



(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)



1-0024751

(51)⁷ C12N 1/12; C12P 21/00; C12P 19/04

(13) B

(21) 1-2015-03567

(22) 24/03/2014

(86) PCT/JP2014/058063 24/03/2014

(87) WO2014/157077 02/10/2014

(30) 2013-067558 27/03/2013 JP

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/01/2016 334A

(73) KOBELCO ECO-SOLUTIONS CO., LTD. (JP)

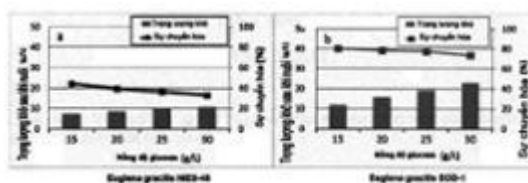
4-78, Wakinohama-cho 1-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-0072 Japan

(72) WATANABE, Makoto (JP); DEMURA, Mikihide (JP); KAWACHI, Masanobu (JP); SATO, Natsuki (JP); AKASHI, Akira (JP); TAKEZAKI, Jun (JP); HAMADA, Takeshi (JP); TAKAHASHI, Madoka (JP); OHIRAKI, Kenji (JP).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ HA VIP (HAVIP CO., LTD.)

(54) VI TẢO THUỘC GIỐNG EUGLENA, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
POLYSACARIT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HỢP CHẤT HỮU CƠ

(57) Sáng chế đề cập đến vi tảo thuộc giống *Euglena* là chủng *Euglena gracilis* EOD-1 (Số hiệu nộp lưu FERM BP-11530) hoặc chủng đột biến của chúng có khả năng sản xuất ít nhất là polysacarit. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất polysacarit bao gồm bước: nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena* là chủng *Euglena gracilis* EOD-1 (Số hiệu nộp lưu FERM BP-11530) hoặc chủng đột biến của chúng có khả năng sản xuất ít nhất là polysacarit như các sinh vật sản xuất polysacarit để sản xuất polysacarit. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ bao gồm bước: nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena* là chủng *Euglena gracilis* EOD-1 (Số hiệu nộp lưu FERM BP-11530) hoặc chủng đột biến của chúng có khả năng sản xuất ít nhất là polysacarit để sản xuất ít nhất một hợp chất hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm polysacarit, chất béo, vitamin C, vitamin E, chất sắc tố và protein.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi tảo thuộc giống *Euglena*, phương pháp sản xuất polysacarit và phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi tảo thuộc giống *Euglena* còn được gọi là *Euglena*, được biết đến như một loài vi sinh vật sản xuất polysacarit chẳng hạn paramylum hoặc các chất tương tự khi được nuôi.

Thông thường, các loại vi tảo khác nhau thuộc giống *Euglena* đã được biết đến. Ví dụ, chủng *Euglena gracilis* NIES-48 đã được biết đến (Tài liệu Sáng chế 1).

Vi tảo thuộc giống *Euglena* này sản xuất polysacarit chẳng hạn paramylum khi được nuôi, và lưu trữ polysacarit này trong tế bào của chúng.

Hơn nữa, vi tảo thuộc giống *Euglena* có thể chuyển hóa polysacarit được lưu trữ này thành este sáp hoặc còn có thể tạo ra protein trong khi sản xuất polysacarit, phụ thuộc vào điều kiện nuôi. Sau đó, hợp chất hữu cơ chẳng hạn polysacarit, các chất béo và các protein được sản xuất và lưu trữ trong tế bào của vi tảo có thể được dùng trong các ứng dụng chẳng hạn làm nhiên liệu hoặc thực phẩm.

Tuy nhiên, vi tảo thuộc giống *Euglena* có một vấn đề đó là hiệu suất sản xuất hợp chất hữu cơ chẳng hạn polysacarit không nhất thiết hiệu quả.

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu Sáng chế 1: JP H07-070207 A

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Theo từ vấn đề kỹ thuật được đề cập trên đây và các vấn đề khác, mục đích của sáng chế là đề xuất vi tảo thuộc giống *Euglena*, vi tảo này có ít nhất một khả năng sản xuất hiệu quả polysacarit. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất polysacarit, cho phép thu được polysacarit một cách hiệu quả. Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ, cho phép thu được một cách hiệu quả ít nhất một hợp chất hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm polysacarit, chất béo, vitamin C, vitamin E, chất sắc tố và protein.

Giải pháp kỹ thuật

Để giải quyết vấn đề nêu trên, sáng chế đề xuất vi tảo thuộc giống *Euglena* theo sáng chế khác biệt ở chỗ là *Chủng Euglena gracilis* EOD-1 (Số hiệu nộp lưu FERM BP-11530) hoặc chủng đột biến của chúng, có khả năng sản xuất ít nhất là polysacarit.

Phương pháp để sản xuất polysacarit theo sáng chế khác biệt ở chỗ bằng cách nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena* thuộc *Chủng Euglena gracilis* EOD-1 (Số hiệu nộp lưu FERM BP-11530) hoặc chủng đột biến của chúng có khả năng sản xuất ít nhất là polysacarit như sinh vật sản xuất polysacarit để sản xuất polysacarit.

Theo một phương án của phương pháp sản xuất polysacarit theo sáng chế, canh trường được dùng trong việc nuôi vi tảo chứa từ 15 đến 30 g/L glucoza.

Theo một phương án của phương pháp sản xuất polysacarit theo sáng chế, canh trường được dùng trong việc nuôi vi tảo chứa dịch thủy phân nấm men.

Theo một phương án khác nữa của phương pháp sản xuất polysacarit theo sáng chế là, canh trường được dùng trong việc nuôi vi tảo có thành phần môi trường nuôi AF6.

Theo một phương án khác nữa phương pháp sản xuất polysacarit theo sáng chế, polysacarit có thể là paramylum.

Phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ theo sáng chế khác biệt ở chỗ bằng cách nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena* là *chủng Euglena gracilis* EOD-1 (Số hiệu nộp lưu FERM BP-11530) hoặc chủng đột biến của chúng, có khả năng sản xuất ít nhất là

polysacarit để sản xuất ít nhất một hợp chất hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm polysacarit, chất béo, vitamin C, vitamin E, chất sắc tố và protein.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là bảng so sánh trình tự bazơ của gen mã hóa rARN 18S của *Euglena gracilis*.

Fig.2 là cây phát sinh loài được xây dựng bằng cách dùng gen mã hóa rARN 18S.

Fig.3A là ảnh chụp thể hiện băng mẫu trong phân tích RAPD.

Fig.3B là ảnh chụp thể hiện băng mẫu trong phân tích RAPD.

Fig.3C là ảnh chụp thể hiện băng mẫu trong phân tích RAPD.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện sự chuyển hóa glucoza của vi tảo và trọng lượng khô của vi tảo khi nuôi dị dưỡng.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện thời gian nuôi vi tảo và trọng lượng khô của vi tảo khi nuôi quang dị dưỡng.

Fig.6 là biểu đồ thể hiện thời gian nuôi vi tảo và trọng lượng khô của vi tảo khi nuôi quang dị dưỡng bằng cách sử dụng các môi trường nuôi có các điều kiện độ pH khác nhau.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện thời gian nuôi vi tảo và trọng lượng khô của vi tảo khi nuôi quang dị dưỡng bằng cách sử dụng các môi trường nuôi có các điều kiện độ pH khác nhau.

Fig.8A là biểu đồ thể hiện thời gian nuôi vi tảo và hàm lượng paramylum trên mỗi tế bào khi điều kiện thay đổi từ ưa khí sang kỵ khí khi nuôi quang dị dưỡng.

Fig.8B là biểu đồ thể hiện thời gian nuôi vi tảo và lượng paramylum trên canh trường khi điều kiện thay đổi từ ưa khí sang kỵ khí khi nuôi quang dị dưỡng.

Fig.9A là biểu đồ thể hiện thời gian nuôi vi tảo và hàm lượng chất béo trên mỗi tế bào khi điều kiện thay đổi từ ưa khí sang kỵ khí khi nuôi quang dị dưỡng.

Fig.9B là biểu đồ thể hiện thời gian nuôi vi tảo và lượng chất béo trên canh trường khi điều kiện thay đổi từ ưa khí sang kỵ khí khi nuôi quang dị dưỡng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, phương án về vi tảo thuộc giống *Euglena* theo sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết.

Vi tảo thuộc giống *Euglena* theo phương án này của sáng chế (sau đây được gọi tắt là vi tảo thuộc giống *Euglena* hoặc vi tảo) là chủng *Euglena gracilis* EOD-1 (Số hiệu nộp lưu FERM BP-11530) hoặc chủng đột biến của chúng, có khả năng sản xuất ít nhất polysacarit.

Vi tảo thuộc giống *Euglena* theo phương án sáng chế có hiệu quả cho phép ít nhất polysacarit được sản xuất một cách hiệu quả.

Vi tảo thuộc giống *Euglena* là các sinh vật sống trôi nổi trong nước. Hơn nữa, vi tảo thuộc giống *Euglena* là vi tảo đơn bào có kích cỡ nằm trong khoảng từ 10 μm đến 50 μm , kích cỡ khác nhau phụ thuộc vào các chủng.

Đặc tính của vi tảo thuộc giống *Euglena* được mô tả chi tiết dưới đây.

Đặc tính hình thái của vi tảo thuộc giống *Euglena*.

Tế bào thực vật của vi tảo thuộc giống *Euglena* có lông roi và chuyển động linh hoạt. Hơn nữa, mỗi tế bào hầu hết có dạng hình thoi. Tế bào bao gồm cơ quan tế bào màu đỏ, được gọi là điểm mắt bên cạnh các cơ quan tế bào thông thường như nhân, lục lạp và ty thể.

Đặc tính sinh lý học hoặc hóa sinh của vi tảo thuộc giống *Euglena*.

(1) Môi trường nuôi: canh chủ yếu bao gồm nước ngọt có thể được dùng cho sự sinh trưởng (chất hữu cơ có nguồn gốc từ nước thải cũng có thể được dùng cho sự sinh trưởng).

