



(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)



1-0036446

(51)^{2020.01} C12N 1/00; C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2020-02033

(22) 25/09/2018

(86) PCT/JP2018/035361 25/09/2018

(87) WO 2019/059396 A1 28/03/2019

(30) 2017-183587 25/09/2017 JP

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/09/2020 390A

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

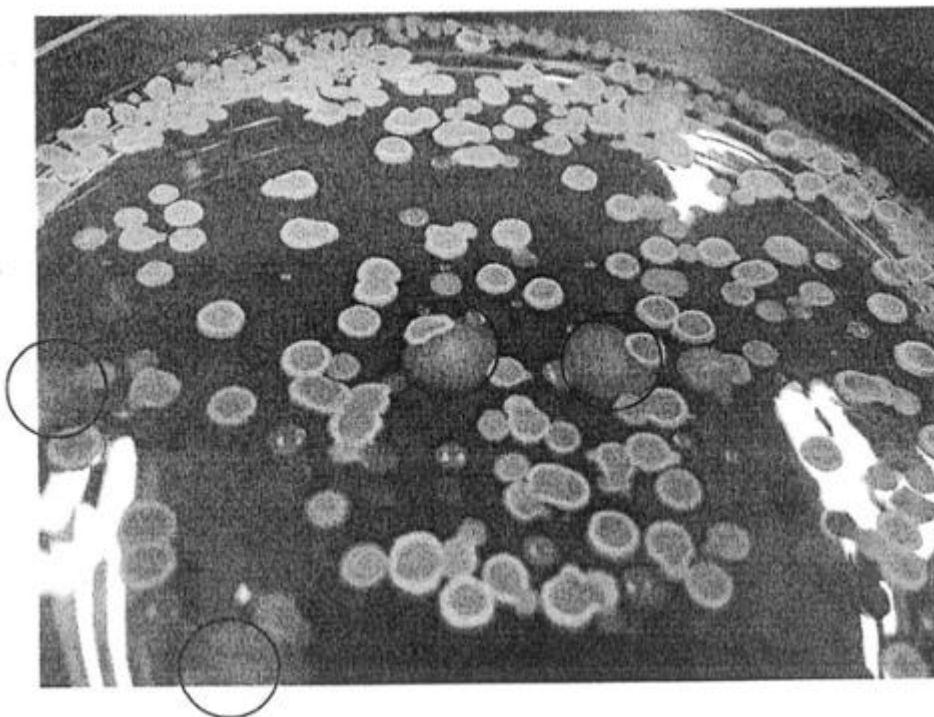
3 Kanda-Neribeicho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0022 Japan

(72) MORISHITA, Yasuyuki (JP).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT TẾ BÀO VI KHUẨN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng chứa kháng sinh ở giai đoạn trước giai đoạn cuối, và sau đó giảm nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối đến mức thấp hơn nồng độ kháng sinh ở giai đoạn trước trong quá trình nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn đối các vi khuẩn. Do đó, các tế bào vi khuẩn có thể được sản xuất với năng suất tốt trong khi ngăn chặn sự xuất hiện của các biến thể tạo ra các khuẩn lạc bất thường trong số các vi khuẩn thu được sau khi nuôi cấy.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn có năng suất tốt trong khi ngăn chặn sự xuất hiện và sinh trưởng của các biến thể tạo ra các khuẩn lạc bất thường, điều mà có thể xảy ra khi nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn các vi khuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các vi khuẩn được sử dụng trong các lĩnh vực khác nhau như sản xuất các enzym và các chất có ích, sản xuất các thực phẩm lên men, sự phân hủy của các chất hữu cơ, các thuốc dùng cho các rối loạn đường ruột, các thuốc trừ sâu vi sinh, và các phân bón vi sinh.

Trong lĩnh vực bất kỳ, để tạo ra các tế bào vi khuẩn bắt buộc phải nuôi cấy vi khuẩn. Tuy nhiên, có các trường hợp mà các biến thể có những bất thường về hình thái học khuẩn lạc xuất hiện trong khi nuôi cấy và phát triển ưu thế so với các tế bào có các đặc tính ban đầu, và do đó các tế bào mất đi các đặc tính có ích ban đầu sau khi kết thúc nuôi cấy.

Chẳng hạn, tài liệu phi sáng chế 1 mô tả hiện tượng quan sát được trong đó các biến thể có những bất thường về hình thái học khuẩn lạc v.v., xuất hiện khi trải qua vài nghìn thế hệ vi khuẩn *Bacillus* trong môi trường lỏng, và sinh trưởng hơn các tế bào gốc, nhờ đó hoàn toàn thay thế các tế bào gốc. Hiện tượng này được cho là do thực tế các biến thể được chuyên hóa trong môi trường nuôi cấy đặc hiệu để đào thải hệ thống chuyển hóa không cần thiết và sinh trưởng ưu thế so với các tế bào gốc.

