



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0036200

(51)¹⁹ C12N 1/20; C12P 1/00

(13) B

(21) 1-2019-02237

(22) 06/10/2017

(86) PCT/JP2017/036433 06/10/2017

(87) WO 2018/066686 A1 12/04/2018

(30) 2016-199429 07/10/2016 JP

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/07/2019 376A

(73) SDS BIOTECH K.K. (JP)

3 Kanda-Neribeicho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0022 Japan

(72) Yasuyuki MORISHITA (JP).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY BACILLUS SPP. TẠO RA BÀO TỬ VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẤT HỮU ÍCH

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus spp.* tạo ra bào tử mới mà bằng phương pháp này các bào tử có thể được sản xuất ở lượng có hiệu quả bao gồm bổ sung chất ức chế sự hình thành bào tử vào môi trường để nuôi cấy vi khuẩn sinh bào tử, trong đó hàm lượng cacbon trong môi trường này là 9,1g/l hoặc lớn hơn, và tốt hơn còn bao gồm bước bổ sung chất thúc đẩy hình thành bào tử vào môi trường này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất chất hữu ích.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn sinh bào tử như các vi khuẩn thuộc giống *Bacillus* được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau bao gồm sản xuất các enzym và các chất hữu ích, sản xuất thực phẩm lên men, phân hủy chất hữu cơ, thuốc dung cho các rối loạn của ruột, các thuốc diệt vi khuẩn và các phân bón vi sinh, chẳng hạn.

Sử dụng vi khuẩn sinh bào tử làm thuốc dung cho các rối loạn của ruột, các thuốc diệt vi khuẩn, hoặc các phân bón vi sinh cần phải bổ sung các tế bào sống làm thành phần hoạt hóa vào các sản phẩm, và các tế bào dưới dạng các bào tử có tính lâu bền tốt thường được sử dụng để bổ sung. Do đó, đòi hỏi phương pháp sản xuất các bào tử với hiệu suất cao hơn.

Vi khuẩn sinh bào tử sinh trưởng khi được đặt vào môi trường thích hợp đối với sự sinh trưởng và tạo ra các bào tử ở các tế bào sinh dưỡng khi được đặt vào môi trường thích hợp đối với sự hình thành bào tử. Do số lượng các bào tử không bao giờ vượt quá số lượng các tế bào sinh dưỡng ban đầu, có ít nhất hai mặt để cải thiện năng suất các bào tử, cải thiện về hiệu suất nuôi cấy để nuôi cấy các tế bào sinh dưỡng và cải thiện về tốc độ hình thành bào tử từ các tế bào sinh dưỡng.

Môi trường thích hợp đối với sự sinh trưởng là môi trường mà có mặt các thành phần dinh dưỡng với các lượng đủ cho sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn liên quan, và thể tích nước, áp suất thẩm thấu, nhiệt độ, độ pH, nồng độ oxy, và yếu tố tương tự nằm trong phạm vi cho phép chúng sinh trưởng được.

Hơn nữa, phương pháp sản xuất sản phẩm dị hóa đích có hiệu suất cao hơn được đòi hỏi để sản xuất các enzym và các chất hữu ích. Ít nhất có hai mặt để cải thiện năng suất của các enzym và các chất hữu ích, gây ra trạng thái trao đổi chất trong đó chất đích được sản xuất ở mức cao và duy trì trạng thái này trong thời gian dài.

Thông thường, việc cải thiện hiệu suất nuôi cấy đối với việc nuôi cấy các tế bào sinh dưỡng và duy trì trạng thái trao đổi chất trong đó các chất chuyển hóa được sản xuất ở mức cao đạt được nhờ việc tối ưu hóa các điều kiện khác nhau ở trên, đặc biệt là cải thiện chế phẩm môi trường và cải thiện nồng độ.

Có nhiều báo cáo liên quan đến công nghệ sản xuất các bào tử vi khuẩn *Bacillus* ở mức cao, như được minh họa chẳng hạn ở các tài liệu phi sáng chế 1 đến 3, tuy nhiên, các kỹ thuật được sử dụng trong các báo cáo này là sự cải thiện của các chế phẩm và sự cải thiện các nồng độ của môi trường. Tài liệu phi sáng chế 3 của các tài liệu này báo cáo năng suất cao nhất, tuy nhiên, theo tài liệu này, lượng đường được sử dụng trên mỗi lít môi trường là khoảng 100g/l (bao gồm lượng cần được cấp), môi trường được sử dụng trong tài liệu này chứa đường ở nồng độ rất cao. Tuy nhiên, việc tăng hơn nữa nồng độ đường gây ra các tổn hại đến mức thiết bị nuôi cấy trở nên không thể oxy hóa được do nhu cầu oxy tăng lên, các thành phần dinh dưỡng còn lại trong thời gian dài trong môi trường, dẫn đến giảm tỷ lệ hình thành bào tử, đòi hỏi phải kéo dài thời gian nuôi cấy, chẳng hạn. Hơn nữa, chính sự tăng nồng độ các thành phần dinh dưỡng như các đường có thể có tác động làm ức chế sự sinh trưởng. Hơn nữa, khi nồng độ các tế bào sinh dưỡng tăng lên trong quá trình nuôi cấy, cơ chế, “gây cảm giác mật độ (quorum sensing)” phát hiện nồng độ của chính nó và thay đổi các quá trình trao đổi chất, gây ra sự hình thành bào tử, và do đó hiện tượng có thể xảy ra để ngay cả khi nồng độ các thành phần dinh dưỡng tăng thêm nữa, các tế bào sinh dưỡng không sinh trưởng đến một mức độ nhất định.

Như được mô tả ở trên, các kỹ thuật thông thường bao gồm làm tăng nồng độ các thành phần dinh dưỡng được bổ sung vào môi trường để làm tăng hiệu suất nuôi cấy có những hạn chế.

Trong khi đó, tài liệu sáng chế 1 bộc lộ phương pháp gây ra sự hình thành bào tử bằng cách làm giảm nồng độ oxy hòa tan sau khi các tế bào sinh dưỡng sinh trưởng. Ngoài ra, tài liệu sáng chế 2 bộc lộ phương pháp gây ra sự hình thành bào tử bằng cách tiếp tục nuôi cấy trong thời gian dài sau khi nguồn cacbon bị tiêu thụ hoàn toàn. Hơn nữa, tài liệu sáng chế 3 bộc lộ phương pháp sản xuất các bào tử bằng cách xác định phạm vi nồng độ phosphat trong môi trường nuôi cấy và phạm vi cung cấp oxy và tốc

độ khuấy làm các điều kiện nuôi cấy. Tuy nhiên, tất cả các kỹ thuật này tạo ra các điều kiện thích hợp đối với sự hình thành bào tử của các tế bào sinh dưỡng, và không góp phần làm cho “các tế bào sinh dưỡng sinh trưởng ở nồng độ cao” chủ yếu đối với việc cải thiện mạnh mẽ năng suất các bào tử.