(2) Khả năng quang hợp: có khả năng sinh trưởng quang tự dưỡng bằng cách quang hợp.

(3) Chứa các chất sắc tố: chứa diệp lục a, diệp lục b và các nhóm chất carotenoid khác.

(4) Chất dự trữ đồng hóa: protein, chất béo (este sáp) và polysacarit (paramylum).

(5) Khoảng nhiệt độ sinh trưởng: 15°C đến 35°C (nhiệt độ tối ưu: 25°C)

(6) Khoảng độ pH phù hợp cho sự sinh trưởng: độ pH từ 3,5 đến 5,5 (tuy nhiên có thể sinh trưởng ở ngoài ngoài khoảng độ pH nêu trên)

Thông tin về nguồn gốc của vi tảo thuộc giống *Euglena*.

Vi tảo thuộc giống *Euglena* có rADN 18S (gen mã hóa rARN 18S) có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 1.

Gen rARN 18S có thể được phân tích bằng phương pháp thông thường như phương pháp nhận dạng vi tảo. Cụ thể, gen rARN 18S có thể được phân tích, ví dụ, bằng phương pháp được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Trình tự bazơ của gen rARN 18S của vi tảo thuộc giống *Euglena* có thể được so sánh với trình tự bazơ của gen rARN 18S của vi tảo đã được biết đến thuộc giống *Euglena* thu được từ GenBank bằng cách dùng công cụ tìm kiếm tương đồng BLAST. Kết quả của việc so sánh với vi tảo đã được biết đến thuộc giống *Euglena* dựa trên độ tương đồng trình tự sẽ được thể hiện trong các ví dụ dưới đây.

Như cơ sở dữ liệu, EMBL và DDBJ cũng có thể được dùng.

Hơn nữa, cây phát sinh loài phân tử có thể được xây dựng bằng cách dùng chương trình phần mềm vẽ cây phát sinh loài phân tử Mega 5 (Tamura et al., 2011, Mol. Biol. Evol. 28:2731-2739) bằng phương pháp hợp lý nhất. Cây phát sinh loài phân tử xây dựng được sẽ được thể hiện chi tiết trong các ví dụ dưới đây.

Dùng kỹ thuật nêu trên, vi tảo được đề cập ở trên thuộc giống *Euglena* được nhận biết từ các kết quả được mô tả sau đây trong các ví dụ là *Euglena gracilis* và được gọi là chủng *Euglena gracilis* EOD-1.

Chủng Euglena gracilis EOD-1 được nộp lưu quốc tế tại Patent Organism Depositary, National Institute of Technology and Evaluation (NITE-IPOD: 2-5-8-120 Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818 Japan) vào ngày 28/6/2013 (ngày nộp lưu gốc: 25/3/2013) với số hiệu nộp lưu FERM BP-11530 theo điều khoản của Hiệp ước Budapest.

Như nêu trên, trong tế bào của vi tảo thuộc giống *Euglena* có lục lạp, do đó có thể sinh trưởng bằng cách quang hợp. Tức là, vi tảo thuộc giống *Euglena* là sinh vật quang tự dưỡng.

Hơn nữa, vi tảo thuộc giống *Euglena* còn có thể sinh trưởng bằng các chất dinh dưỡng hữu cơ chẳng hạn dùng glucoza làm chất dinh dưỡng của chúng. Tức là, vi tảo thuộc giống *Euglena* cũng là sinh vật dị dưỡng.

Theo cách này, vi tảo thuộc giống *Euglena* chỉ có thể sinh trưởng bởi quá trình quang tự dưỡng, chỉ có thể sinh trưởng bởi quá trình dị dưỡng, hoặc có thể sinh trưởng bởi đồng thời quá trình quang tự dưỡng và quá trình dị dưỡng.

Ví dụ, chủng đột biến được sản xuất bằng cách áp dụng quy trình đột biến thông thường, sự thích ứng bởi quá trình nuôi cấy cấp hai hoặc sự đột biến tự nhiên.

Quá trình đột biến có thể được thực hiện bằng cách dùng tác nhân gây đột biến thông thường. Các ví dụ về tác nhân gây đột biến bao gồm thuốc có tính hoạt động gây đột biến và tia cực tím. Các ví dụ về thuốc có hoạt tính gây đột biến bao gồm nucleotide cơ bản tương tự chẳng hạn streptomycin, ofloxacin, etyl metan sulfonat, N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, bromouraxil và acridin.

Tiếp theo, một phương án về phương pháp sản xuất polysacarit theo sáng chế được mô tả.

Theo phương án của sáng chế về phương pháp sản xuất polysacarit, ít nhất polysacarit được sản xuất bởi quá trình nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena*.

Phương pháp sản xuất polysacarit theo phương án của sáng chế có hiệu quả trong việc cho phép thu được polysacarit một cách hiệu quả.

Cụ thể, phương pháp sản xuất polysacarit theo phương án của sáng chế bao gồm bước nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena* trong canh chứa ít nhất nước.

Tốt hơn là canh trường chứa nước và chất dinh dưỡng giúp thúc đẩy sự sinh trưởng của vi tảo.

Các ví dụ về chất dinh dưỡng này bao gồm chất dinh dưỡng vô cơ và chất dinh dưỡng hữu cơ.

Các ví dụ về chất dinh dưỡng vô cơ bao gồm các hợp chất vô cơ chứa nitơ và các hợp chất vô cơ chứa phospho. Hơn nữa, ví dụ về các chất dinh dưỡng vô cơ bao gồm ion kali, ion sắt, ion mangan, ion coban, ion kẽm, ion đồng, ion molybden và ion niken.

Nói chung, nồng độ của các chất dinh dưỡng vô cơ trong canh trường là khoảng nồng độ thông thường đã được biết đến.

Các ví dụ về chất dinh dưỡng hữu cơ bao gồm monosacarit chẳng hạn glucoza và fructoza, các vitamin chẳng hạn vitamin B6 và B12, axit amin chẳng hạn arginin, axit aspartic, axit glutamic, glyxin, và histidin, các axit hữu cơ chẳng hạn axit malic, axit xitric, axit succinic và axit axetic, rượu chẳng hạn etanol.

Ví dụ về thành phần canh trường được sử dụng bao gồm thành phần “môi trường nuôi AF-6”, thành phần “môi trường nuôi Cramer Myers”, thành phần “môi trường nuôi Hutner”, mà sẽ được mô tả dưới đây, hoặc thành phần tương tự với thành phần này.

Ở bước nuôi, tốt hơn là canh trường chứa 15-30 g/L glucoza làm nguồn cacbon. Hơn nữa, tốt hơn là canh trường này chứa dịch thủy phân nấm men (dịch thủy phân nấm men sẽ được mô tả dưới đây). Hơn nữa, tốt hơn là canh trường này có thành phần môi trường nuôi AF6.

Ví dụ, bước nuôi này có thể được tiến hành trong dung dịch chứa thành phần canh trường nêu trên và vi tảo.

Ở bước nuôi này, việc quang hợp của vi tảo có thể diễn ra bởi việc chiếu ánh sáng vào vi tảo. Tức là, phương pháp nuôi bằng quang tự dưỡng có thể được thực hiện ở bước nuôi này.

Khi vi tảo được chiếu bằng đèn ở bước nuôi này, vi tảo đưa cacbon dioxit vào trong tế bào của chúng nhờ sự quang hợp, và có thể sinh trưởng đồng thời tạo ra ít nhất một polysacarit chẳng hạn paramylum. Hơn nữa, vi tảo có thể sinh trưởng đồng thời tạo ra protein và các chất chuyển hóa thứ cấp chẳng hạn chất béo, chất sắc tố, và vitamin.

Ánh sáng được chiếu vào vi tảo ở bước nuôi này không bị giới hạn cụ thể, miễn là ánh sáng tạo ra sự quang hợp của vi tảo. Ánh sáng tự nhiên từ mặt trời hay ánh sáng nhân tạo chẳng hạn đèn chiếu sáng được sử dụng làm ánh sáng.

Cường độ chiếu sáng đèn ở bước nuôi bằng quang tự dưỡng không bị giới hạn cụ thể, nhưng thông thường nằm trong khoảng từ từ $50\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ đến $200\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$.

Ở bước nuôi, thời gian vi tảo được chiếu ánh sáng và thời gian vi tảo không được chiếu ánh sáng có thể được lặp lại lần lượt.

Tức là, thời gian thực hiện phương pháp nuôi quang tự dưỡng và thời gian không thực hiện phương pháp nuôi quang tự dưỡng có thể lặp lại lần lượt ở bước nuôi.

Thông thường, khoảng thời gian chiếu sáng đèn ở bước nuôi là 8-15 giờ, tương đương với khoảng thời gian ánh sáng mặt trời chiếu vào ban ngày. Hơn nữa, thông thường, khoảng thời gian trong điều kiện bóng tối mà không thực hiện việc chiếu ánh sáng để ngăn cản quá trình quang hợp của vi tảo là 9-16 giờ, tương đương với khoảng thời gian ánh sáng mặt trời không chiếu vào ban đêm. Các khoảng thời gian này có thể được thay đổi tùy thuộc vào tình hình hoặc mục đích.

Điều kiện bóng tối trong đó không thực hiện việc chiếu ánh sáng là điều kiện mà mật độ dòng photon hữu hiệu cho quang hợp (PPFD) là $50\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ hoặc ít hơn.

Trong khi đó, phương pháp nuôi dị dưỡng có thể được tiến hành ở bước nuôi, trong đó vi tảo được nuôi bằng các chất dinh dưỡng hữu cơ bao gồm các chất dinh dưỡng được đề cập ở trên. Khi vi tảo được nuôi bằng các chất dinh dưỡng hữu cơ ở bước nuôi, vi tảo đưa chất dinh dưỡng hữu cơ vào trong tế bào của chúng, và có thể sinh trưởng trong khi sản xuất ít nhất polysacarit chẳng hạn paramylum.