Tài liệu phi sáng chế 2 mô tả là biến thể thiếu khả năng sinh tổng hợp, trong đó biến thể này thiếu hụt sinh tổng hợp Bacillomycin L và Surfactin, của chủng *Bacillus subtilis* 916, có hình thái học khuẩn lạc khác với hình thái của chủng kiểu đại. Bacillomycin L và Surfactin được biết là có hiệu quả kiểm soát đối với một số bệnh cây. Do đó, điều này được coi là ví dụ trong đó đột biến về hình thái học khuẩn lạc và sự mất các đặc tính có ích là có liên quan.

Hơn nữa, tài liệu phi sáng chế 3 mô tả ví dụ trong đó sự sản xuất lượng Itulin A tăng lên ở chủng có hình thái học khuẩn lạc biến đổi so với chủng bố mẹ trong quá trình nhân giống để làm tăng hoạt tính kháng khuẩn của chủng *Bacillus subtilis* G3.

Tài liệu phi sáng chế 4 mô tả là đối với chủng *Aneurinibacillus migulanus* (phân loại cũ: *Bacillus brevis*) ATCC 9999, sáu kiểu hình thái học khuẩn lạc được phát hiện ở chủng lưu giữ thu thập nhờ nuôi cấy và khác về năng suất Gramicidin S.

Tài liệu phi sáng chế 5 mô tả ví dụ trong đó hình thái học khuẩn lạc các chủng biến thể của chủng *Bacillus subtilis* VT30M và chủng *Bacillus licheniformis* VT3 có năng suất enzym và khả năng kháng kháng sinh khác với năng suất enzym và khả năng kháng kháng sinh của các chủng kiểu dại.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu phi sáng chế

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

Tài liệu phi sáng chế 2: Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015, 99, 4 1897-1910

Tài liệu phi sáng chế 3: Zhiwu Bingli Xuebao 2008, 38, 2, 185-191

Tài liệu phi sáng chế 4: Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73, 20, 6620-6628

Tài liệu phi sáng chế 5: Appl. Environ. Microbiol. 1989, 55, 3026-3028

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Như được mô tả ở trên, khi nuôi cấy lỏng, đặc biệt là nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn các vi khuẩn gặp phải vấn đề trong đó các biến thể có những bất thường về hình thái học khuẩn lạc xuất hiện trong khi nuôi cấy, sinh trưởng ưu thế so với các tế bào có các đặc tính ban đầu, và do đó các đặc tính có ích ban đầu của các tế bào có thể bị giảm sút sau khi kết thúc nuôi cấy. Cho đến nay kỹ thuật ngăn chặn hiện tượng này một cách hiệu quả vẫn chưa được báo cáo.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp mới để sản xuất các tế bào vi khuẩn có năng suất tốt trong khi ngăn chặn sự xuất hiện của các biến thể có những bất thường về hình thái học khuẩn lạc trong số các tế bào vi khuẩn thu được sau khi nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn đối với các vi khuẩn.

Kết quả của các nghiên cứu chuyên sâu để đạt được mục đích trên là, tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các tế bào vi khuẩn có thể được sản xuất với năng suất tốt trong khi làm giảm một cách đáng kể sự xuất hiện các biến thể có những bất thường về hình thái học khuẩn lạc từ trong số quần thể vi khuẩn thu được sau khi kết thúc nuôi cấy bằng cách nuôi cấy vi khuẩn sử dụng môi trường chứa kháng sinh ở giai đoạn trước giai đoạn cuối và sau đó giảm nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối đến mức thấp hơn nồng độ kháng sinh ở giai đoạn trước trong quá trình nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn. Do đó, tác giả sáng chế đã hoàn thành được sáng chế.

Sáng chế gồm các khía cạnh dưới đây.

[1] Phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn, bao gồm nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng chứa kháng sinh ở giai đoạn trước giai đoạn cuối, và sau đó giảm nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối đến mức thấp hơn nồng độ kháng sinh ở giai đoạn trước trong quá trình nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn đối với các vi khuẩn.

[2] Phương pháp theo mục [1], trong đó vi khuẩn là vi khuẩn tạo ra bào tử.

[3] Phương pháp theo mục [2], trong đó vi khuẩn tạo ra bào tử thuộc giống *Bacillus*.

[4] Phương pháp theo mục [3], trong đó vi khuẩn tạo ra bào tử được chọn từ nhóm 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.*.

[5] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó kháng sinh là ít nhất một kháng sinh được chọn từ nhóm bao gồm streptomycin, lincomycin, erythromycin, rifampicin, chloramphenicol, actinomycin, axit fusidic, lipiamycin, puromycin, spectinomycin, tetracyclin và thiostrepton.

[6] Phương pháp theo mục [5], trong đó kháng sinh là streptomycin.

[7] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó nồng độ kháng sinh trong môi trường lỏng ở giai đoạn trước giai đoạn cuối nằm trong khoảng từ 0,001 ppm đến 10.000 ppm.

[8] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó nồng độ kháng sinh trong môi trường lỏng ở giai đoạn trước giai đoạn cuối nằm trong khoảng từ 1,0 ppm đến 90 ppm.

