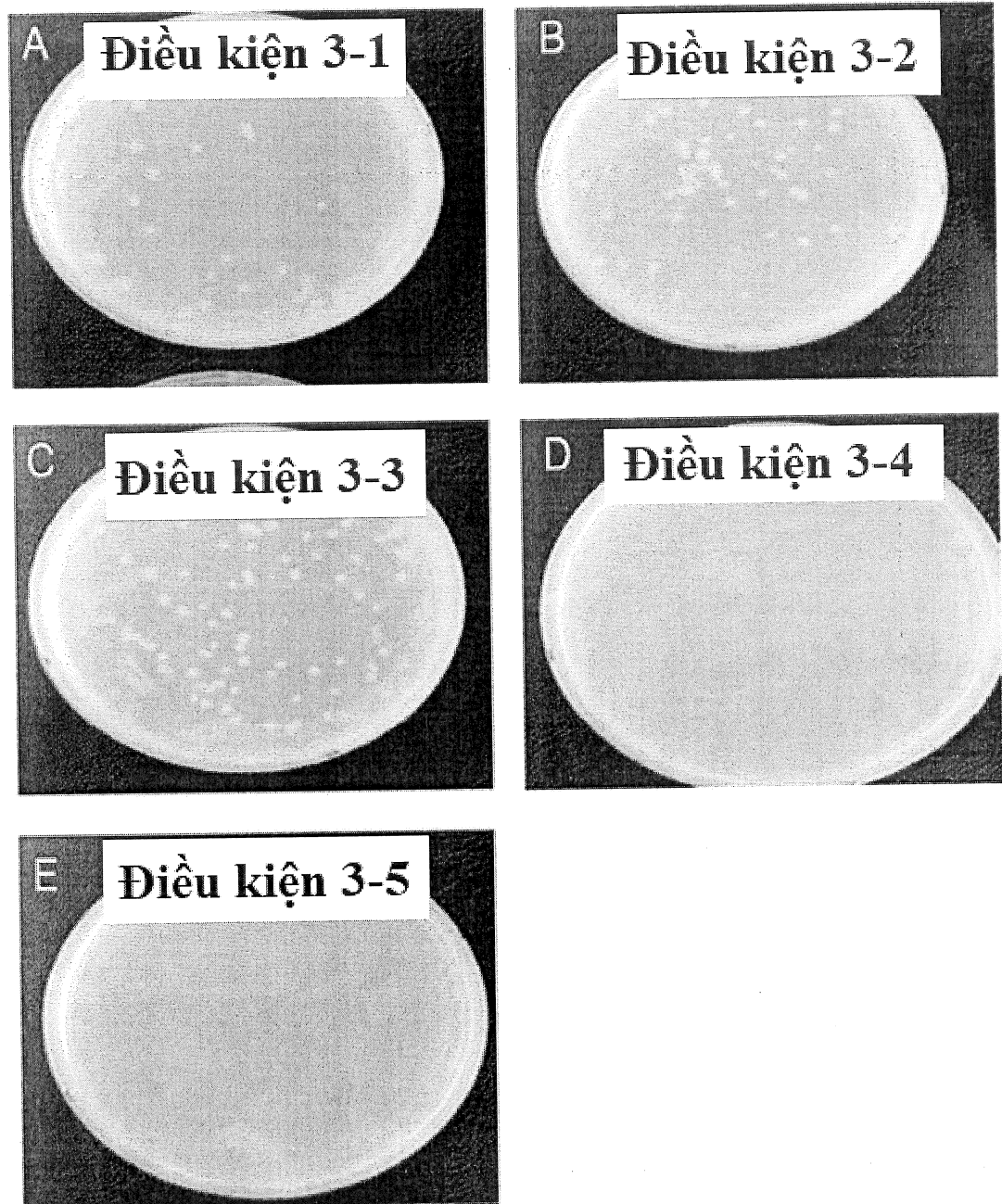
Điều kiện 1-3



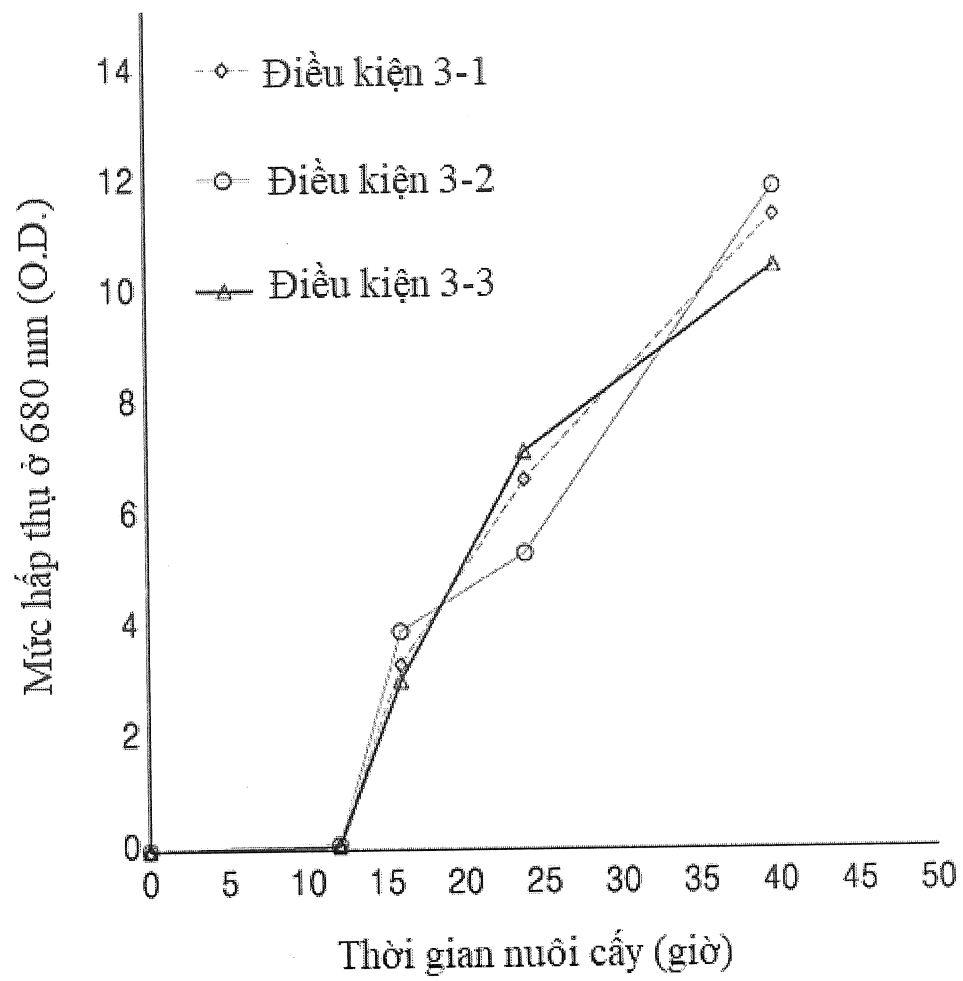