Tức là, có thể thực hiện ít nhất một trong hai phương pháp nuôi quang tự dưỡng và phương pháp nuôi dị dưỡng ở bước nuôi.

Tốt hơn là thực hiện cả hai phương pháp nuôi quang tự dưỡng và phương pháp nuôi dị dưỡng vào cùng một thời điểm ở bước nuôi, nhờ đó sự sinh trưởng của vi tảo có thể được thúc đẩy hơn. Tức là ưu tiên thực hiện phương pháp nuôi quang dị dưỡng ở bước nuôi.

Tốt hơn là sử dụng rượu chẳng hạn etanol, monosacarit chẳng hạn glucoza và fructoza, hoặc nước thải chứa các thành phần mà vi tảo thuộc giống *Euglena* có thể dùng làm các chất dinh dưỡng hữu cơ được dùng trong phương pháp nuôi dị dưỡng và phương pháp nuôi quang dị dưỡng. Hơn nữa, tốt hơn là nấm men hoặc dịch thủy phân nấm men (sau đây được gọi là dịch chiết nấm men) được sử dụng kết hợp với chất dinh dưỡng hữu cơ, nhờ đó sự sinh trưởng của vi tảo thuộc giống *Euglena* chắc chắn có thể được thúc đẩy hơn.

Các ví dụ về nguyên liệu chứa ít nhất một phần chất dinh dưỡng hữu cơ nêu trên bao gồm đồ uống pha chế, đồ uống chưng cất, bã rượu sake, bã rượu sochu, mật đường và mật mía đen. Các đồ uống có cồn này có thể được dùng làm nguồn cung cấp các chất dinh dưỡng hữu cơ trong phương pháp nuôi dị dưỡng và phương pháp nuôi quang dị dưỡng.

Các đồ uống pha chế được sản xuất bởi quá trình lên men rượu bằng nấm men từ các nguyên liệu thô chứa hàm lượng đường cùng men bia, và không được chưng cất.

Các đồ uống pha chế không được chưng cất, chứa chất chuyển hóa của quá trình lên men rượu bằng nấm men. Do đó, các đồ uống này chứa các chất dinh dưỡng bao gồm saccarit chẳng hạn glucoza được tạo ra bởi men bia, protein, axit amin, vitamin, phospho, và kali, ngoài etanol và nước.

Các ví dụ về các đồ uống pha chế bao gồm bia, rượu sake, rượu vang, đồ uống pha chế dùng các loại ngũ cốc làm nguyên liệu thô, đồ uống pha chế dùng các loại đậu làm nguyên liệu thô, đồ uống pha chế dùng khoai tây làm nguyên liệu thô, và đồ uống pha chế dùng đường làm nguyên liệu thô.

Bia được sản xuất bằng sự hóa đường của paramylum trong mạch nha cùng enzym để sản xuất đường và tiếp tục quá trình lên men rượu của đường bằng nấm men bia. Tức là, các sản phẩm bao gồm bia trong mô tả này vẫn sử dụng các nguyên liệu thô, miễn là chúng được sản xuất như nêu trên bằng cách dùng ít nhất mạch nha làm nguyên liệu thô.

Như mạch nha, thông thường mạch nha đại mạch được sử dụng.

Rượu sake (sake Nhật Bản) được sản xuất bằng cách đường hóa paramylum trong gạo nhờ mạch nha lúa, theo cách đó đường sẽ được tạo ra, và tiếp tục quá trình lên men rượu của đường nhờ nấm men.

Rượu vang được sản xuất bằng quá trình lên men rượu ít nhất từ nước ép nho nhờ nấm men.

Các ví dụ về nấm men bao gồm các sinh vật thuộc giống *Saccharomyces*, cụ thể, *Saccharomyces cerevisiae*.

Hơn nữa, các ví dụ về nấm men bao gồm nấm men sake, nấm men rượu vang và nấm men bia.

Các ví dụ về dịch thủy phân nấm men (dịch chiết nấm men) bao gồm thể tự phân giải nấm men được tạo ra bởi sự tự phân của nấm men, thành tế bào của nấm men bị phá vỡ khi tiếp xúc với nước nóng, và thành tế bào của nấm men bị phá vỡ do enzym.

Ở bước nuôi, canh trường có thể được cấp khí chứa oxi để duy trì quá trình hô hấp oxi của vi tảo. Hơn nữa, ở bước nuôi này, canh trường có thể được cấp khí chứa cacbon dioxid để thúc đẩy quá trình quang hợp của vi tảo.

Ví dụ, các khí này được cung cấp bằng cách sục khí vào canh trường hoặc khuấy canh trường.

Cụ thể, ở bước nuôi, canh trường có thể được sục khí để cung cấp oxi cho quá trình hô hấp của vi tảo. Hơn nữa, ở bước nuôi, canh trường có thể được sục khí xả chứa một lượng tương đối lớn khí cacbon dioxid để thúc đẩy quá trình quang hợp của vi tảo.

Ở bước nuôi, tốt hơn là phương pháp nuôi quang tự dưỡng và phương pháp nuôi dị dưỡng được thực hiện vào cùng một thời điểm, trong khi khí oxi và cacbon dioxit được cung cấp vào canh trường bằng cách sục khí. Tức là, ở bước nuôi, tốt hơn là phương pháp nuôi quang dị dưỡng được thực hiện bằng cách chiếu ánh sáng và phương pháp nuôi dị dưỡng được thực hiện dưới sự có mặt của các chất dinh dưỡng hữu cơ, đồng thời, trong khi đó khí chứa cả khí oxi và cacbon dioxit được cung cấp vào trong canh trường bằng cách sục khí hoặc cách tương tự để thúc đẩy quá trình hô hấp bằng oxi và quá trình quang hợp của vi tảo.

Ở bước nuôi, quá trình quang hợp của vi tảo có thể được thúc đẩy bằng cách cung cấp khí cacbon dioxit vào trong canh trường, trong khi tảo được chiếu ánh sáng vào ban ngày. Hơn nữa, phương pháp nuôi dị dưỡng có thể được thực hiện bằng cách cung cấp không khí vào trong canh trường cùng sự có mặt của các chất dinh dưỡng hữu cơ vào ban đêm khi vi tảo không được chiếu ánh sáng.

Thực hiện bước nuôi theo cách này có ưu điểm ở chỗ quá trình sinh trưởng của vi tảo sẽ được thúc đẩy hơn, và sản phẩm paramylum hoặc các sản phẩm tương tự từ vi tảo cũng được thúc đẩy hơn.

Nhiệt độ nuôi ở bước nuôi không bị giới hạn cụ thể miễn là vi tảo có thể sinh trưởng ở nhiệt độ đó. Cụ thể, nhiệt độ nuôi (nhiệt độ canh trường) được áp dụng nằm trong khoảng từ 15°C đến 35°, tốt hơn là từ 20° đến 30°.

Độ pH của canh trường ở bước nuôi không bị giới hạn cụ thể miễn là vi tảo có thể sinh trưởng ở độ pH đó. Độ pH được áp dụng nằm trong khoảng từ 2,5 đến 5,5.

Để điều chỉnh độ pH trong canh trường, axit vô cơ chẳng hạn axit clohydric được thêm vào trong canh trường hoặc axit hữu cơ chẳng hạn axit axetic được thêm vào trong canh trường. Việc thêm axit hữu cơ vào trong canh trường có ưu điểm ở chỗ vi tảo có thể sinh trưởng bằng cách tận dụng axit hữu cơ làm chất dinh dưỡng hữu cơ.

Hơn nữa, để điều chỉnh độ pH trong canh trường, chất kiềm có thể được thêm vào trong canh trường này. Thông thường, natri hydroxit, kali hydroxit hoặc các chất tương tự cũng được sử dụng làm chất kiềm.

Ở bước nuôi, khí oxi được thêm vào canh trường có thể bị nén để cho phép vi tảo thuộc giống *Euglena* tạo ra este sáp.

Cụ thể, ở bước nuôi vi tảo có thể được nuôi dưới điều kiện kỵ khí bằng cách ngừng sục khí vào trong canh trường hoặc cung cấp khí trơ không có oxy hoặc khí tương tự vào trong canh trường.

Ở bước nuôi, vi tảo dự trữ polysacarit chẳng hạn paramylum trong tế bào của chúng còn được nuôi dưới điều kiện kỵ khí, bằng cách đó cho phép vi tảo thuộc giống *Euglena* chuyển hóa paramylum thành este sáp để dự trữ các chất béo trong tế bào của chúng.

Ở bước nuôi, tốt hơn là vi tảo được nuôi dưới điều kiện kỵ khí và điều kiện bóng tối không có ánh sáng chiếu vào, tại đó quá trình sản xuất este sáp có thể được thúc đẩy hơn.

Trong khi đó, ở bước nuôi, vi tảo có thể được nuôi trong sự có mặt của các chất dinh dưỡng vô cơ chứa nitơ hoặc các chất dinh dưỡng hữu cơ chứa nitơ, trong khi oxy được cung cấp vào trong canh trường để cho phép vi tảo thuộc giống *Euglena* sản xuất các protein.

Ở bước nuôi, vi tảo được nuôi như nêu trên, bằng cách đó cho phép vi tảo sản xuất các hợp chất hữu cơ chẳng hạn polysacarit, các chất béo, hoặc các protein trong khi vi tảo sinh trưởng. Do đó, các hợp chất hữu cơ này có thể được lưu trữ trong tế bào của vi tảo.

Hơn nữa, ở bước nuôi, điều kiện nuôi có thể được điều chỉnh một cách thích hợp, bằng cách đó cho phép vi tảo sản xuất các hợp chất hữu cơ chẳng hạn các chất sắc tố, các vitamin chẳng hạn vitamin C và vitamin E, các protein, các axit béo bao gồm các axit béo bão hòa, các axit béo không bão hòa bậc cao chẳng hạn axit linoleic, axit arachidonic và axit eicosapentaenoic, ngoài các hợp chất hữu cơ nêu trên.