[9] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn có sự giảm xuất hiện các biến thể tạo ra khuẩn lạc bất thường, bao gồm nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng chứa kháng sinh ở giai đoạn trước giai đoạn cuối, và sau đó giảm nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối đến mức thấp hơn nồng độ kháng sinh ở giai đoạn trước trong quá trình nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn đối với các vi khuẩn.

[10] Phương pháp ngăn chặn sự xuất hiện và sinh trưởng của các biến thể tạo ra khuẩn lạc bất thường trong khi nuôi cấy lỏng các vi khuẩn, bao gồm nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng chứa kháng sinh ở giai đoạn trước giai đoạn cuối, và sau đó giảm nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối đến mức thấp hơn nồng độ kháng sinh ở giai đoạn trước trong quá trình nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn đối với các vi khuẩn.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, kháng sinh chứa trong môi trường sử dụng để nuôi cấy nhiều giai đoạn để nuôi cấy các vi khuẩn, và sau đó lượng kháng sinh ở giai đoạn cuối bị giảm, để các tế bào vi khuẩn có thể được sản xuất với năng suất tốt trong khi giảm tỷ lệ các biến thể có những bất thường về hình thái học khuẩn lạc ở thời điểm kết thúc nuôi cấy lỏng các vi khuẩn. Các biến thể có những bất thường về hình thái học khuẩn lạc có khả năng mất đi các đặc tính mong muốn. Do đó, bằng cách làm giảm các biến thể như vậy, các tế bào vi khuẩn được nuôi cấy và thu được theo cách đó có thể được sử dụng ở tình trạng ưa thích hơn cho các ứng dụng như sản xuất các enzyme và các chất có ích, sản xuất các thực phẩm lên men, sự phân hủy của các chất hữu cơ, các thuốc dùng cho các rối loạn đường ruột, các thuốc trừ sâu vi sinh và các phân bón vi sinh.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Fig.1 là ảnh thể hiện ví dụ về các dạng của các khuẩn lạc bất thường. Các khuẩn lạc bất thường được biểu thị bằng ○.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, các loại vi khuẩn không bị giới hạn cụ thể. Miễn là vi khuẩn có thể được nuôi cấy bằng cách nuôi cấy lỏng và có khả năng tạo ra các khuẩn lạc trên môi trường rắn, vi khuẩn có thể là gram dương hoặc gram âm. Các ví dụ của nó bao gồm các vi khuẩn của giống *Escherichia*, các vi khuẩn của giống *Shigella*, các vi khuẩn của giống *Salmonella*, các vi khuẩn của giống *Klebsiella*, các vi khuẩn của giống *Yersinia*, các vi khuẩn của giống *Enterobacter*, các vi khuẩn của giống *Pseudomonas*, các vi khuẩn của giống *Brucella*, các vi khuẩn của giống *Staphylococcus*, các vi khuẩn của giống *Streptococcus*, các vi khuẩn của giống *Streptomyces*, các vi khuẩn của giống *Rhodococcus*, các vi khuẩn của giống *Acetobacterium*, các vi khuẩn của giống *Methanobacterium*, các vi khuẩn của giống *Enterococcus*, các vi khuẩn của giống *Bacillus*, các vi khuẩn của giống *Clostridium*, các vi khuẩn của giống *Corynebacterium*, và các vi khuẩn của giống *Mycobacterium*.

Trong các vi khuẩn này, các vi khuẩn tạo ra bào tử như các vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, giống *Paenibacillus*, giống *Geobacillus*, giống *Clostridium*, hoặc giống *Sporosarcina* được ưu tiên hơn.

Các ví dụ về các vi khuẩn của giống *Bacillus* không bị giới hạn cụ thể miễn là chúng được phân loại 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*

aneuriniycticus, *Bacillus migulanus*, *Bacillus abyssalis*, *Bacillus aestuarii*, *Bacillus polymyxa*, và *Bacillus sp.*

Các ví dụ về các vi khuẩn của giống *Paenibacillus* bao gồm *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Paenibacillus peoriata*, và *Paenibacillus elgi*.

Các ví dụ về các vi khuẩn của giống *Geobacillus* bao gồm *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Geobacillus caldxylosilyticus*, và *Geobacillus stearothermophilus*.

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

Vi khuẩn cần nuôi cấy theo phương pháp của sáng chế có thể là vi khuẩn không tái tổ hợp di truyền hoặc vi khuẩn tái tổ hợp di truyền, nhưng tốt hơn là những vi khuẩn tái tổ hợp không chứa gen kháng kháng sinh.

Hơn nữa, vi khuẩn cần nuôi cấy theo phương pháp của sáng chế có thể là chủng kiểu dại hoặc chủng biến đổi, nhưng ngay cả trường hợp chủng biến đổi, vi khuẩn tốt hơn là không có đột biến về kháng kháng sinh.

Phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn và phương pháp nuôi cấy vi khuẩn theo sáng chế bao gồm nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng chứa kháng sinh.