Hơn nữa, tài liệu phi sáng chế 4 bộc lộ rằng việc sử dụng kháng sinh ở nồng độ thấp hơn nồng độ ức chế sự sinh trưởng có thể ức chế vi khuẩn *Bacillus* sinh ra các bào tử trong quá trình nuôi cấy, và sự bổ sung decoyinin vào đó có thể làm mất tác dụng ức chế sự hình thành bào tử. Tuy nhiên, tài liệu này cũng chứng minh là ở môi trường như vậy (nồng độ glucoza là 1%, và hàm lượng cacbon là 4,0/l trong môi trường) chứa kháng sinh ở nồng độ thấp như được sử dụng trong tài liệu sáng chế 4, nồng độ của các bào tử được tạo ra theo cách đó giảm xuống tùy thuộc vào nồng độ của kháng sinh được bổ sung, do đó công nghệ này không thể được coi là công nghệ có khả năng góp phần sản sinh các bào tử ở mức cao.

Có nhiều báo cáo báo cáo liên quan đến công nghệ sản xuất các chất hữu ích sử dụng vi khuẩn *Bacillus* như được minh họa ở các tài liệu sáng chế 4 và 5, chẳng hạn, nhưng cả hai tài liệu này đều mô tả các kỹ thuật cải thiện các chế phẩm môi trường và các điều kiện nuôi cấy. Tuy nhiên, do nhu cầu oxy tăng lên, sự ức chế sinh trưởng bởi các thành phần dinh dưỡng, kích thích sự hình thành bào tử bằng cách gây cảm giác mật độ, và tương tự như được mô tả ở trên, nên đã có những hạn chế đối với các kỹ thuật cải thiện hiệu suất nuôi cấy bằng cách gia tăng nồng độ của các thành phần môi trường.

Các tài liệu sáng chế này còn bộc lộ các phương pháp thu các chủng vi khuẩn có khả năng sản sinh các chất chuyển hóa đích ở mức cao nhờ sử dụng các thể biến nạp hoặc đột biến, tuy nhiên, điều này làm thay đổi các tính trạng di truyền của chủng kiểu hoang dại, có thể dẫn đến làm mất hoặc làm suy giảm các đặc tính có lợi khác.

Tài liệu trích dẫn

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP2007-236286A

Tài liệu sáng chế 2: JP2000-217567A

Tài liệu sáng chế 3: JP2007-195542A

Tài liệu sáng chế 4: JP3635638B

Tài liệu sáng chế 5: JP4338080B

Các tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Biotechnology progress 2005, 21, 4, 1026-1031

Tài liệu phi sáng chế 2: Curr Microbiol 2013,66,279-285

Tài liệu phi sáng chế 3: Advances in Microbiology 2014, 4, 444-454

Tài liệu phi sáng chế 4: Journal of General Microbiology 1983, 129, 3709-3720

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Như được mô tả ở trên, các kỹ thuật thông thường để làm tăng năng suất bào tử của vi khuẩn sinh bào tử và năng suất của các chất hữu ích như các chất chuyển hóa bằng cách làm tăng nồng độ môi trường có những hạn chế. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp nuôi cấy mới mà sử dụng phương thức mới, mà bằng cách đó các bào tử và các chất hữu ích như các chất chuyển hóa có thể được sản xuất đủ nhờ cải thiện hiệu quả sinh trưởng của các tế bào sinh dưỡng trong quá trình nuôi cấy.

Cách thức giải quyết vấn đề

Nhờ các nghiên cứu chuyên sâu nhằm giải quyết các vấn đề trên, tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng năng suất của các bào tử và năng suất của các chất hữu ích như các chất chuyển hóa có thể được cải thiện một cách đáng kể, so với trường hợp không bổ sung chất ức chế sự hình thành bào tử, bằng cách cho các tế bào sinh dưỡng sinh trưởng với sự có mặt của chất ức chế sự hình thành bào tử sử dụng môi trường chứa nguồn cacbon ở nồng độ cao, và sau đó kích thích sự hình thành bào tử. Do đó, tác giả sáng chế đã hoàn thành được sáng chế.

Sáng chế đề cập các khía cạnh dưới đây:

[1] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử, bao gồm nuôi cấy vi khuẩn sinh bào tử trong môi trường mà chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung vào môi trường này, trong đó môi trường này có hàm lượng cacbon là 9,1g/l hoặc lớn hơn.

[2] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục [1], trong đó chất ức chế sự hình thành bào tử là chất ức chế enzym.

[3] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục [1] hoặc [2], trong đó chất ức chế sự hình thành bào tử là ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm lincomyxin, erythromyxin, rifampixin, cloramphenicol, streptomycin, cafein, axit cafeic, actinomycin, axit fusidic, lipiarmycin, puromycin, spectinomycin, tetracyclin, và thiostrepton.

[4] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [3], trong đó nồng độ của chất ức chế sự hình thành bào tử bằng hoặc thấp hơn nồng độ ức chế sinh trưởng của chất mà ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn sinh bào tử.

[5] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [4], trong đó nồng độ của chất ức chế sự hình thành bào tử là 15 ppm hoặc nhỏ hơn.

[6] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [5], bao gồm bổ sung chất thúc đẩy hình thành bào tử vào môi trường.

[7] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục [6], trong đó chất thúc đẩy hình thành bào tử được bổ sung vào môi trường tại một thời điểm trong khoảng thời gian từ 5 giờ đến 70 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy.

[8] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục [6] hoặc [7], trong đó chất thúc đẩy hình thành bào tử là chất tương tự nucleobazơ, axit hữu cơ, axit amin, hợp chất amoni, hợp chất axit nitric, hợp chất axit nitơ hoặc khoáng chất.

[9] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [6] đến [8], trong đó chất thúc đẩy hình thành bào tử là ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm decoyinin, mizoribin, mycophenol, 6-azauraxil, axit lactic và muối của nó, axit axetic và muối của nó, axit butyric và muối của nó, mangan, amoni, canxi,

alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, xystein, glutamin, axit glutamic, glyxin, histidin, isoloxin, loxin, lysin, methionin, phenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, tyrosin, valin, amoni lactat, và amoni axetat.

[10] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [6] đến [9], trong đó chất thúc đẩy hình thành bào tử được bổ sung ở nồng độ là 10ppm đến 10.000ppm vào môi trường.

[11] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [10], trong đó vi khuẩn sinh bào tử là vi khuẩn *Bacillus*.

[12] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử theo mục [11], trong đó vi khuẩn *Bacillus* được chọn từ *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus simplex*, *Bacillus lentus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus alvei*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus lautus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus pichinotyi*, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus alkalicola*, *Bacillus azotoformans*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus badius*, *Bacillus bataviensis*, *Bacillus cycloheptanicus*, *Bacillus aneurinilyticus*, *Bacillus migulanus*, *Bacillus abyssalis*, *Bacillus aestuarii*, *Bacillus polymyxa*, và *Bacillus sp.*

[13] Phương pháp sản xuất chất hữu ích, bao gồm sản xuất chất hữu ích bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [12].