Sau đó, vi tảo lưu trữ các hợp chất hữu cơ này trong tế bào của chúng có thể được dùng làm sinh khối, thuận tiện cho các ứng dụng khác nhau chẳng hạn thực phẩm, dược phẩm, thức ăn chăn nuôi, sản phẩm hóa học và nhiên liệu.

Các ví dụ về polysacarit bao gồm paramylum (β -1.3-glucan). Paramylum được tạo ra bởi liên kết của khoảng 700 đơn vị glucoza.

Các ví dụ về chất béo bao gồm este sáp. Este sáp được tạo ra bởi liên kết este giữa axit béo bậc cao và rượu bậc cao. Như este sáp, este sáp được tạo ra bởi liên kết este giữa axit béo C-14 và rượu bậc cao C-14 có thể được đề cập đến.

Trong phương pháp sản xuất polysacarit theo phương án của sáng chế, các bước tương tự như trong phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ được mô tả dưới đây, có thể được tiến hành.

Tiếp theo, một phương án về phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ theo sáng chế được mô tả.

Theo phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ của phương án này, ít nhất một hợp chất hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm polysacarit, chất béo, vitamin C, vitamin E, chất sắc tố, và protein được tạo ra dưới dạng hợp chất hữu cơ bằng cách tiến hành phương pháp nuôi (bước nuôi) nêu trên.

Phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ theo phương án này có hiệu quả cho phép thu được một cách hiệu quả ít nhất một hợp chất hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm polysacarit, chất béo, vitamin C, vitamin E, chất sắc tố, và protein.

Trong số các hợp chất hữu cơ này, vitamin C, vitamin E, chất sắc tố, và protein có thể được sản xuất cùng với polysacarit bằng cách tiến hành phương pháp sản xuất polysacarit.

Tốt hơn là, phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ theo phương án này bao gồm bước nuôi nêu trên, và còn bao gồm bước làm gia tăng tỉ lệ cô đặc của vi tảo sau khi được nuôi và bước làm khô vi tảo bằng cách làm giảm độ ẩm trong vi tảo sau bước làm cô đặc. Trong phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ, bước làm cô đặc và bước làm khô không thực sự cần thiết.

Bước làm cô đặc có thể được thực hiện bằng cách dùng thiết bị cô đặc thông thường.

Cụ thể, các ví dụ về thiết bị cô đặc bao gồm thiết bị cô đặc vi tảo bằng cách gia tăng tỉ lệ của vi tảo, ví dụ, bằng cách cô đặc nổi, cô đặc bởi trọng lực, cô đặc bằng màng và cô đặc bằng dây đai. Hơn nữa, thiết bị khử nước có thể được dùng làm thiết bị cô đặc để gia tăng tỉ lệ của vi tảo.

Cụ thể, các ví dụ về thiết bị khử nước bao gồm thiết bị khử nước chân không, thiết bị khử nước bằng áp lực (nén lọc), ép bằng dây đai, ép bằng vít, thiết bị khử nước ly tâm (bình thon cổ), và thiết bị khử nước bằng nhiều đĩa.

Bước cô đặc có thể được thực hiện bằng cách chỉ dùng thiết bị cô đặc, hoặc dùng cả thiết bị cô đặc và thiết bị khử nước, tùy thuộc vào các ứng dụng của polysacarit, chất béo, protein hoặc các hợp chất hữu cơ tương tự.

Bước làm khô có thể được thực hiện bằng cách gia nhiệt vi tảo sau bước cô đặc hoặc đặt vi tảo dưới áp suất giảm sau bước cô đặc.

Do vi tảo sau bước cô đặc hoặc sau bước làm khô có thể chứa ít nhất một trong các hợp chất hữu cơ chẳng hạn polysacarit, chất béo, vitamin C, vitamin E, chất sắc tố và protein trong tế bào của chúng, do đó chúng có thể dùng trong các ứng dụng chẳng hạn thực phẩm.

Hơn nữa, ít nhất một trong các hợp chất hữu cơ chẳng hạn polysacarit, chất béo, vitamin C, vitamin E, chất sắc tố và protein được chiết xuất từ vi tảo bằng cách đưa vi tảo sau bước cô đặc hoặc bước làm khô vào quy trình chiết xuất thông thường. Hợp chất hữu cơ chiết xuất được có thể được dùng trong các ứng dụng chẳng hạn, nguyên liệu thô dùng làm thực phẩm và nhiên liệu.

Các ví dụ về quy trình chiết xuất được dùng bao gồm quy trình chiết xuất hợp chất hữu cơ nêu trên bằng cách dùng dung môi hữu cơ chẳng hạn etanol và hexan, và quy trình chiết xuất chất béo hoặc hợp chất hữu cơ đã được đề cập ở trên bằng cách dùng dung môi CO₂ ở trạng thái dưới tới hạn.

Vi tảo thuộc giống *Euglena*, phương pháp sản xuất polysacarit và phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ theo phương án của sáng chế nêu trên được minh họa bằng ví dụ nêu trên. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ bị giới hạn ở vi tảo thuộc giống *Euglena*,

phương pháp sản xuất polysacarit và phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ đã được minh họa bằng ví dụ ở trên.

Hơn nữa, cũng có thể dùng các phương án khác nhau mà thường được dùng đối với vi tảo thuộc giống *Euglena*, phương pháp sản xuất polysacarit và phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ, miễn là không ảnh hưởng đến tính hiệu quả của sáng chế.

Tức là, sáng chế không chỉ bị giới hạn ở các phương án nêu trên, thiết kế có thể được thay đổi thích hợp trong phạm vi mong đợi của sáng chế. Ưu điểm sử dụng của sáng chế không chỉ bị giới hạn ở các phương án của sáng chế đã được đề cập đến.

Các phương án của sáng chế được bộc lộ trong tài liệu này nên được hiểu là nhằm để minh họa mà không nhằm giới hạn về tất cả các khía cạnh của sáng chế. Phạm vi của sáng chế không được chỉ ra bởi phần mô tả nêu trên mà được xác định bởi phạm vi của yêu cầu bảo hộ. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế được dự định là bao gồm tất cả các cải biến tương đương về cảm giác và phạm vi đối với phạm vi của yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tiếp theo, sáng chế được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ bị giới hạn ở các ví dụ này.

Thu gom và phân lập vi tảo thuộc giống *Euglena*.

Nước được lấy trong các hồ và đầm lầy ở Nagasaki được cấy truyền vào môi trường nuôi AF-6 (môi trường sẽ được mô tả dưới đây), được nuôi trong khoảng hai tháng ở nhiệt độ trong phòng đồng thời được chiếu ánh sáng huỳnh quang.

Vi tảo thu được trong môi trường nuôi sau khi dịch nuôi được phân lập bằng pipet nhỏ. Vi tảo phân lập được nuôi trong môi trường nuôi AF-6 tại nhiệt độ trong phòng đồng thời được chiếu ánh sáng huỳnh quang.

Nhận dạng vi tảo thuộc giống *Euglena*.

Xác định trình tự bazơ.

Để khẳng định rằng vi tảo được tách ra là loài thuộc giống *Euglena*, hoạt động sau sẽ được thực hiện.

Tức là, trình tự bazơ của gen mã hóa rARN 18S của vi tảo được nuôi thuộc giống *Euglena* được xác định máy giải trình tự ADN (“CEQ8000”, được sản xuất bởi Beckman Coulter, Inc.) bằng cách dùng cặp mồi dành cho gen mã hóa rARN 18S của vi tảo thuộc giống *Euglena* (Zakrys et al., 2002, *Journal of Phycology* 38: 1190-1199). Trình tự bazơ đã được xác định được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 trong phần danh mục trình tự.

So sánh trình tự bazơ

Trình tự bazơ đã được xác định được so sánh với trình tự bazơ của gen mã hóa rARN 18S của vi tảo thuộc giống *Euglena* đã được biết đến thu được từ GenBank bằng cách sử dụng công cụ tìm kiếm độ tương đồng BLAST. Hơn nữa, việc so sánh với vi tảo thuộc giống *Euglena* đã biết về độ bất cặp tương đồng về trình tự đã được thực hiện. Fig.1 thể hiện bảng so sánh giữa trình tự bazơ của gen mã hóa rARN 18S của vi tảo thuộc giống *Euglena* được phân lập và trình tự bazơ của gen mã hóa rARN 18S của vi tảo thuộc giống *Euglena* đã biết.

Ngoài ra, cây phát sinh loài phân tử được xây dựng bằng phương pháp hợp lý nhất bằng cách dùng chương trình phần mềm vẽ cây phát sinh loài phân tử Mega5 (Tamura et al., 2011, *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739). Fig.2 thể hiện cây phát sinh loài.

Kết quả, vi tảo phân lập được ở trên được nhận dạng là loài thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis* Klebs). Cần lưu ý rằng Ka, Kb, Na và Nb của chủng EOD-1 trong Fig.2 là ký hiệu biểu thị mẫu thử nghiệm của vi tảo phân lập được. Thu được kết quả tương tự khi dùng mẫu thử nghiệm bất kỳ.

Phân tích RAPD

Hơn nữa, để so sánh vi tảo thuộc giống *Euglena* phân lập được và vi tảo thuộc giống *Euglena* đã được biết đến, kiểu băng của vi tảo thuộc giống *Euglena* phân lập được và kiểu băng của 6 chủng thuộc National Institute for Environmental Studies (Viện

Nghiên cứu Môi trường Quốc gia) bằng phân tích RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - ADN đa hình khuếch đại ngẫu nhiên) (Tham khảo tài liệu: Williams et al., (1990), Nucleic Acids Res.18 (22), 6531-6535).

Các điều kiện PCR trong phân tích RAPD như sau:

Số mẫu: 3.

Đoạn mồi 1: AAATCGGGCTG: RAPD-6, SEQ ID NO: 2

Enzym: Ex Taq (được sản xuất bởi Takara Bio Inc.)