Môi trường lỏng có thể được chọn một cách thích hợp tùy thuộc vào loại vi khuẩn cần nuôi cấy, và môi trường lỏng thông thường chứa các thành phần môi trường như các nguồn cacbon và các nguồn nitơ ở các nồng độ thích hợp để nuôi cấy các vi khuẩn có thể được sử dụng.

Các ví dụ về các nguồn cacbon bao gồm đường (tinh bột, glucoza, lactoza, glyxerol, arabinoza, riboza, xyloza, galactoza, fructoza, manosa, inositol, manitol, sorbitol, glucozamin, N-axetylglucozamin, cellobioza, maltoza, sucroza, trehaloza, xylitol, v.v.) 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 thông thường khác. Các ví dụ về các nguồn nitơ 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 phân hủy của chúng, các muối amoni như amoni nitrat, amoni sulfat, amoni clorua, và amoni axetat, amoniac, natri nitrat, kali nitrat, natri glutamat, và ure.

Các ví dụ về các thành phần môi trường ngoài nguồn cacbon và các nguồn nitơ bao gồm các muối của kim loại vết, các axit amin, và các vitamin, mà có thể được bổ sung một cách thích hợp nếu cần.

Theo phương pháp của sáng chế, kháng sinh không bị giới hạn cụ thể miễn là có thể làm giảm sự xuất hiện tỷ lệ các khuẩn lạc bất thường so với trường hợp trong đó không bổ sung kháng sinh, và các ví dụ cụ thể của chúng bao gồm streptomycin, lincomycin, erythromycin, rifampicin, chloramphenicol, actinomycin, axit fusidic, lipiamycin, puromycin, spectinomycin, tetracyclin, và thiostrepton. Ví dụ đặc biệt được ưu tiên trong số này là streptomycin.

Kháng sinh tốt hơn là có nồng độ (nhỏ hơn liều lượng dưới mức gây chết) mà không làm ức chế sự sinh trưởng của các vi khuẩn, và tốt hơn là được bổ sung để nồng độ kháng sinh trong môi trường lỏng là 0,001 ppm hoặc lớn hơn và 10.000 ppm hoặc nhỏ hơn.

Nồng độ kháng sinh tốt hơn là bằng hoặc nhỏ hơn nồng độ làm ức chế sinh trưởng mà ở nồng độ đó sự sinh trưởng của các vi khuẩn bị ức chế. Nồng độ khác nhau tùy thuộc vào loại vi khuẩn, và chẳng hạn, tốt hơn là 1.000 ppm hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 300 ppm hoặc nhỏ hơn, và còn tốt hơn nữa là 90 ppm hoặc nhỏ hơn. Mặt khác, giới hạn dưới của nồng độ kháng sinh có thể là nồng độ bất kỳ mà có thể ngăn chặn sự xuất hiện của các khuẩn lạc bất thường, và tốt hơn là 0,01 ppm hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,1 ppm hoặc lớn hơn, và còn tốt hơn nữa là 1 ppm hoặc lớn hơn.

Kháng sinh được bổ sung vào môi trường lỏng ở giai đoạn trước giai đoạn cuối. Kháng sinh có thể được chứa trong môi trường lỏng ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy hoặc có thể được bổ sung trong khi nuôi cấy. Nếu kháng sinh được bổ sung trong khi nuôi cấy, tốt hơn là bổ sung khi các tế bào đã sinh trưởng đến một giới hạn nhất định, chẳng hạn, tốt

hơn là được bổ sung từ 1 đến 10 giờ sau thời điểm bắt đầu nuôi cấy. Hơn nữa, nồng độ kháng sinh trong môi trường lỏng có thể thay đổi, chẳng hạn, bằng cách bổ sung kháng sinh trong khi nuôi cấy.

Bước nuôi cấy lỏng bao gồm hai hoặc nhiều giai đoạn nuôi cấy với (các) lần cấy chuyển tế bào. Số giai đoạn nuôi cấy có thể là số bất kỳ miễn là hai hoặc nhiều giai đoạn, nhưng tốt hơn nếu là nuôi cấy nhiều giai đoạn gồm hai đến bốn giai đoạn.

Số thùng nuôi cấy có thể tăng lên khi sự nuôi cấy diễn ra từ giai đoạn đầu đến giai đoạn sau, như một thùng nuôi cấy được sử dụng ở giai đoạn đầu, bốn thùng nuôi cấy được sử dụng ở giai đoạn hai, v.v.. Hơn nữa, dung tích của thùng nuôi cấy có thể tăng lên khi sự nuôi cấy diễn ra từ giai đoạn đầu đến giai đoạn sau, như 1 L ở giai đoạn đầu, 10 L ở giai đoạn hai, v.v..