Điều kiện 1-4



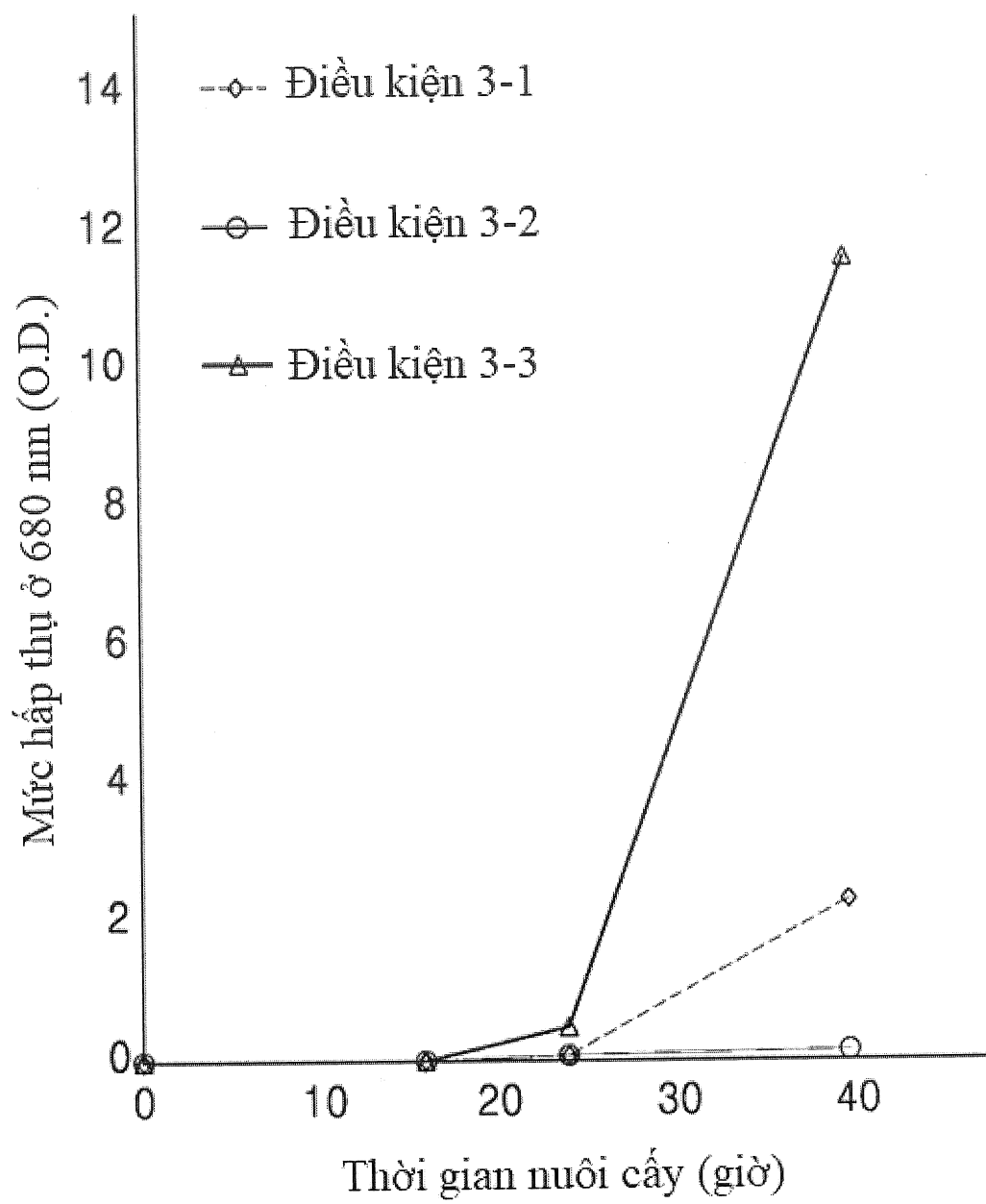
【FIG. 2】



【FIG. 3】



【FIG. 4】



【FIG. 5】