Dung dịch đệm phản ứng: 50 μ L

Lượng ADN khuôn: khoảng 0,5 ng.

Điều kiện nhiệt độ PCR: như được thể hiện trong Bảng 1; cụ thể, sau khi xử lý ở nhiệt độ 94°C trong một phút, một loạt các xử lý (94°C trong một phút, 40°C trong 45 giây, và 72°C trong một phút) được lặp lại 35 lần, sau đó tiếp tục xử lý ở nhiệt độ 72°C trong bảy phút.

Điều kiện điện di: 2,5 % khối lượng chất gel agaroza, 100V, 40 phút.

Bảng 1

Chu kỳ hoạt động của PCR	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	
Biến tính	94	1 phút	
Biến tính	94	1 phút	Lặp lại 35 lần
Ủ	40	45 giây	
Kéo dài	72	1 phút	
Kéo dài	72	7 phút	

Chúng được so sánh trong phân tích RAPD

Euglena gracilis NIES-47

Euglena gracilis NIES-48

Euglena gracilis NIES-49

Euglena gracilis NIES-253

Euglena gracilis NIES-286

Euglena gracilis NIES-2149

Hơn nữa, trong khi thay đổi đoạn môi, phân tích RAPD được thực hiện theo cách thức tương tự với PCR.

Đoạn môi 2: ATCGGGTCCG: RAPD-4, SEQ ID NO: 3.

Đoạn môi 3: GCGATCCCCA: RAPD-3, SEQ ID NO: 4.

Trình tự bazơ của các đoạn môi 2 đến 4 nêu trên được mô tả trong Mostafa et al., (2011) Molecules 16, 2598-2608.

Fig.3A thể hiện kết quả (kiểu băng) của phân tích RAPD khi dùng đoạn môi 1 nêu trên. Hơn nữa, Fig.3B và Fig.3C lần lượt thể hiện kết quả phân tích RAPD khi dùng đoạn môi 2 và 3 nêu trên. Cần lưu ý rằng Ka và Na của chủng EOD-1 trong Fig.3A đến Fig.3C lần lượt tương ứng với Ka và Na trong Fig.2.

Từ kết quả phân tích RAPD, ta thấy rằng kiểu băng của vi tảo thuộc giống *Euglena* phân lập được ở trên khác với kiểu băng của vi tảo thuộc giống *Euglena* đã được biết đến. Theo đó, ta xác định được rằng các chủng của vi tảo thuộc giống *Euglena* phân lập được ở trên khác với các chủng của vi tảo thuộc giống *Euglena* đã được biết đến.

Sau đó, vi tảo thuộc giống *Euglena* phân lập được ở trên được gọi là chủng *Euglena gracilis* EOD-1.

Nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena*.

Để nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena*, các nguyên liệu sau đây được chuẩn bị và đưa vào bước nuôi theo các điều kiện nuôi sau đây.

Các chủng vi tảo thuộc giống *Euglena* theo sáng chế: vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1 (Số hiệu nộp lưu: FERM BP-11530) (được nộp lưu tại Patent Organism Depositary at the National Institute of Technology and Evaluation).

Chủng vi tảo thuộc giống *Euglena* đã được biết đến: Vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng NIES-48 (thu được từ Microbial Culture Collection at the National Institute for Environmental Studies).

Thùng nuôi: như được mô tả ở trên, chẳng hạn thùng có dung tích 300 mL.

Cung cấp khí cho canh: rung lắc 130 rpm: cung cấp không khí vào trong canh bằng cách rung lắc canh

Nhiệt độ nuôi: 28°C.

Thời gian nuôi: như được mô tả ở trên.

Độ pH của canh trường: như được mô tả ở trên.

Các thành phần trong canh trường để nuôi: các thành phần được thể hiện trong Bảng 2 và Bảng 3 được dùng làm các thành phần cơ bản.

Thành phần được thể hiện trong Bảng 2 thu được bằng cách thêm các thành phần của môi trường nuôi “kim loại P IV” (được bộc lộ bởi Microbial Culture Collection at the National Institute for Environmental Studies) vào thành phần của môi trường nuôi AF-6 được bộc lộ bởi Microbial Culture Collection at the National Institute for Environmental Studies. Ngoài ra, thành phần dinh dưỡng khác được chứa trong canh trường là nước.

Hơn nữa, thành phần được thể hiện trong Bảng 3 dựa trên thành phần của môi trường nuôi Cramer Myers.

Bảng 2

	Thành phần dựa trên môi trường nuôi AF-6
NaNO ₃	140 mg/L
NH ₄ NO ₃	22 mg/L
KH ₂ PO ₄	10 mg/L
K ₂ HPO ₄	5 mg/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	30 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg/L
Muối sắt xitric	2 mg/L
Axit xitric	2 mg/L
Biotin	2 µg/L
Thiamin HCl	10 µg/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,98 mg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,18 mg/L
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,02 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,11 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0125 mg/L
MES	400 mg/L
Vitamin B ₆	1 µg/L
Vitamin B ₁₂	1 µg/L

Bảng 3

	Thành phần dựa trên môi trường nuôi Cramer Myers
(NH ₄) ₂ SO ₄	500 mg/L

KH_2PO_4	500 mg/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 mg/L
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 mg/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,8 mg/L
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4 mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Vitamin B ₁	0,1 mg/L
Vitamin B ₁₂	1 µg/L

Trọng lượng ban đầu của vi tảo trước khi nuôi: 0,78g/L (trọng lượng khô)

Các chất dinh dưỡng hữu cơ: các nguyên liệu sau đây được thay đổi phù hợp tùy thuộc vào phương pháp nuôi.

- Glucoza.

- Dịch chiết nấm men (thể tự phân giải nấm men): “Dịch chiết Nấm men Khô D-3” (tên sản phẩm), được sản xuất bởi NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD.

- Bia như đồ uống pha chế: bia có giá trị về mặt thương mại (với tỉ lệ dùng mạch nha 66,7% hoặc nhiều hơn) chứa 5 vol% etanol.

Trong các ví dụ từ 1 đến 4 và các ví dụ so sánh từ 1 đến 4, phương pháp nuôi dị dưỡng được thực hiện trong điều kiện bóng tối, phương pháp nuôi quang dị dưỡng được thực hiện trong các ví dụ khác và các ví dụ so sánh. Các điều kiện nuôi trong phương pháp nuôi vi tảo quang dị dưỡng được thể hiện chi tiết dưới đây.

Điều kiện bức xạ quang: sau khi bức xạ quang trong 12 giờ, vi tảo được đặt trong bóng tối trong 12 giờ.

Cường độ ánh sáng: mật độ dòng photon hữu hiệu cho quang hợp (PPFD) khoảng $100\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ hoặc khoảng $200\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$

Ví dụ 1

200 mL thành phần được thể hiện trong Bảng 2 được đặt vào trong thùng Sakaguchi có dung tích 500 mL. Hơn nữa, glucoza và dịch chiết nấm men được thêm vào, nồng độ glucoza là 15 g/L và nồng độ dịch chiết nấm men là 5 g/L. Hơn nữa, độ pH được điều chỉnh lên đến 4,0 bằng cách thêm vào axit clohydric. Do đó, canh trường đã được chuẩn bị.

Sau đó, thùng được rung lắc theo điều kiện nuôi và điều kiện bóng tối như nêu trên (tức là, theo điều kiện nuôi dị dưỡng), vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1 được nuôi trong 3 ngày. Do đó, bước nuôi được thực hiện.

Các ví dụ 2 đến 4

Bước nuôi được thực hiện theo cách thức tương tự như trong ví dụ 1, ngoại trừ lượng glucoza thay đổi để nồng độ glucoza trong canh trường lần lượt là 20 g/L và 30 g/L.

Ví dụ so sánh 1

Bước nuôi được thực hiện theo cách thức tương tự như trong ví dụ 1, ngoại trừ vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng NIES-48 được nuôi trong 5 ngày thay vì vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1.

Các ví dụ so sánh 2 đến 4

Bước nuôi được thực hiện theo cách thức tương tự như trong ví dụ so sánh 1, ngoại trừ lượng glucoza thay đổi để nồng độ glucoza trong canh trường lần lượt là 20 g/L, 25 g/L và 30 g/L.

Trọng lượng khô của vi tảo sau bước nuôi trong mỗi ví dụ và các ví dụ so sánh được đo. Hơn nữa, tỉ lệ chuyển hóa của chất dinh dưỡng được thêm vào được xác định bởi công thức tính sau.

Tỉ lệ chuyển hóa (%) = trọng lượng khô (g/L) của tảo gia tăng do phương pháp nuôi/ nồng độ (g/L) của glucoza được dùng.

Fig.4 thể hiện kết quả tỉ lệ chuyển hóa và trọng lượng khô của tảo sau khi nuôi trong mỗi ví dụ và ví dụ so sánh.

Như được thể hiện trên Fig.4, vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1 có sinh khối sản xuất được cao hơn chủng NIES-48 đã được biết đến.

Ví dụ 5

Bước nuôi được thực hiện bằng cách nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1 theo cách thức tương tự như trong ví dụ 1, ngoại trừ dùng thùng Erlenmeyer 300ml, dùng canh trường thu được bằng cách thêm 50 mL bia trong thành phần được thể hiện trong Bảng 2 có nồng độ ethanol từ bia 2,5 vol%, dịch chiết nấm men không được thêm vào canh trường này, môi trường bức xạ quang trong 12 giờ và môi trường bóng tối trong 12 giờ được lặp lại ở bước nuôi, và thời gian nuôi là 7 ngày. Mật độ dòng photon hữu hiệu cho quang hợp (PPFD) khoảng 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$.

Ví dụ 6

Bước nuôi được thực hiện theo cách thức tương tự như trong ví dụ 5, ngoại trừ dịch chiết nấm men được thêm vào trong canh trường có nồng độ dịch chiết nấm men là 2 g/L.