Về thời gian nuôi cấy của nuôi cấy nhiều giai đoạn, chẳng hạn, phương án của nuôi cấy hai giai đoạn bao gồm cấy các tế bào vi khuẩn vào môi trường của giai đoạn đầu, nuôi cấy các tế bào vi khuẩn trong 10 đến 40 giờ, và tốt hơn là 20 đến 30 giờ, cấy phần tế bào vi khuẩn thu được bởi nuôi cấy ở giai đoạn đầu vào môi trường của giai đoạn hai, và sau đó nuôi cấy các tế bào vi khuẩn trong 15 đến 80 giờ, và tốt hơn là 20 đến 50 giờ. Toàn bộ thời gian nuôi cấy nằm trong khoảng tốt hơn là từ 25 đến 120 giờ, và tốt hơn nữa là 30 đến 80 giờ.

Chẳng hạn, phương án của nuôi cấy ba giai đoạn bao gồm cấy các tế bào vi khuẩn vào môi trường của giai đoạn đầu, nuôi cấy các tế bào vi khuẩn trong 10 đến 40 giờ, và tốt hơn là 20 đến 30 giờ, cấy phần tế bào vi khuẩn thu được bởi nuôi cấy ở giai đoạn đầu vào môi trường của giai đoạn hai, nuôi cấy các tế bào vi khuẩn trong 5 đến 40 giờ, và tốt hơn là 10 đến 30 giờ, cấy phần tế bào vi khuẩn thu được bởi nuôi cấy ở giai đoạn hai vào môi trường của giai đoạn ba, và sau đó nuôi cấy các tế bào vi khuẩn trong 15 đến 80 giờ, và tốt hơn là trong 20 đến 50 giờ. Toàn bộ thời gian nuôi cấy nằm trong khoảng tốt hơn là từ 30 đến 160 giờ, và tốt hơn nữa là 35 đến 110 giờ.

Chẳng hạn, phương án của nuôi cấy bốn giai đoạn bao gồm cấy các tế bào vi khuẩn vào môi trường của giai đoạn đầu, nuôi cấy các tế bào vi khuẩn trong 10 đến 40 giờ, và tốt hơn là 20 đến 30 giờ, cấy phần tế bào vi khuẩn thu được bởi nuôi cấy ở giai

đoạn đầu vào môi trường của giai đoạn hai, nuôi cấy các tế bào vi khuẩn trong 5 đến 40 giờ, và tốt hơn là 10 đến 30 giờ, cấy phần tế bào vi khuẩn thu được bởi nuôi cấy ở giai đoạn hai vào môi trường của giai đoạn ba, nuôi cấy các tế bào vi khuẩn trong 5 đến 40 giờ, và tốt hơn là trong 10 đến 30 giờ, cấy phần tế bào vi khuẩn thu được bởi nuôi cấy ở giai đoạn ba vào môi trường ở giai đoạn bốn, và sau đó nuôi cấy các tế bào vi khuẩn trong 15 đến 80 giờ, và tốt hơn là trong 20 đến 50 giờ. Toàn bộ thời gian nuôi cấy nằm trong khoảng tốt hơn là từ 35 đến 200 giờ, và tốt hơn nữa là 60 đến 140 giờ.

Như được mô tả ở trên, khi nuôi cấy lỏng được tiến hành ở nhiều giai đoạn, tiến hành nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường chứa kháng sinh ở ít nhất một trong các giai đoạn ngoại trừ giai đoạn cuối, và ở giai đoạn cuối, tiến hành nuôi cấy với kháng sinh trong đó nồng độ của kháng sinh thấp hơn nồng độ ở giai đoạn trong đó có chứa kháng sinh. Việc làm giảm nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối dẫn đến loại bỏ được các nhân tố gây ra sự ức chế sinh trưởng và ức chế sự hình thành bào tử, để bước nuôi cấy có thể diễn ra nhanh hơn. Nhìn chung, khi các vi sinh vật được sản xuất bằng cách nuôi cấy nhiều giai đoạn, giai đoạn cuối có thể có quy mô lớn nhất. Do đó, việc làm giảm nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối dẫn đến giảm chi phí của sản xuất.

Chẳng hạn, nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối có thể là $1/2$ hoặc nhỏ hơn, $1/5$ hoặc nhỏ hơn, $1/10$ hoặc nhỏ hơn, $1/50$ hoặc nhỏ hơn, hoặc $1/100$ hoặc nhỏ hơn của nồng độ kháng sinh ở giai đoạn trước trong đó có chứa kháng sinh. Nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối cũng có thể bằng 0 (dưới giới hạn phát hiện).

Chẳng hạn, như ở ví dụ 1 được mô tả dưới đây, phương pháp nuôi cấy cũng có thể được sử dụng, mà bao gồm nuôi cấy ở ba giai đoạn bao gồm giai đoạn đầu và giai đoạn hai có bổ sung kháng sinh và giai đoạn ba không bổ sung kháng sinh, và chuyển 1% dung dịch nuôi cấy của giai đoạn hai sang giai đoạn ba, để làm giảm nồng độ kháng sinh đến mức $1/100$ nồng độ kháng sinh ở giai đoạn hai.