[14] Phương pháp sản xuất chất hữu ích theo mục [13], trong đó chất hữu ích là bào tử của vi khuẩn sinh bào tử.

[15] Phương pháp sản xuất chất hữu ích theo mục [13], trong đó chất hữu ích là chất chuyển hóa của vi khuẩn sinh bào tử.

[16] Phương pháp sản xuất theo mục [15], trong đó chất chuyển hóa là lipopeptit vòng.

[17] Phương pháp sản xuất theo mục [16], trong đó lipopeptit vòng là ít nhất một lipopeptit vòng được chọn từ nhóm bao gồm iturin, surfactin, plipastatin, fengyxin,

baxilomyxin, lichenysin, kurstakin, mycosubtilin, colistin, fusarixidin, paenibacterin, polymyxin, và pumilaxidin.

Hiệu quả của sáng chế

Vi khuẩn sinh bào tử bật các quá trình trao đổi chất từ sự sinh trưởng ở dạng các tế bào sinh dưỡng đến hình thành bào tử nhờ gây cảm giác rút các chất dinh dưỡng ra và gây cảm giác mật độ. Phương pháp của sáng chế giữ cho khoảng thời gian sinh trưởng sinh dưỡng lâu hơn bình thường nhờ ức chế việc bật trao đổi chất để hình thành bào tử một cách độc lập từ các kỹ thuật thông thường là làm tăng nồng độ môi trường, đạt đến nồng độ các tế bào sinh dưỡng cao hơn và nồng độ các chất chuyển hóa cao hơn. Hơn nữa, bằng cách bổ sung chất thúc đẩy hình thành bào tử và loại bỏ của chất ức chế này, và đảm bảo khoảng thời gian nuôi cấy đủ dài, phương pháp này cho phép tạo ra các bào tử, và có thể làm tăng mạnh năng suất bào tử cuối cùng và năng suất của các chất hữu ích như các chất chuyển hóa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử của sáng chế bao gồm nuôi cấy vi khuẩn sinh bào tử trong môi trường mà chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung vào môi trường này, trong đó môi trường này có hàm lượng cacbon là 9,1g/l hoặc lớn hơn.

Các bào tử của vi khuẩn sinh bào tử và các chất hữu ích như các chất chuyển hóa có thể thu được với năng suất khá lớn bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tạo ra bào tử của sáng chế.

Trong sáng chế, loại vi khuẩn sinh bào tử không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ của nó bao gồm vi khuẩn *Bacillus*, vi khuẩn *Paenibacillus*, vi khuẩn *Geobacillus*, vi khuẩn *Clostridium*, và vi khuẩn *Sporosarcina*.

Các ví dụ về vi khuẩn *Bacillus* không bị giới hạn cụ thể miễn là chúng là vi khuẩn được xếp vào giống *Bacillus*, và bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus simplex*, *Bacillus lentus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus alvei*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus*

circulans, *Bacillus siamensis*, *Bacillus lautus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus pichinotyi*, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus alkalicola*, *Bacillus azotoformans*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus badius*, *Bacillus bataviensis*, *Bacillus cycloheptanicus*, *Bacillus aneurinilyticus*, *Bacillus migulanus*, *Bacillus abyssalis*, *Bacillus aestuarii*, *Bacillus polymyxa*, và *Bacillus sp.*

Các ví dụ về vi khuẩn *Paenibacillus* bao gồm *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Paenibacillus peoriae*, và *Paenibacillus elgii*.

Các ví dụ về vi khuẩn *Geobacillus* bao gồm *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Geobacillus caldoxylosilyticus*, và *Geobacillus stearothermophilus*.

Các ví dụ về vi khuẩn *Clostridium* bao gồm *Clostridium butyricum*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium aminobutyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium ljungdahlii*, và *Clostridium botulinum*.

Các ví dụ về vi khuẩn *Sporosarcina* bao gồm *Sporosarcina pasteurii*, *Sporosarcina ureae*, *Sporosarcina psychrophila*, và *Sporosarcina thermotolerans*.

Vi khuẩn sinh bào tử như vi khuẩn *Bacillus* có thể không phải vi khuẩn tái tổ hợp hoặc vi khuẩn tái tổ hợp, và tốt hơn là vi khuẩn không mang gen kháng kháng sinh.

Trong sáng chế, thuật ngữ (các) “chất hữu ích” chỉ các chất thể hiện hoạt tính sinh học như tác dụng thúc đẩy sinh trưởng của động vật và thực vật, tác dụng diệt vi khuẩn, kìm hãm vi khuẩn, và tác dụng hoạt hóa các gen, các chất có khả năng ứng dụng trong công nghiệp như các enzyme khác nhau, các axit lactic, và các axit amin, và các sản phẩm lên men của chúng được sử dụng làm thực phẩm như đậu tương và sữa chua lên men. Các ví dụ cụ thể của nó bao gồm các bào tử của vi khuẩn sinh bào tử và các chất chuyển hóa của vi khuẩn *Bacillus*. Các chất chuyển hóa của vi khuẩn *Bacillus* là các hợp phần hoạt hóa ngoài các tế bào sống, mà được sản xuất nhờ nuôi cấy, và các ví dụ của nó bao gồm các peptit vòng có hoạt tính kháng sinh và hoạt tính bề mặt và các enzym như proteaza và lipaza.

Các ví dụ về lipopeptit vòng tức là chất chuyển hóa của vi khuẩn *Bacillus* bao gồm ít nhất một lipopeptit vòng được chọn từ nhóm bao gồm iturin, surfactin, plipastatin, fengyxin, baxilomyxin, lichenysin, kurstakin, mycosubtilin, colistin, fusarixidin, paenibacterin, polymyxin và pumilaxidin.

Môi trường lỏng được sử dụng để nuôi cấy chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ. Các ví dụ về nguồn cacbon có thể dị hóa mà có thể được dị hóa bởi vi khuẩn sinh bào tử như vi khuẩn *Bacillus* bao gồm các đường (như tinh bột, glucoza, lactoza, glyxerol, arabinoza, riboza, xyloza, galactoza, fructoza, manosa, inositol, manitol, sorbitol, glucosamin, N-axetylglucosamin, xelobioza, maltoza, sucroza, trehaloza, và xylitol) hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường, các rượu, các axit hữu cơ, các muối của axit hữu cơ, các alkan hoặc các nguồn cacbon nói chung khác. Các ví dụ về nguồn nitơ có thể dị hóa mà có thể được dị hóa bởi vi khuẩn sinh bào tử như vi khuẩn *Bacillus* bao gồm các thành phần có nguồn gốc từ đậu tương, các thành phần có nguồn gốc từ nấm men, các thành phần có nguồn gốc từ ngô, các protein động vật và thực vật và các sản phẩm dị hóa của nó, các muối amoni như amoni nitrat, amoni sulfat, amoni clorua, và amoni axetat, amoniac, natri nitrat, kali nitrat, natri glutamat, và ure.