Ví dụ so sánh 5

Bước nuôi được thực hiện theo cách thức tương tự như trong ví dụ 5, ngoại trừ vi tảo thuộc giống *Euglena* chủng NIES-48 được nuôi thay vì vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1.

Ví dụ so sánh 6

Bước nuôi được thực hiện theo cách thức tương tự như trong Ví dụ So sánh 5, ngoại trừ dịch chiết nấm men được thêm vào trong canh có nồng độ là 2 g/L.

Ở bước nuôi ở mỗi Ví dụ 5 và 6, Các ví dụ So sánh 5 và 6, trọng lượng khô của vi tảo sau khi được nuôi khoảng 1, 2, 3, 4, 5 và 7 ngày sẽ được đo. Fig.5 thể hiện kết quả.

Như được thấy từ Fig.5, vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1 có năng suất cao hơn chủng NIES-48 đã được biết đến, ngay cả khi chúng được nuôi dưới điều kiện quang dị dưỡng.

Các ví dụ từ 7 đến 12

Bước nuôi được thực hiện theo cách thức tương tự như trong ví dụ 5, ngoại trừ thành phần được thể hiện trong Bảng 3 được dùng thay vì thành phần được thể hiện trong Bảng 2, độ pH ban đầu của canh trường thay đổi lần lượt là pH 5,5, pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0, pH 8,5 và pH 9,0, thời gian nuôi thay đổi lên đến 10 ngày.

Ở bước nuôi ở mỗi ví dụ từ 7 đến 12, trọng lượng khô của vi tảo sau khi nuôi được đo cuối cùng. Fig.6 thể hiện kết quả.

Các ví dụ từ 13 đến 17

Bước nuôi được thực hiện theo cách thức tương tự như trong ví dụ 5, ngoại trừ thành phần được thể hiện trong Bảng 3 được dùng thay vì thành phần được thể hiện trong Bảng 2, mật độ dòng photon hữu hiệu cho quang hợp (photosynthetic photon flux density - PPFD) khoảng 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, độ pH ban đầu của canh trường thay đổi lần lượt là pH 3,5, pH 4,0, pH 4,5, pH 5,0, và pH 5,5, thời gian nuôi được thay đổi đến 10 ngày.

Các ví dụ 18 và 19

Bước nuôi được thực hiện theo cách thức tương tự như trong ví dụ 5, ngoại trừ thành phần được thể hiện trong Bảng 3 được dùng thay vì thành phần được thể hiện trong Bảng 2, độ pH ban đầu của canh thay đổi lần lượt là pH 3,5 và pH 5,5, thời gian nuôi được thay đổi lên đến 10 ngày.

Ở bước nuôi ở mỗi ví dụ 13 đến 19, trọng lượng khô của vi tảo sau khi nuôi được đo cuối cùng. Fig.7 thể hiện kết quả.

Ví dụ 20

Bước nuôi được thực hiện bằng cách nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1 theo cách thức tương tự như trong ví dụ 5, ngoại trừ thời gian nuôi là 7 ngày.

Phương pháp nuôi được thực hiện dưới điều kiện ưa khí bằng cách rung lắc thùng khoảng hai ngày sau khi bắt đầu nuôi. Sau đó, ngừng rung lắc thùng, phương pháp nuôi được thực hiện dưới điều kiện kỵ khí bằng cách cung cấp khí trơ (khí nitơ) vào trong thùng.

Ví dụ so sánh 7

Bước nuôi được thực hiện theo cách thức tương tự như trong ví dụ 20, ngoại trừ vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng NIES-48 được nuôi thay vì vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1.

Phương pháp nuôi được thực hiện dưới điều kiện ưa khí bằng cách rung lắc thùng khoảng 4 ngày sau khi bắt đầu nuôi. Sau đó, ngừng rung lắc thùng, phương pháp nuôi được thực hiện dưới điều kiện kỵ khí bằng cách cung cấp khí trơ (khí nitơ) vào trong thùng.

Lượng paramylum và các chất béo (este sáp) được tạo ra bởi phương pháp nuôi trong ví dụ 20 và ví dụ so sánh 7 được đo hàng ngày.

Lượng paramylum sau khi nuôi được đo bởi quy trình sau. Tức là, hỗn hợp (40 mL) bao gồm canh trường và vi tảo sau khi được nuôi được đặt vào trong ống ly tâm, sau đó quay ly tâm. Nước tinh khiết được thêm vào phần kết tủa sau khi ly tâm để tạo ra thể huyền phù, và tiến hành lặp lại việc tách lại bằng ly tâm hai lần. Sau đó, một lượng nhỏ nước tinh khiết được thêm vào phần kết tủa sau khi ly tâm để tạo ra thể huyền phù, và chất rắn huyền phù được sấy đông khô. Như vậy, các thành phần của canh trường đã được loại bỏ.

Tiếp theo, khoảng 400 mg tế bào của vi tảo đã được sấy đông khô được cân chính xác trong một ống ly tâm (ống ly tâm được cân là trị số rỗng). Axeton được thêm vào ống ly tâm để tạo ra thể huyền phù, và chất lỏng nổi trên bề mặt sau quá trình ly tâm được loại bỏ. Cho đến khi màu của chất lỏng nổi trên bề mặt biến mất, hoạt động rửa bằng axeton được lặp lại khoảng năm lần. Như vậy, thành phần sắc tố do vi tảo tạo ra sẽ bị loại bỏ.

Kết quả, hoạt động loại bỏ các thành phần khác paramylum được thực hiện bằng cách dùng dung dịch natri sunfat dodexyl. Tức là, 20 mL dung dịch natri sunfat dodexyl 1% (SDS) được thêm vào phần còn lại sau khi thành phần sắc tố bị loại bỏ để tạo ra thể huyền phù, sau đó thể huyền phù được đun nóng ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút. Sau đó, chất lỏng nổi trên bề mặt sau quá trình ly tâm được loại bỏ. Hoạt động như vậy được lặp lại hai lần, sau đó hoạt động tương tự được lặp lại ba lần bằng cách dùng nước tinh khiết thay vì dung dịch SDS. Do đó, SDS được rửa sạch.

Cuối cùng, toàn bộ ống ly tâm được đặt vào trong thiết bị sấy ở nhiệt độ 105°C để loại bỏ độ ẩm, trọng lượng ống ly tâm chứa paramylum được đo. Sau đó, lượng paramylum được xác định bằng trị số chênh lệch với trị số rỗng nêu trên.

Tiếp đó, lượng este sáp sau khi nuôi được đo bằng phương pháp BLIGHT-DYER.

Fig.8A và Fig.8B thể hiện kết quả đo lượng paramylum qua thời gian trong phương pháp nuôi của ví dụ 20 và ví dụ so sánh 7. Hơn nữa, Fig.9A và Fig.9B thể hiện kết quả đo lượng chất béo (este sáp) qua thời gian.

Như được thể hiện trên Fig.8A và Fig.8B, vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1 có tốc độ sản xuất paramylum cao hơn vi tảo thông thường thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng NIES-48. Hơn nữa, chủng EOD-1 có hàm lượng paramylum trên mỗi tế bào khoảng 55% hoặc cao hơn, hàm lượng này cao hơn ở chủng NIES-48.

Hơn nữa, như được thể hiện trên Fig.9A và Fig.9B, vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1 có tốc độ sản xuất chất béo (este sáp) cao hơn, do đó, hàm lượng este sáp trên mỗi tế bào gia tăng trong một thời gian ngắn.

Hơn nữa, bước nuôi được thực hiện bằng cách dùng môi trường nuôi có thành phần được thể hiện trong Bảng 4 và Bảng 5 nêu trên theo các điều kiện nuôi dưới đây.

Ví dụ 21

Vi tảo được đề cập ở trên, chủng EOD-1, được nuôi trong hai ngày bằng phương pháp nuôi quang dị dưỡng.

Ví dụ so sánh 8

Vi tảo được đề cập ở trên, chủng NIES-48 được nuôi trong hai ngày bằng phương pháp nuôi quang dị dưỡng.

Đối với môi trường nuôi, sử dụng môi trường nuôi thu được bằng cách thêm 30 g/L glucoza vào môi trường nuôi Hutner đã được cải biến (sau đây gọi tắt là “môi trường nuôi Hutner cải biến”). Cụ thể, thành phần như được thể hiện trong Bảng 4, và thành phần trong dung dịch ngoài chất dinh dưỡng là nước. Như là dung dịch kim loại vi lượng trong Bảng 4, dung dịch kim loại vi lượng có thành phần trong Bảng 5 dưới đây được sử dụng. Thành phần khác ngoài kim loại vi lượng là nước.

Chi tiết phương pháp nuôi như được mô tả dưới đây.

Canh trường: độ pH được điều chỉnh đến 4,0 bằng cách dùng axit clohydric.

Thùng nuôi: thùng Sakaguchi 500 mL

Giới thiệu trước khi nuôi: 200 mL canh trường và vi tảo trước khi nuôi được đặt vào trong thùng Sakaguchi (để điều chỉnh lượng sinh khối ban đầu, tổng cộng 220 mL được dùng cho chủng EOD-1 và 236 mL được dùng cho chủng NIES-48)

Nhiệt độ trong quá trình nuôi: 28°C.

Điều kiện bóng tối trong quá trình nuôi: được nuôi dưới điều kiện bóng tối được chắn ánh sáng.

Điều kiện ưa khí trong quá trình nuôi: thùng Sakaguchi được đặt vào máy lắc, không khí được cấp vào trong canh trường bằng cách điều khiển máy lắc với tốc độ lắc là 130 rpm.

Bảng 4

Môi trường nuôi Hutner cải biến: Glucoza được thêm vào.