Hơn nữa, nồng độ kháng sinh có thể giảm dần từng giai đoạn khi các giai đoạn diễn ra. Trong trường hợp này, nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối có thể là $1/2$ nồng độ tối đa hoặc nhỏ hơn, $1/5$ nồng độ tối đa hoặc nhỏ hơn, $1/10$ nồng độ tối đa hoặc nhỏ hơn, $1/50$ nồng độ tối đa hoặc nhỏ hơn, hoặc $1/100$ nồng độ tối đa hoặc nhỏ hơn.

Tổng thời gian nuôi cấy nuôi cấy với môi trường chứa kháng sinh tốt hơn là 10 giờ hoặc lớn hơn.

Nhiệt độ nuôi cấy có thể được chọn một cách thích hợp tùy thuộc vào loại vi khuẩn, và nằm trong khoảng từ, chẳng hạn, 10°C đến 50°C, tốt hơn là 15°C đến 50°C, và tốt hơn nữa là 15°C đến 40°C.

Các điều kiện khác như nồng độ oxy và độ pH có thể là các điều kiện được sử dụng cho nuôi cấy lỏng thông thường các vi khuẩn, như các điều kiện trong đó các vi khuẩn được nuôi cấy trong khi khuấy ở các điều kiện hiếu khí (chẳng hạn, nồng độ oxy là 15% đến 50%). Độ pH của môi trường nằm trong khoảng tốt hơn là từ 6,5 đến 8,5, và tốt hơn nữa là 7,0 đến 8,0.

Các khuẩn lạc bất thường có xuất hiện hay không có thể được xác nhận bằng cách thu gom phần tế bào thu được sau khi nuôi cấy lỏng sử dụng (các) kháng sinh, pha loãng phần này đến nồng độ mà ngăn chặn được các khuẩn lạc dính vào nhau và cho phép nhận biết hình thái học khuẩn lạc, cấy dịch thu được lên môi trường rắn như môi trường thạch để nuôi cấy, và sau đó quan sát hình thái học của các khuẩn lạc xuất hiện.

Thuật ngữ “các khuẩn lạc bất thường” là chỉ các khuẩn lạc có hình thái học khác hình thái học của các khuẩn lạc vi khuẩn kiểu đại. Chẳng hạn, như được thể hiện ở bảng 3, các khuẩn lạc bình thường có hình dạng gần như hình tròn, các mặt có dạng thấu kính, và bề mặt nhẵn hoặc nhầy, trong khi các khuẩn lạc bất thường có hình dạng không đều và có mặt bẹt và bề mặt nhám. Khi khuẩn lạc có ít nhất một trong các yếu tố hình thái học bất thường, các mặt bất thường, và bề mặt bất thường, thì có thể được xác định là khuẩn lạc bất thường. Fig.1 mô tả ví dụ về hình thái học của các khuẩn lạc bất thường, và các khuẩn lạc hình tròn là các khuẩn lạc bình thường.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

(Ví dụ 1)

Sử dụng bình Erlenmeyer dung tích 500 mL (có màng ngăn), 100 mL mỗi môi

trường lỏng chứa các thành phần của môi trường được nêu ở bảng 1 được chuẩn bị, và sau đó tiến hành khử trùng bằng nồi hấp. Để tránh phản ứng Maillard, glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng.

Bảng 1: Thành phần môi trường

Thành phần	Nhà sản xuất	Nồng độ (g/l)
Glucoza	Wako Pure Chemical Industries Ltd.	25,0
Bột đậu tương tách béo	Ajinomoto Healthy Supply Co., Inc.	20,0
Nước ngô	Difco	5,0
Chất chiết thô men	Roquette	4,0
MnCl ₂ .4H ₂ O	Difco	0,18
NaCl	Wako Pure Chemical Industries Ltd.	1,00
KH ₂ PO ₄	Wako Pure Chemical Industries Ltd.	0,50
MgSO ₄ .7H ₂ O	Wako Pure Chemical Industries Ltd.	0,63
CaCl ₂	Wako Pure Chemical Industries Ltd.	0,19
FeSO ₄	Wako Pure Chemical Industries Ltd.	0,00038

Các phần thử nghiệm được đặt như được mô tả ở bảng 2. Theo các điều kiện đối với mỗi phần thử nghiệm, dung dịch chứa nước của streptomycin được khử trùng bằng bộ lọc được bổ sung trong điều kiện vô trùng vào môi trường.

Một vòng bạch kim được lấy từ khuẩn lạc của chủng *Bacillus subtilis* ITB 105 (NITE BP-01727) sinh trưởng trên môi trường thạch thường và được cấy, và sau đó tiến hành nuôi cấy lắc ở 30°C và 150 vòng/phút (giai đoạn đầu). Mười tám giờ sau, 1 mL của mỗi dung dịch nuôi cấy được phân chia đều và được chuyển sang môi trường mới, và sau đó nuôi cấy lắc được tiến hành theo phương pháp tương tự (giai đoạn hai). Sau 24 giờ, 1 mL của mỗi dung dịch nuôi cấy được phân chia đều và sau đó được chuyển sang môi trường mới, và sau đó nuôi cấy lắc được tiến hành theo phương pháp tương tự (giai đoạn ba). Dung dịch nuôi cấy ở giai đoạn ba được lấy mẫu sau 30 giờ.