Hàm lượng cacbon trong môi trường lỏng được sử dụng trong sáng chế tốt hơn là bằng 9,1g/l hoặc lớn hơn, tốt hơn là bằng 10,2g/l hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là bằng 15g/l hoặc lớn hơn. Ngoài ra tốt hơn, hàm lượng cacbon tốt hơn là bằng 18g/l hoặc lớn hơn.

Hàm lượng của cacbon tức là nguyên liệu thô tự nhiên trong các thành phần môi trường có thể được tính toán sơ bộ là 40% trọng lượng của tổng lượng đường và 50% trọng lượng của tổng lượng protein. Tổng lượng đường có thể được xác định là nồng độ đường bằng phương pháp Somogyi sau khi 2,5 giờ thủy phân trong axit ở 100°C. Tổng lượng protein có thể được tính toán sơ bộ bằng cách xác định tổng lượng nitơ bằng phương pháp Kjeldahl và sau đó nhân lượng này với hệ số chuyển đổi, 6,25.

Khi nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường thấp, sự hình thành bào tử bắt đầu khi nguồn cacbon được rút ra. Trong trường hợp này, khi chất ức chế (làm chậm) sự hình thành bào tử được bổ sung, các tế bào vi khuẩn ở trạng thái sinh dưỡng bị đặt vào tình trạng các thành phần dinh dưỡng được rút ra trong thời gian dài. Do đó,

tăng số lượng các tế bào sinh dưỡng chết so với trường hợp không bổ sung chất ức chế sự hình thành bào tử, dẫn đến hiệu suất nuôi cấy giảm (tài liệu phi sáng chế 4 rơi vào trường hợp này). Mặt khác, khi nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường đủ cao, sự hình thành bào tử bắt đầu nhờ gây cảm giác mật độ hoặc tương tự, khi các tế bào sinh dưỡng lớn lên. Trong trường hợp này, khi chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung, giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng dài hơn giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng trong trường hợp không bổ sung chất ức chế sự hình thành bào tử. Nói chung, các tế bào sinh dưỡng lớn lên đến một mức độ lớn hơn đáng kể so với mật độ của các tế bào tạo ra các bào tử nhờ gây cảm giác mật độ v.v., dẫn đến hiệu suất nuôi cấy của các tế bào và các chất chuyển hóa tăng.

Trong khi đó, giới hạn trên của hàm lượng cacbon trong môi trường lỏng không bị giới hạn cụ thể. Chẳng hạn, hàm lượng cacbon tốt hơn là 100g/l hoặc nhỏ hơn và tốt hơn nữa là 72g/l hoặc nhỏ hơn.

Trong sáng chế, môi trường lỏng mà tốt hơn được sử dụng để nuôi cấy có tỷ lệ C/N (tỷ lệ trọng lượng của hàm lượng cacbon đối với hàm lượng nitơ) là 3 đến 12.

Tỷ lệ C/N được tính là như sau: tỷ lệ C/N = tổng của các hàm lượng cacbon trong mỗi thành phần môi trường/tổng của các hàm lượng nitơ trong mỗi thành phần môi trường.

Các thành phần môi trường khác, như các muối kim loại vết thường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn sinh bào tử như vi khuẩn *Bacillus*, có thể được bổ sung miễn là chúng không gây ảnh hưởng bất lợi đến sự hình thành bào tử và năng suất của các chất chuyển hóa đích, và nếu cần, các axit amin hoặc các vitamin có thể được bổ sung, chẳng hạn.

Trong phương pháp của sáng chế, chất ức chế (làm chậm) sự hình thành bào tử được bổ sung vào môi trường và vi khuẩn sinh bào tử được nuôi cấy. Chất ức chế sự hình thành bào tử có thể là chất bất kỳ có khả năng ức chế sự hình thành bào tử của vi khuẩn sinh bào tử như vi khuẩn *Bacillus*, và các ví dụ của nó bao gồm các chất ức chế enzym. Cụ thể, lincomyxin, erythromyxin, rifampixin, cloramphenicol, streptomycin, cafein, axit cafeic, actinomycin, axit fusidic, lipiarmyxin, puromycin, spectinomycin, tetracyclin, và thiostrepton có thể được sử dụng.

Nhiều chất ức chế trong số các chất ức chế này thể hiện hiệu quả ức chế sinh trưởng của các tế bào sinh dưỡng ở các nồng độ nhất định. Tuy nhiên, khi được sử dụng ở các nồng độ thấp hơn các nồng độ này đáng kể, các chất ức chế này ức chế sự hình thành bào tử trong khi hầu như không thể hiện hiệu quả ức chế sự sinh trưởng của các tế bào sinh dưỡng.

Trong phương pháp của sáng chế, nồng độ của chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung vào môi trường tốt hơn bằng hoặc thấp hơn nồng độ ức chế sinh trưởng của chất mà vi khuẩn sinh bào tử bị ức chế sinh trưởng ở đó, và tốt hơn là 15 ppm hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là 10 ppm hoặc nhỏ hơn, chẳng hạn. Trong khi đó, giới hạn dưới của nồng độ này có thể là nồng độ mà ở nồng độ này chất ức chế sự hình thành bào tử có thể bộc lộ hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử, và tốt hơn là 0,01 ppm hoặc lớn hơn.

Chẳng hạn, nồng độ của lincomyxin tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,05 ppm đến 15 ppm, Ngoài ra tốt hơn là 0,05 ppm đến 1 ppm, và tốt hơn nữa là 0,05 ppm đến 0,75 ppm. Nồng độ của erythromyxin tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,05 ppm đến 1 ppm, nồng độ của rifampixin tốt hơn nằm trong khoảng từ 5 ppm đến 10 ppm, nồng độ của cloramphenicol tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,1 ppm đến 2 ppm, nồng độ của streptomycin tốt hơn nằm trong khoảng từ 5 ppm đến 15 ppm, nồng độ của cafein tốt hơn nằm trong khoảng từ 5 ppm đến 10 ppm, nồng độ của axit cafeic tốt hơn nằm trong khoảng từ 5 ppm đến 10 ppm, nồng độ của actinomycin tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,1 ppm đến 10 ppm, nồng độ của axit fusidic tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,1 ppm đến 10 ppm, nồng độ của lipiarmyxin tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,1 ppm đến 10 ppm, nồng độ của puromycin tốt hơn nằm trong khoảng từ tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,1 ppm đến 10 ppm, nồng độ của spectinomycin tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,1 ppm đến 10 ppm, nồng độ của tetracyclin tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,1 ppm đến 10 ppm, và nồng độ của thiostrepton tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,1 ppm đến 10 ppm.