Glucoza	30 g/L
Asparagin	2 g/L
Axit glutamic	5 g/L
Axit malic	5 g/L
Glyxin	2,5 g/L
Urê	0,4 g/L
Axit succinic	0,1 g/L
KH_2PO_4	0,4 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,14 g/L
MgCO_3	0,4 g/L
CaCO_3	0,1 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,021 g/L
Vitamin B ₁	0,6 mg/L
Vitamin B ₁₂	0,05 mg/L
Dung dịch kim loại vi lượng	10 mL/L

Bảng 5

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,1 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,58 g/L
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,18 g/L
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,024 g/L

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,077 g/L
H_3BO_3	0,029 g/L
$\text{NaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,074 g/L

Trọng lượng khô (sản lượng sinh khối) của tảo sau hai ngày được nuôi và tỷ lệ chuyển hóa glucoza được tính toán theo cách thức tương tự như trên. Bảng 6 thể hiện kết quả.

Bảng 6

Sau hai ngày nuôi	Ví dụ 21 (Chủng EOD-1)	Ví dụ so sánh 8 (Chủng NIES-48)
Trọng lượng khô (g/L)	24,50	11,50
Chuyển hóa glucoza (%)	76	33

Như được thể hiện trong Bảng 6, vi tảo thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng EOD-1 có hiệu suất sản xuất sinh khối tốt hơn, và tỷ lệ chuyển hóa glucoza tốt hơn vi tảo thông thường thuộc giống *Euglena* (*Euglena gracilis*) chủng NIES-48.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Vi tảo theo sáng chế, phương pháp sản xuất polysacarit theo sáng chế và phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ theo sáng chế được dùng một cách thích hợp để thu được các hợp chất hữu cơ như polysacarit chẳng hạn paramylum, chất béo chẳng hạn este sáp và protein bằng phương pháp nuôi.

Các hợp chất hữu cơ thu được có thể được dùng trong các ứng dụng như thực phẩm sức khỏe, dược phẩm, thức ăn chăn nuôi, sản phẩm hóa học hoặc nhiên liệu, đồng thời các hợp chất hữu cơ còn lại được dự trữ trong các tế bào của vi tảo, hoặc sau đó được tách chiết bằng quy trình tách chiết hoặc quy trình tương tự. Cụ thể, chất béo được dự trữ trong các tế bào của vi tảo dưới dạng hợp chất hữu cơ thu được bằng phương

pháp nuôi là thích hợp được dùng, ví dụ làm nguyên liệu thô của nhiên liệu, bằng cách chiết xuất các chất béo từ các tế bào này.

Yêu cầu bảo hộ

1. Vi tảo thuộc giống *Euglena* là chủng *Euglena gracilis* EOD-1 (Số hiệu nộp lưu FERM BP-11530) có khả năng sản xuất ít nhất là polysacarit.
2. Phương pháp sản xuất polysacarit bao gồm bước: nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena* theo điểm 1 làm sinh vật sản xuất polysacarit để sản xuất polysacarit.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó canh trường được dùng trong nuôi chứa từ 15 đến 30 g/L glucoza.
4. Phương pháp theo điểm 2 hoặc 3, trong đó canh trường được dùng trong khi nuôi chứa dịch thủy phân nấm men.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ từ 2 đến 4, trong đó polysacarit này là paramylum.
6. Phương pháp sản xuất hợp chất hữu cơ bao gồm bước: nuôi vi tảo thuộc giống *Euglena* theo điểm 1 để sản xuất ít nhất một hợp chất hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm polysacarit, chất béo, vitamin C, vitamin E, chất sắc tố và protein.

Fig. 1

Số chuỗi (tổng cộng 1960)	93	94	108	156	221	251	396	742	785	852	1000	1334	1439	1440	1460	1636	1765	1779
EOD-1	G	C	T	A	T	T	-	T	T	C	G	G	C	A	C	G	C	A
NIES-47	T	G	C	G	A	C	-	C	T	T	G	T	C	A	C	A	T	C
NIES-48(Z)	G	C	C	G	A	C	-	C	C	C	G	T	C	A	C	A	T	A
NIES-48(Z, M12677)	G	C	C	G	A	C	-	C	C	C	-	T	C	A	C	A	T	A
NIES-49	G	C	C	G	A	C	-	C	T	T	G	T	C	A	C	A	T	A
SAG1224-5/15	G	C	C	G	A	C	-	C	T	T	G	T	G	C	G	A	T	A
SAG1224-5/25	G	C	C	G	A	C	-	C	C	C	G	T	C	A	C	A	T	A
AY029409	G	C	C	G	A	C	A	C	T	T	G	T	C	A	C	A	T	A