Bảng 2: Đặt phần thử nghiệm

Phần thử nghiệm số	Nuôi cấy giai đoạn đầu		Nuôi cấy giai đoạn hai		Nuôi cấy giai đoạn ba	
	Loại kháng sinh được bổ sung	Nồng độ bổ sung (ppm)	Loại kháng sinh được bổ sung	Nồng độ bổ sung (ppm)	Loại kháng sinh được bổ sung	Nồng độ bổ sung (ppm)
1	-	-	-	-	-	-
2	Streptomycin	5	Streptomycin	5	-	-
3	Streptomycin	10	Streptomycin	10	-	-
4	Streptomycin	15	Streptomycin	15	-	-
5	Streptomycin	20	Streptomycin	20	-	-
6	Streptomycin	30	Streptomycin	30	-	-
7	Streptomycin	30	Streptomycin	30	Streptomycin	30

Các dung dịch nuôi cấy thu được mỗi dung dịch được pha loãng 1×10^7 lần bằng nước vô trùng, và 100 μL dung dịch đã pha loãng được cấy sang môi trường thạch thường và sau đó các tế bào được nuôi cấy qua đêm ở 37°C . Số khuẩn lạc xuất hiện được xác định để tính CFU. Các khuẩn lạc xuất hiện và khác rõ rệt về hình thái học khuẩn lạc so với chủng bố mẹ căn cứ vào các tiêu chuẩn ở bảng 3 được xác định là các khuẩn lạc bất thường và số khuẩn lạc bất thường xuất hiện được xác định và sau đó tỷ lệ của chúng trong tổng số các khuẩn lạc được tính toán. Các kết quả được thể hiện ở bảng 4. Kết quả là, khi nuôi cấy ba giai đoạn, các khuẩn lạc xuất hiện bất thường chiếm khoảng 5% khi không bổ sung kháng sinh. Tuy nhiên, khi các tế bào được nuôi cấy bằng cách bổ sung streptomycin ở giai đoạn đầu và giai đoạn hai, và không bổ sung ở giai đoạn ba, không thấy sự xuất hiện của các khuẩn lạc bất thường. Hơn nữa, khi streptomycin được bổ sung ở cả giai đoạn đầu, giai đoạn hai và giai đoạn ba, mặc dù không xuất hiện khuẩn lạc bất

thường, số khuẩn lạc xuất hiện và số khuẩn lạc bình thường xuất hiện thấp, và năng suất của các tế bào vi khuẩn thấp hơn năng suất của các phần thử nghiệm số 2 đến 6.

Bảng 3: Các tiêu chuẩn xác định về hình thái học khuẩn lạc

Mục	Kiểu đại (giai đoạn nuôi cấy ban đầu)	Kiểu đại (giai đoạn nuôi cấy sau)	Bất thường
Hình dạng	Hình tròn	Hình tròn	Hình tròn hoặc không đều
Mặt	Có hình dạng thấu kính	Có dạng miệng phễu hoặc góc	Bệt
Bề mặt	Nhảy hoặc nhẵn	Nhẵn hoặc nhăn	Nhám

Bảng 4: Các kết quả thử nghiệm

Phần thử nghiệm số	Giai đoạn nuôi cấy	Thời gian nuôi cấy (giờ)	CFU (/ml)	Số khuẩn lạc bình thường	Số khuẩn lạc bất thường	Xuất hiện (%) của khuẩn lạc bất thường
1	Giai đoạn ba	30	9,9e+09	94	5	5,1%
2	Giai đoạn ba	30	8,8e+09	88	0	0,0%
3	Giai đoạn ba	30	1,09e+10	109	0	0,0%
4	Giai đoạn ba	30	7,0e+09	70	0	0,0%
5	Giai đoạn ba	30	8,2e+09	82	0	0,0%
6	Giai đoạn ba	30	6,3e+09	63	0	0,0%
7	Giai đoạn ba	30	4,9e+09	49	0	0,0%

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất tế bào vi khuẩn, bao gồm nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng chứa kháng sinh ở giai đoạn trước giai đoạn cuối, và sau đó giảm nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối đến mức thấp hơn nồng độ kháng sinh ở giai đoạn trước trong quá trình nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn đối với các vi khuẩn,

trong đó vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*,

trong đó kháng sinh nêu trên là ít nhất một kháng sinh được chọn từ nhóm bao gồm streptomycin, lincomycin và chloramphenicol,

trong đó nồng độ kháng sinh trong môi trường lỏng ở giai đoạn trước giai đoạn cuối nằm trong khoảng từ 1,0 ppm đến 90 ppm, và

trong đó nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối là bằng hoặc nhỏ hơn 1/10 của nồng độ tối đa của kháng sinh.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn tạo ra bào tử được chọn từ nhóm 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.*

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn là *Bacillus subtilis*.

4. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn có sự giảm xuất hiện các biến thể tạo ra khuẩn lạc bất thường, bao gồm nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng chứa kháng sinh ở giai đoạn trước giai đoạn cuối, và sau đó giảm nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối đến mức thấp hơn nồng độ kháng sinh ở giai đoạn trước trong quá trình nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn đối với các vi khuẩn,

trong đó vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*,

trong đó kháng sinh nêu trên là ít nhất một kháng sinh được chọn từ nhóm bao gồm streptomycin, lincomycin và chloramphenicol,

trong đó nồng độ kháng sinh trong môi trường lỏng ở giai đoạn trước giai đoạn cuối nằm trong khoảng từ 1,0 ppm đến 90 ppm, và

trong đó nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối là bằng hoặc nhỏ hơn 1/10 của nồng độ tối đa của kháng sinh.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó vi khuẩn tạo ra bào tử được chọn từ nhóm 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.*

6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó vi khuẩn là *Bacillus subtilis*.

7. Phương pháp ngăn chặn sự xuất hiện và sinh trưởng của các biến thể tạo ra khuẩn lạc bất thường trong khi nuôi cấy lỏng các vi khuẩn, bao gồm nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng chứa kháng sinh ở giai đoạn trước giai đoạn cuối, và sau đó giảm nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối đến mức thấp hơn nồng độ kháng sinh ở giai đoạn trước trong quá trình nuôi cấy lỏng nhiều giai đoạn đối với các vi khuẩn,

trong đó vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*,

trong đó kháng sinh nêu trên là ít nhất một kháng sinh được chọn từ nhóm bao gồm streptomycin, lincomycin và chloramphenicol,

trong đó nồng độ kháng sinh trong môi trường lỏng ở giai đoạn trước giai đoạn cuối nằm trong khoảng từ 1,0 ppm đến 90 ppm, và

trong đó nồng độ kháng sinh ở giai đoạn cuối là bằng hoặc nhỏ hơn 1/10 của

nồng độ tối đa của kháng sinh.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó vi khuẩn tạo ra bào tử được chọn từ nhóm 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.*

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó vi khuẩn là *Bacillus subtilis*.

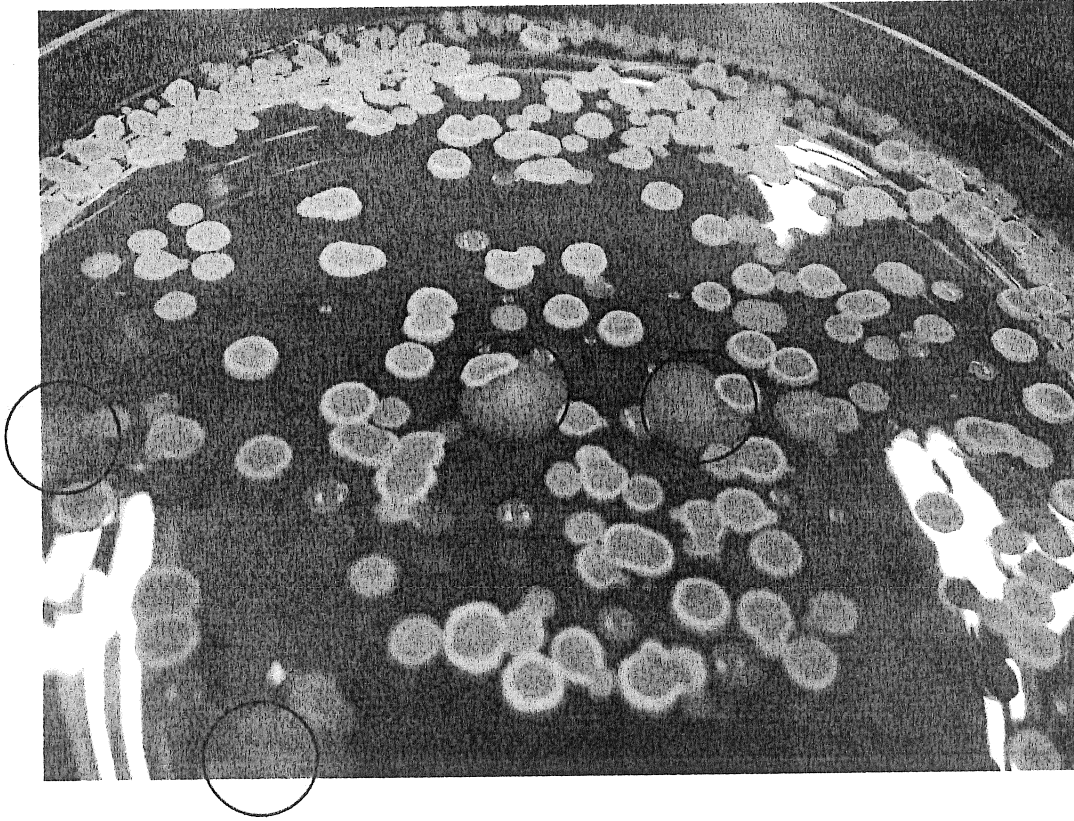


Fig.1