Chất ức chế sự hình thành bào tử có thể chứa trong môi trường ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy hoặc có thể được bổ sung trong quá trình nuôi cấy. Khi được bổ sung trong quá trình nuôi cấy, chất ức chế sự hình thành bào tử tốt hơn là được bổ sung tại

một thời điểm trong khoảng thời gian từ 0 giờ đến 10 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, chẳng hạn.

Với sự có mặt của chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung, vi khuẩn sinh bào tử như vi khuẩn *Bacillus* tốt hơn được nuôi cấy cho đến khi nồng độ tế bào vi khuẩn đạt đến nồng độ cao như 1×10^8 /ml hoặc lớn hơn, và cụ thể hơn, tốt hơn được nuôi cấy trong 5 đến 80 giờ.

Sự hình thành bào tử có thể được thúc đẩy nhờ nuôi cấy thời gian dài với sự có mặt của chất ức chế sự hình thành bào tử. Chẳng hạn, trong trường hợp lincomycin, sự hình thành bào tử có thể được thúc đẩy khoảng 40 đến 80 giờ nuôi cấy sau khi bổ sung 0,05 ppm đến 0,5 ppm lincomycin. Trong trường hợp cloramphenicol, sự hình thành bào tử có thể được thúc đẩy khoảng 40 đến 80 giờ nuôi cấy sau khi bổ sung 0,1 ppm đến 0,5 ppm cloramphenicol. Trong trường hợp erythromycin, sự hình thành bào tử có thể được thúc đẩy khoảng 40 đến 80 giờ nuôi cấy sau khi bổ sung 0,05 ppm đến 0,2 ppm erythromycin.

Trong phương pháp của sáng chế, các tế bào sinh dưỡng được nuôi cấy theo phương pháp sao cho nồng độ cao với sự có mặt của chất ức chế sự hình thành bào tử, và sau đó chất thúc đẩy hình thành bào tử có thể được bổ sung. Do đó, sự hình thành bào tử có thể thúc đẩy.

Ở đây, chất thúc đẩy hình thành bào tử có thể là chất bất kỳ có khả năng thúc đẩy sự hình thành bào tử của vi khuẩn sinh bào tử như vi khuẩn *Bacillus*, và các ví dụ của nó bao gồm các chất tương tự nucleobazơ, các axit hữu cơ, các axit amin, các hợp chất amoni, các hợp chất axit nitric, các hợp chất axit nitơ, và các khoáng chất. Các ví dụ cụ thể hơn của nó bao gồm decoyinin, mizoribin, mycophenol, 6-azauraxil, axit lactic và muối của nó, axit axetic và muối của nó, axit butyric và muối của nó, mangan, amoni, canxi, alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, cystein, glutamin, axit glutamic, glyxin, histidin, isoleuxin, loxin, lysin, methionin, phenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, tyrosin, valin, amoni lactat, và amoni axetat.

Việc bổ sung chất thúc đẩy hình thành bào tử trong khi hoặc sau khi các tế bào sinh dưỡng sinh trưởng là hiệu quả. Do đó, chất thúc đẩy hình thành bào tử tốt hơn được bổ sung khi nồng độ tế bào vi khuẩn là 1×10^8 /ml hoặc lớn hơn. Chẳng hạn, chất

thúc đẩy hình thành bào tử tốt hơn được bổ sung sau 5 đến 70 giờ nuôi cấy với sự có mặt của chất ức chế sự hình thành bào tử, và chẳng hạn, chất thúc đẩy hình thành bào tử mong muốn được bổ sung tại một thời điểm trong khoảng thời gian từ 5 giờ đến 70 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy.

Khoảng 10 đến 30 giờ nuôi cấy với sự có mặt của chất thúc đẩy hình thành bào tử, có thể thu được các bào tử có thể ở nồng độ cao, chẳng hạn.

Về nồng độ của chất thúc đẩy hình thành bào tử, chẳng hạn, nồng độ của decoyinin tốt hơn nằm trong khoảng từ 10ppm đến 1000ppm, nồng độ của mizoribin tốt hơn nằm trong khoảng từ 10ppm đến 1000ppm, nồng độ của mycophenol tốt hơn nằm trong khoảng từ 10ppm đến 1000ppm, nồng độ của 6-azauraxil tốt hơn nằm trong khoảng từ 10ppm đến 1000ppm, nồng độ của axit lactic tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của axit axetic tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của axit butyric tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của mangan tốt hơn nằm trong khoảng từ 100ppm đến 1000ppm, nồng độ của amoni tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của canxi tốt hơn nằm trong khoảng từ 100ppm đến 1000ppm, nồng độ của alanin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của arginin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của asparagin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của axit aspartic tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của xystein tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của glutamin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của axit glutamic tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của glyxin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của histidin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của isoloxin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của loxin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của lysin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của methionin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của phenylalanin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của prolin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của serin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của threonin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm.

10.000ppm, nồng độ của tryptophan tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, nồng độ của tyrosin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm, và nồng độ của valin tốt hơn nằm trong khoảng từ 500ppm đến 10.000ppm.

Các điều kiện khác nhau khác bao gồm bình nuôi cấy, các chế phẩm môi trường, nồng độ, nhiệt độ, độ pH và các nồng độ oxy, v.v., có thể là các điều kiện được sử dụng đối với môi trường lỏng nói chung của vi khuẩn sinh bào tử như vi khuẩn *Bacillus*. Chẳng hạn, vi khuẩn được nuôi cấy ở 20°C đến 40°C ở các điều kiện hiếu khí (ví dụ, nồng độ oxy là 15% đến 50%) cùng với khuấy. Độ pH của môi trường tốt hơn nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, và tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0.

Theo cách này, có thể thu được các tế bào của vi khuẩn sinh bào tử như vi khuẩn *Bacillus* có tỷ lệ hình thành bào tử cao (ví dụ, 50% hoặc lớn hơn, tốt hơn 80% hoặc lớn hơn) và các chất chuyển hóa của vi khuẩn *Bacillus*. Các tế bào của vi khuẩn sinh bào tử như vi khuẩn *Bacillus* có tỷ lệ hình thành bào tử cao và các chất chuyển hóa của vi khuẩn *Bacillus* có thể được sử dụng cho các mục đích mong muốn sau quá trình thích hợp như ngưng tụ hoặc loại bỏ, làm khô, môi trường và quá trình tương tự.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết dưới đây với sự tham khảo các ví dụ, nhưng không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1

<Sinh trưởng ở nồng độ cao (*Bacillus subtilis*) bằng cách ức chế sự hình thành bào tử>

Sử dụng bình Erlenmeyer dung tích 500ml (có vách ngăn), Mỗi 100ml môi trường nêu ở bảng 1 được chuẩn bị và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp. Glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng để tránh phản ứng Maillard.