Fig. 2

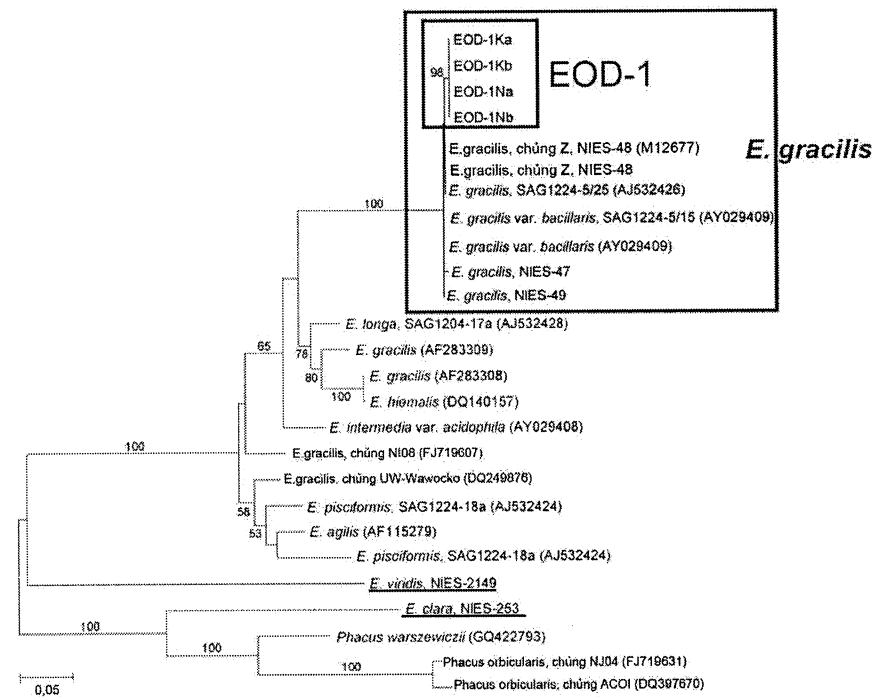


Fig. 3A

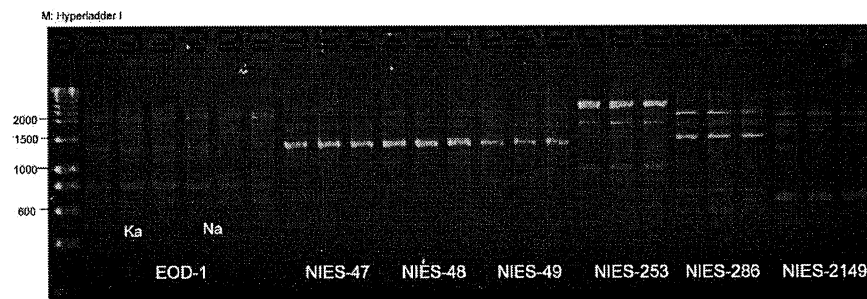


Fig. 3B

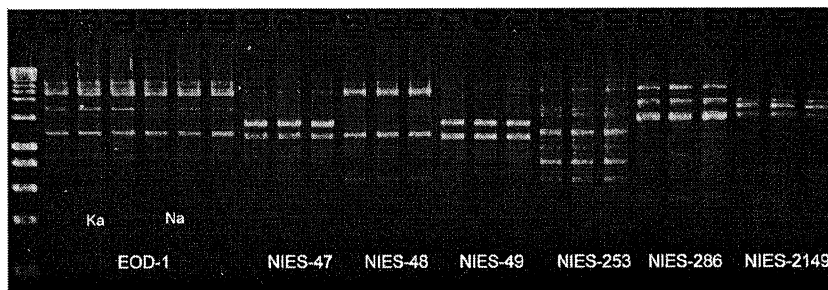


Fig. 3C

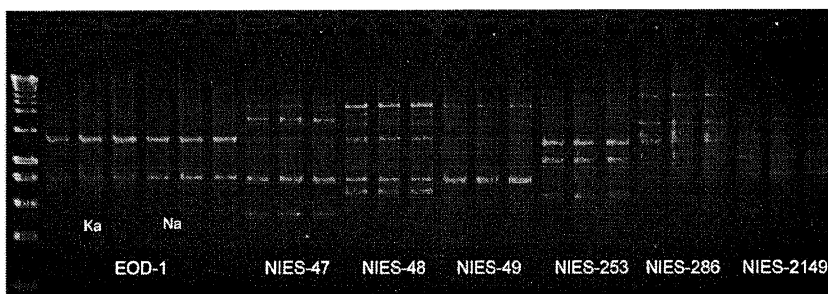


Fig. 4

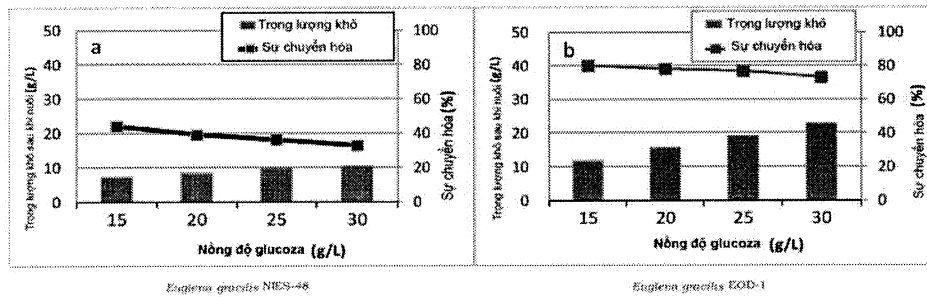


Fig. 5

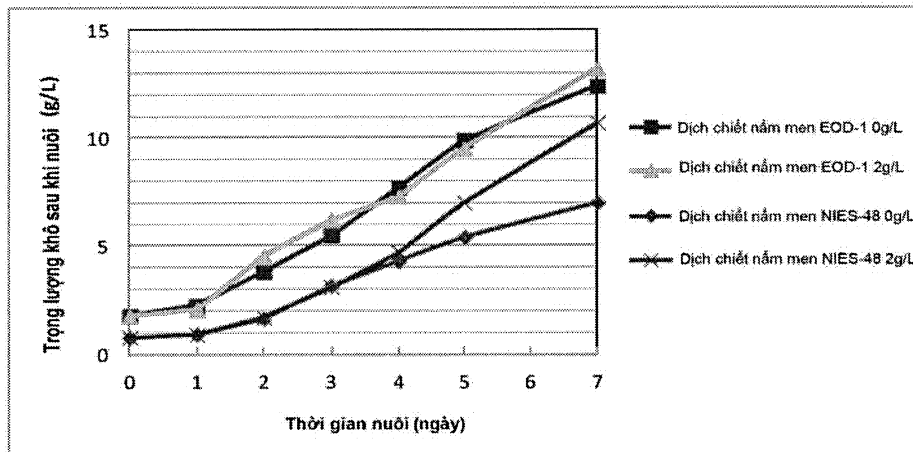


Fig. 6

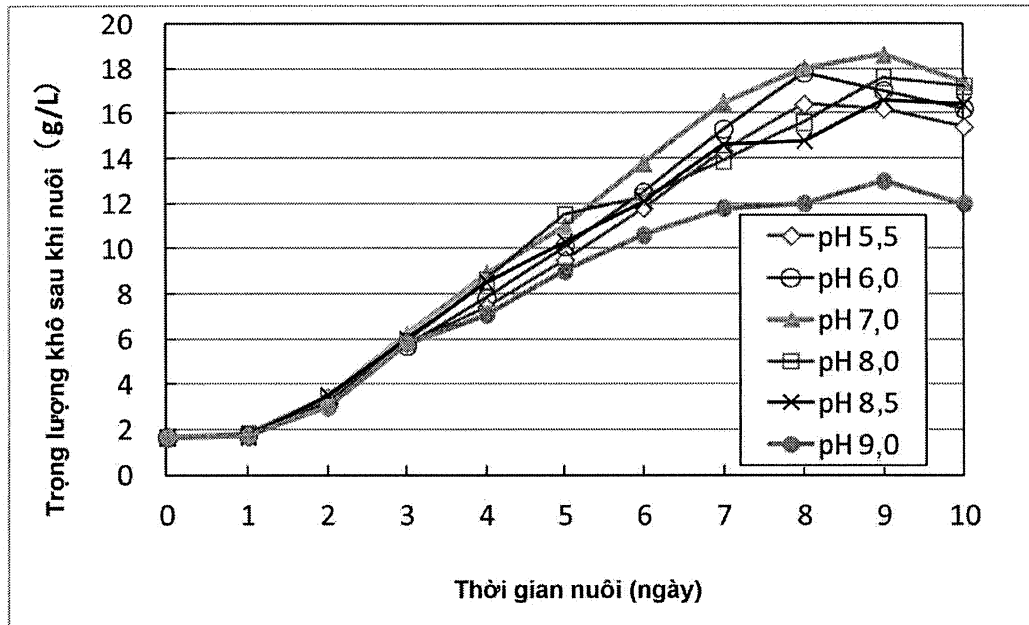


Fig. 7

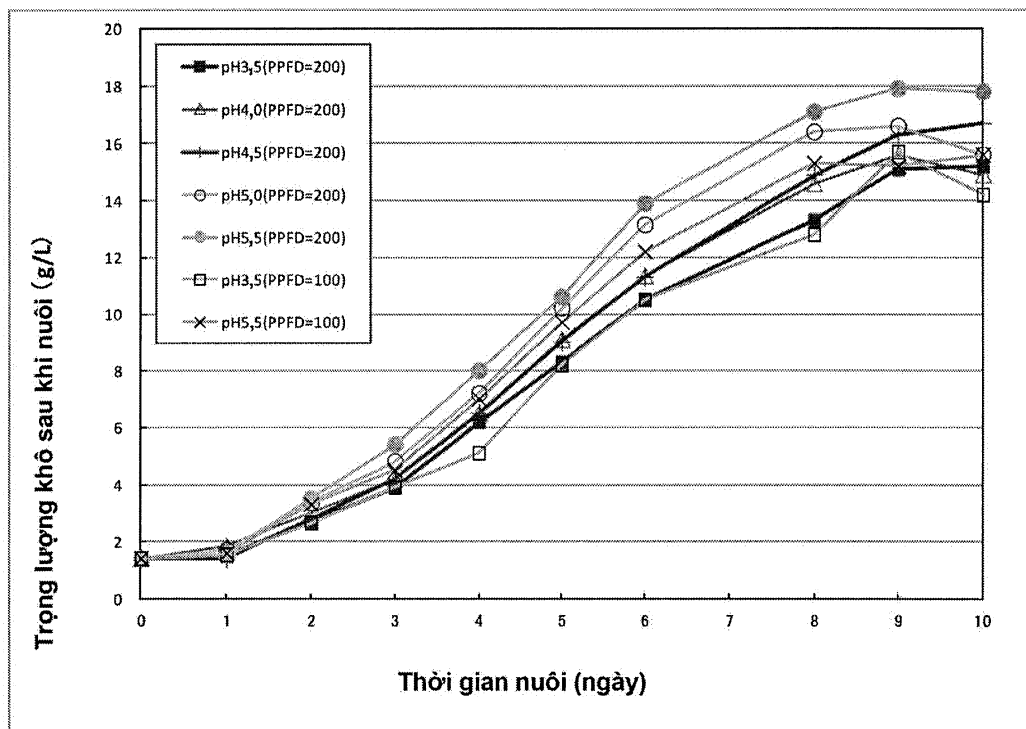


Fig. 8A

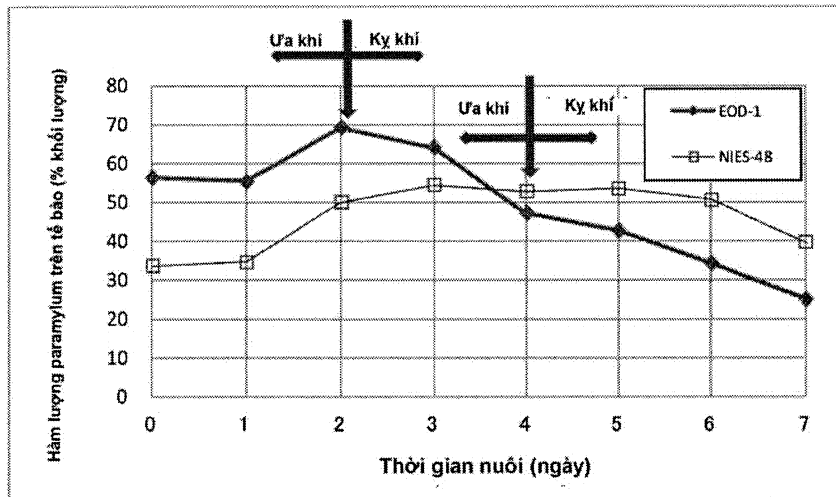


Fig. 8B

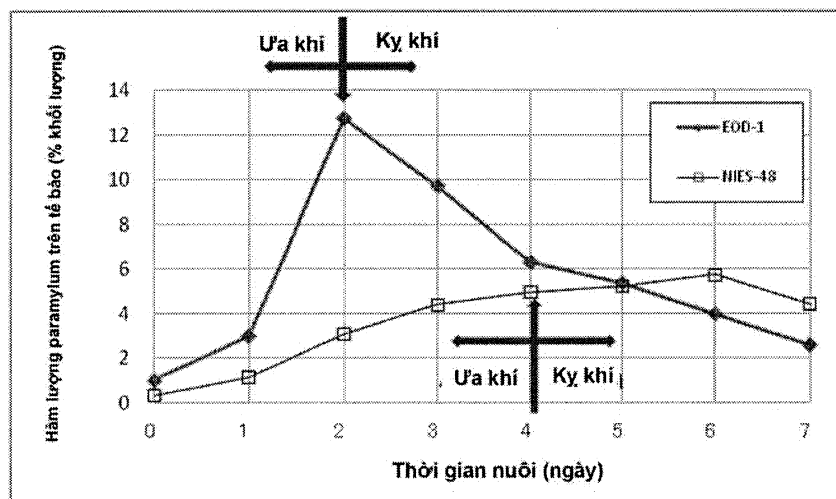


Fig. 9A

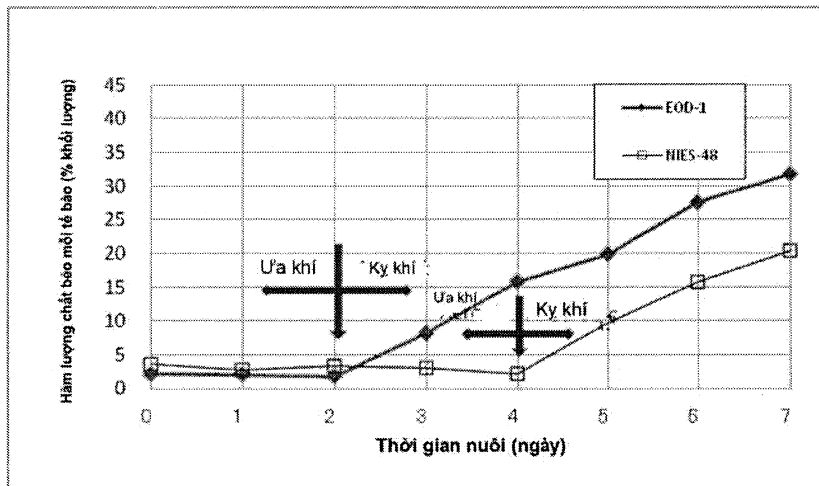


Fig. 9B