Các hàm lượng cacbon của glucoza, bột đậu tương đã loại mỡ, dịch chiết ngô cô đặc, và chất chiết nấm men trong các thành phần môi trường mỗi loại được tính là 40% trọng lượng của tổng lượng đường và 50% trọng lượng của tổng lượng protein. Tổng lượng đường được tìm ra bằng cách xác định nồng độ đường khử bằng phương pháp Somogyi sau 2,5 giờ thủy phân trong axit ở 100°C. Tổng lượng protein được tìm

ra bằng cách xác định tổng lượng nitơ bằng phương pháp Kjeldahl, và sau đó nhân lượng này với hệ số chuyển đổi, 6,25.

Bảng 1. Chế phẩm môi trường

Thành phần	Nhà sản xuất	Nồng độ (g/l)
Glucosa	Wako Pure Chemicals	12,500
Bột đậu tương đã loại mỡ	Ajinomoto Healthy Supply	10,000
Dịch chiết ngô cô đặc	Roquette	2,500
Chất chiết nấm men	Difco	2,000
MnCl ₂ • 4H ₂ O	Wako Pure Chemicals	0,090
NaCl	Wako Pure Chemicals	0,500
KH ₂ PO ₄	Wako Pure Chemicals	0,250
MgSO ₄ • 7H ₂ O	Wako Pure Chemicals	0,313
CaCl ₂	Wako Pure Chemicals	0,094
FeSO ₄	Wako Pure Chemicals	0,00019
Hàm lượng cacbon		9,1
Hàm lượng nitơ		1,1

Các phần thử nghiệm được thiết lập như được thể hiện ở bảng 2. Theo các điều kiện của mỗi phần thử nghiệm, dung dịch nước được khử trùng nhờ máy lọc của mỗi chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung vô trùng vào mỗi môi trường. Một vòng đủ của *Bacillus subtilis* MBI-600 được lấy từ khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường thạch dinh dưỡng, được cấy, và sau đó được nuôi cấy cùng với lắc ở 30°C và 150 vòng/phút trong 64 giờ.

Từng chất lỏng nuôi cấy thu được theo cách đó được pha loãng 10 lần bằng nước vô trùng, và sau đó nồng độ tế bào vi khuẩn (các tế bào sinh dưỡng và các bào tử) và tỷ lệ hình thành bào tử (nồng độ bào tử/nồng độ tế bào vi khuẩn) đo được sử dụng kính hiển vi quang học và máy đếm tế bào vi khuẩn. Các kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm

Thử nghiệm số	Chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung	Nồng độ (ppm)	Nồng độ tế bào vi khuẩn (/ml)	Tỷ lệ hình thành bào tử	Nồng độ bào tử (/ml)
1	-	-	3,2e+9	87%	2,8e+9
2	Lincomyxin	0,1	4,7e+9	100%	4,7e+9

3	Lincomyxin	1,0	7,0e+9	0%	—
4	Erythromyxin	0,1	3,5e+9	80%	2,8e+9
5	Erythromyxin	1,0	6,2e+9	0%	—
6	Streptomycin	12,5	4,3e+9	100%	4,3e+9
7	Streptomycin	15,0	5,5e+9	54%	3,0e+9

Hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử không quan sát được ở phần thử nghiệm với nồng độ lincomyxin là 0,1 ppm, tuy nhiên, hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử quan sát được ở phần thử nghiệm với nồng độ lincomyxin là 1 ppm. Trong khi đó, nồng độ tế bào vi khuẩn có xu hướng tăng do nồng độ lincomyxin tăng.

Tương tự, hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử không quan sát được ở phần thử nghiệm với nồng độ erythromyxin là 0,1 ppm, tuy nhiên, hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử quan sát được ở phần thử nghiệm với nồng độ erythromyxin là 1 ppm. Hơn nữa, nồng độ tế bào vi khuẩn có xu hướng tăng do nồng độ erythromyxin tăng.

Hơn nữa, hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử không quan sát được ở phần thử nghiệm với nồng độ streptomycin là 12,5 ppm, tuy nhiên, hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử quan sát được ở phần thử nghiệm với nồng độ streptomycin là 15,0 ppm. Trong khi đó, nồng độ tế bào vi khuẩn có xu hướng tăng khi nồng độ streptomycin tăng.

Ví dụ 2

< Sinh trưởng ở nồng độ cao của các tế bào sinh dưỡng nhờ ức chế sự hình thành bào tử và sản sinh các bào tử ở mức cao (*Bacillus subtilis*) nhờ kích thích sự hình thành bào tử >

Sử dụng bình Erlenmeyer dung tích 500ml (có vách ngăn), Mỗi 100ml của môi trường nêu ở bảng 1 được chuẩn bị và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp. Lưu ý là glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng để tránh phản ứng Maillard.

Các phần thử nghiệm được thiết lập như được mô tả trong bảng 3. Theo các điều kiện của mỗi phần thử nghiệm, dung dịch nước được khử trùng nhờ máy lọc chứa mỗi chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung vô trùng vào mỗi môi trường. Theo các điều kiện của mỗi phần thử nghiệm, một vòng của *Bacillus subtilis* MBI-600 được

lấy từ khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường thạch dinh dưỡng, được cấy, và sau đó được nuôi cấy cùng với lắc ở 30°C và 150 vòng/phút.

Mười sáu (16) giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, mỗi chất thúc đẩy hình thành bào tử được bổ sung theo các điều kiện của mỗi phần thử nghiệm, tiếp tục nuôi cấy. Bốn mươi năm (45) giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy thì ngừng nuôi cấy.

Từng chất lỏng nuôi cấy thu được theo cách đó được pha loãng 10 lần bằng nước vô trùng, và sau đó nồng độ tế bào vi khuẩn (các tế bào sinh dưỡng và các bào tử) và tỷ lệ hình thành bào tử (nồng độ bào tử/nồng độ tế bào vi khuẩn) đo được sử dụng kính hiển vi quang học và máy đếm tế bào vi khuẩn. Các kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm

Thử nghiệm số	Chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung	Nồng độ (ppm)	Chất thúc đẩy hình thành bào tử được bổ sung	Nồng độ (ppm)	Nồng độ tế bào vi khuẩn (/ml)	Tỷ lệ hình thành bào tử	Nồng độ bào tử (/ml)
1	-	-	-	-	3,2e+9	87%	2,8e+9
2	-	-	Amoni lactat	3000	5,2e+9	91%	4,8e+9
3	-	-	Amoni axetat	3000	4,6e+9	91%	4,2e+9
4	Lincomyxin	0,3	-	-	3,3e+9	80%	2,7e+9
5	Lincomyxin	0,5	-	-	4,4e+9	0%	-
6	Lincomyxin	1,0	-	-	5,1e+9	0%	-
7	Lincomyxin	2,0	-	-	5,9e+9	0%	-
8	Lincomyxin	0,3	Amoni lactat	3000	5,6e+9	91%	5,1e+9
9	Lincomyxin	0,5	Amoni lactat	3000	7,2e+9	79%	5,7e+9
10	Lincomyxin	0,5	Amoni axetat	2000	6,4e+9	64%	4,1e+9
11	Lincomyxin	0,5	Amoni axetat	3000	7,6e+9	71%	5,4e+9
12	Lincomyxin	0,5	Amoni axetat	4000	8,4e+9	72%	6,1e+9
13	Cloramphenicol	1,4	-	-	5,4e+9	0%	-
14	Cloramphenicol	1,4	Decoyinin	200	5,4e+9	76%	4,1e+9

Hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử không quan sát được ở phần thử nghiệm với nồng độ lincomyxin là 0,3ppm, tuy nhiên, hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử quan sát được ở phần thử nghiệm với nồng độ lincomyxin là 0,5ppm hoặc lớn hơn. Hơn nữa, nồng độ tế bào vi khuẩn có xu hướng tăng khi nồng độ lincomyxin tăng.

Ở các phần thử nghiệm trong đó amoni lactat được bổ sung làm chất thúc đẩy hình thành bào tử, sự cải thiện quan sát được ở tỷ lệ hình thành bào tử bất kể nồng độ lincomyxin, khác với các phần thử nghiệm trong đó không bổ sung chất này. Đặc biệt ở các phần thử nghiệm với nồng độ lincomyxin là 0,3ppm và 0,5ppm, trong đó amoni lactat được bổ sung, năng suất bào tử cao hơn đáng kể năng suất bào tử ở các phần thử nghiệm trong đó không bổ sung chất này.

Ở các phần thử nghiệm với nồng độ lincomyxin là 0,5ppm, trong đó amoni axetat được bổ sung, quan sát được xu hướng nồng độ tế bào vi khuẩn và tỷ lệ hình thành bào tử tăng khi lượng của amoni axetat được bổ sung tăng. Năng suất bào tử cũng cao hơn đáng kể ở tất cả các phần thử nghiệm này so với năng suất bào tử của các phần thử nghiệm trong đó không bổ sung chất này.

Ở phần thử nghiệm với nồng độ cloramphenicol là 1,4ppm, quan sát được hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử. Tuy nhiên, ở phần thử nghiệm trong đó decoyinin được bổ sung trong quá trình nuôi cấy khi bổ sung vào cloramphenicol, sự cải thiện về tỷ lệ hình thành bào tử quan sát được. Năng suất bào tử được cải thiện ở cả hai phần thử nghiệm lớn hơn năng suất bào tử của các phần thử nghiệm trong đó không bổ sung chất này.

Ví dụ 3

<Sự sinh trưởng ở nồng độ cao của các tế bào sinh dưỡng nhờ ức chế sự hình thành bào tử và sản sinh các bào tử ở mức cao (*Bacillus thuringiensis*)>

Sử dụng bình Erlenmeyer dung tích 500ml (có vách ngăn), mỗi 100ml của môi trường nêu ở bảng 1 được chuẩn bị và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp. Lưu ý là glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng để tránh phản ứng Maillard.

Các phần thử nghiệm được thiết lập như được thể hiện ở bảng 4. Theo các điều kiện của mỗi phần thử nghiệm, dung dịch nước được khử trùng nhờ máy lọc chứa mỗi chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung vô trùng vào mỗi môi trường. Theo các điều kiện của mỗi phần thử nghiệm, một vòng của chủng *Bacillus thuringiensis* NBRC 101235 được lấy từ khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường thạch dinh dưỡng, được cấy, và sau đó được nuôi cấy cùng với lắc ở 30°C và 150 vòng/phút trong 40 giờ.

Từng chất lỏng nuôi cấy thu được theo cách đó được pha loãng 10 lần bằng nước vô trùng, và sau đó nồng độ tế bào vi khuẩn (các tế bào sinh dưỡng và các bào tử) và tỷ lệ hình thành bào tử (nồng độ bào tử/nồng độ tế bào vi khuẩn) đo được sử dụng kính hiển vi quang học và máy đếm tế bào vi khuẩn. Các kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm

Thử nghiệm số	Chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung	Nồng độ (ppm)	Nồng độ tế bào vi khuẩn (/ml)	Tỷ lệ hình thành bào tử	Nồng độ bào tử (/ml)
1	-	-	1,0e+9	54%	5e+8
2	Lincomyxin	5,0	1,4e+9	86%	1,2e+9
3	Lincomyxin	10,0	1,4e+9	71%	1,0e+9
4	Lincomyxin	12,5	9e+8	13%	1e+8
5	Cloramphenicol	2,0	1,6e+9	79%	1,3e+9
6	Cloramphenicol	6,0	8e+6	0%	-
7	Erythromyxin	0,05	1,5e+9	73%	1,1e+9
8	Erythromyxin	0,1	2,0e+9	16%	3e+8

Hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử được xác nhận ở phần thử nghiệm với nồng độ lincomyxin là 12,5ppm. Mặt khác, ở các phần thử nghiệm với nồng độ lincomyxin là 10,0ppm hoặc nhỏ hơn, nồng độ tế bào vi khuẩn và nồng độ bào tử có xu hướng tăng.

Ở phần thử nghiệm với nồng độ cloramphenicol là 6,0ppm, sinh trưởng và hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử được xác nhận. Mặt khác, ở phần thử nghiệm với cùng nồng độ là 2,0ppm, nồng độ tế bào vi khuẩn và nồng độ bào tử có xu hướng tăng.

Ở phần thử nghiệm với nồng độ erythromyxin là 0,1ppm, hiệu quả ức chế sự hình thành bào tử được xác nhận. Mặt khác, ở phần thử nghiệm với nồng độ erythromyxin là 0,05ppm, nồng độ tế bào vi khuẩn và nồng độ bào tử có xu hướng tăng.

Nồng độ tế bào vi khuẩn tăng nhờ bổ sung của lượng kháng sinh nhất định, và năng suất bào tử được cải thiện nhờ thời gian nuôi cấy đủ (40 giờ) mà không bổ sung bất kỳ chất thúc đẩy hình thành bào tử.

Ví dụ 4

<Sản xuất surfactin (*Bacillus subtilis*) ở hàm lượng cao nhờ ức chế sự hình thành bào tử>

Sử dụng bình Erlenmeyer dung tích 500ml (có vách ngăn), mỗi 100ml của môi trường nêu ở bảng 5 được chuẩn bị và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp. Lưu ý là glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng để tránh phản ứng Maillard.

Các phần thử nghiệm được thiết lập như được thể hiện ở bảng 6. Theo các điều kiện của mỗi phần thử nghiệm, dung dịch nước được khử trùng nhờ máy lọc của mỗi chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung vô trùng vào mỗi môi trường. Theo các điều kiện của mỗi phần thử nghiệm, một vòng của chủng *Bacillus subtilis* MBI-600 được lấy từ khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường thạch dinh dưỡng, được cấy, và sau đó được nuôi cấy cùng với lắc ở 30°C và 150 vòng/phút.

Bảng 5. Chế phẩm môi trường

Thành phần	Nhà sản xuất	Nồng độ (g/l)
Glucosa	Wako Pure Chemicals	25,000
Bột đậu tương đã loại mỡ	Ajinomoto Healthy Supply	20,000
Dịch chiết ngô cô đặc	Difco	5,000
Chất chiết thô men	Roquette	4,000
MnCl ₂ · 4H ₂ O	Difco	0,180
NaCl	Wako Pure Chemicals	1,000
KH ₂ PO ₄	Wako Pure Chemicals	0,500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Wako Pure Chemicals	0,625
CaCl ₂	Wako Pure Chemicals	0,188
FeSO ₄	Wako Pure Chemicals	0,00038
Hàm lượng cacbon		18,2
Hàm lượng nitơ		2,2

Năm mươi (50) giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy thì ngừng nuôi cấy.

Từng chất lỏng nuôi cấy thu được được ly tâm sử dụng máy ly tâm lạnh (TOMY SEIKO Co., Ltd. MX-307) ở tốc độ 10.000 vòng/phút và 20°C trong 30 phút, bằng cách đó thu lấy lớp bề mặt.

3ml axetonitril chứa TFA 0,1% được bổ sung vào cột chiết pha rắn (Nihon Waters K.K. Oasis HLB 3cc (400mg) LP Extraction Cartridge) và được cho đi qua cột

này, và sau đó 3ml nước cất chứa TFA 0,1% được bổ sung để đi qua cột. Hai ml lớp bề mặt thu được nhờ ly tâm theo phương pháp đó của mỗi môi trường nuôi cấy được bổ sung để đi qua cột, 6ml nước cất chứa TFA 0,1%, và sau đó 3ml axetonitril chứa TFA 0,1%/nước cất (20:80, thể tích/thể tích) được cho đi qua cột lần lượt để rửa. Tiếp đó, 3ml axetonitril chứa TFA 0,1%/nước cất (90:10, thể tích/thể tích) được cho đi qua cột, bằng cách đó thu thập được nước giải hấp. Axetonitril chứa TFA 0,1%/nước cất (90:10, thể tích/thể tích) được bổ sung, để lượng dung dịch thu được là 4ml, và sau đó tiến hành phân tích HPLC ở các điều kiện sau.

HPLC: Agilent Technologies, Inc. 1260 Infinity

Cột: Nihon Waters K.K. XBridge C18 5 μ m 4,6 $\times$ 250 mm

Pha di động: A: nước cất chứa TFA 0,1%, B: axetonitril chứa TFA 0,1%

0 đến 5 phút A 80%/B 20%

5 đến 25 phút A 80%/B 20% $\rightarrow$ B 100%

25 đến 30 phút B 100%

30 đến 40 phút A 80%/B 20%

Tốc độ dòng chảy: 1 ml/phút

Nhiệt độ: 40°C

Bước sóng phát hiện: UV205 nm

Lượng phun: 20 μ l

Mẫu thực: Muối natri Surfactin (Wako Pure Chemicals)

Nồng độ: 30 ppm, 120 ppm

Dung môi: axetonitril chứa TFA 0,1%/nước cất (90:10, thể tích/thể tích)

Từng môi trường được so sánh với mẫu thực về diện tích đỉnh được phát hiện ở thời gian rửa giải là 27,6 phút và thời gian rửa giải là 28,4 phút, bằng cách đó tính toán được nồng độ surfactin trong môi trường nuôi cấy.

Các kết quả được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả thử nghiệm

Thử nghiệm số	Chất ức chế sự hình thành bào tử được bổ sung	Nồng độ (ppm)	Nồng độ tế bào vi khuẩn (/ml)	Tỷ lệ hình thành bào tử	Nồng độ bào tử (/ml)	Nồng độ surfactin (ppm)
1	-	-	5,8e+9	100%	5,8e+9	38,4
2	Erythromyxin	0,1	8,1e+9	99%	8,0e+9	58,5
3	Erythromyxin	0,2	6,9e+9	100%	6,9e+9	75,7

Ở các phần thử nghiệm với nồng độ erythromyxin là 0,1ppm và 0,2ppm, nồng độ bào tử và nồng độ surfactin có xu hướng tăng.

Nhờ sự bổ sung lượng kháng sinh nhất định, không chỉ năng suất của các bào tử mà cả năng suất của surfactin là chất hữu ích được cải thiện.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp nuôi cấy *Bacillus subtilis*, bao gồm bước nuôi cấy *Bacillus subtilis* trong 40 đến 80 giờ trong môi trường mà có hàm lượng cacbon bằng 9,1g/L hoặc lớn hơn và được bổ sung chất ức chế sự hình thành bào tử, và trong đó chất ức chế sự hình thành bào tử được chọn từ nhóm bao gồm từ 0,1 đến 0,3ppm lincomyxin, và từ 0,1 đến 0,2ppm erythromyxin.
2. Phương pháp nuôi cấy *Bacillus thuringiensis*, bao gồm bước nuôi cấy *Bacillus thuringiensis* trong 40 đến 80 giờ trong môi trường mà có hàm lượng cacbon bằng 9,1g/L hoặc lớn hơn và được bổ sung chất ức chế sự hình thành bào tử, và trong đó chất ức chế sự hình thành bào tử được chọn từ nhóm bao gồm từ 5,0 đến 10,0ppm lincomyxin, 0,05ppm erythromyxin, và 2,0ppm cloramphenicol.
3. Phương pháp nuôi cấy *Bacillus subtilis*, bao gồm nuôi cấy *Bacillus subtilis* trong 5 đến 70 giờ trong môi trường mà có hàm lượng cacbon bằng 9,1g/L hoặc lớn hơn và được bổ sung từ 0,3 đến 0,5ppm lincomyxin, và tiếp tục nuôi cấy *Bacillus subtilis* trong môi trường đã nêu mà trong đó chất thúc đẩy sự hình thành bào tử được chọn từ nhóm bao gồm từ 2000 đến 4000ppm amoni lactat, và từ 2000 đến 4000ppm amoni axetat được bổ sung.
4. Phương pháp sản xuất chất hữu ích, bao gồm bước tạo ra chất hữu ích bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
5. Phương pháp sản xuất theo điểm 4, trong đó chất hữu ích là bào tử của vi khuẩn sinh bào tử.
6. Phương pháp sản xuất theo điểm 4, trong đó chất hữu ích là chất chuyển hóa của vi khuẩn sinh bào tử.
7. Phương pháp sản xuất theo điểm 6, trong đó chất chuyển hóa là lipopeptit vòng.
8. Phương pháp sản xuất theo điểm 7, trong đó lipopeptit vòng là ít nhất một lipopeptit vòng được chọn từ nhóm bao gồm iturin, surfactin, plipastatin, fengyxin, bacillomycin, lichenysin, kurstakin, mycosubtilin, colistin, fusarixidin, paenibacterin, polymyxin, và pumilaxidin.