



(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)



1-0040180

(51)^{2006.01} C12N 1/20; C12R 1/08; C12R 1/07;
C12P 1/04; C12P 21/04

(13) B

(21) 1-2019-02238

(22) 06/10/2017

(86) PCT/JP2017/036440 06/10/2017

(87) WO 2018/066688 A1 12/04/2018

(30) 2016-199419 07/10/2016 JP

(45) 25/06/2024 435

(43) 25/07/2019 376A

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

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

(72) Yuki TSUKAGOSHI (JP).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY VI KHUẨN BACILLUS VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẤT HỮU ÍCH

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy, mà nhờ phương pháp này các bào tử vi khuẩn *Bacillus* có thể được sản xuất một cách hiệu quả. Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất các bào tử vi khuẩn *Bacillus*, bao gồm nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* trong môi trường lỏng chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường ở nồng độ từ 50,1g/l đến 100g/l ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy, và sau đó trong quá trình nuôi cấy, bổ sung môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường và hợp chất chứa nitơ, và có tỷ lệ trọng lượng (tỷ lệ C/N) của các nguyên tử cacbon đối với các nguyên tử nitơ nằm trong khoảng từ 5,5 đến 13,5 vào môi trường lỏng. 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 *Bacillus*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn *Bacillus* hoặc các hợp phần hoạt hóa do vi khuẩn *Bacillus* sinh ra được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực gồm thực phẩm, thuốc, và ngành công nghiệp chăn nuôi, v.v.. Đặc biệt đối với các thuốc diệt vi khuẩn hoặc thuốc dung cho các rối loạn của ruột chứa các tế bào sống làm các hợp phần hoạt hóa, phân bố và sử dụng vi khuẩn *Bacillus* dưới dạng các bào tử được xem là phương pháp chung xét về độ bền và độ ổn định.

Nói chung, môi trường lỏng chủ yếu chứa nguồn cacbon như các đường, nguồn nitơ như các axit amin và các muối amoni vô cơ, và các khoáng chất, chẳng hạn, được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus*.

Tài liệu phi sáng chế 1 bộc lộ rằng khi vi khuẩn *Bacillus* được nuôi cấy bằng nuôi cấy mẻ trong môi trường lỏng chứa các thành phần này, các bào tử thu được ở nồng độ khoảng $3,5E+09$ bào tử/ml.

Tài liệu sáng chế 1 bộc lộ rằng bào tử vi khuẩn *Bacillus* ở các nồng độ cao có thể thu được nhờ nuôi cấy ở các điều kiện của bước sử dụng môi trường chứa các sacarit, chất chiết thô men, sản phẩm dịch chiết ngô cô đặc được sấy khô, pepton từ đậu tương và sản phẩm phụ cô đặc của nhà máy rượu *shochu* lần lượt tới 5, 10, 20, 10, và 20%, và việc điều chỉnh nồng độ oxy trong và sau pha sinh trưởng logarit ở 10% hoặc nhỏ hơn. Tuy nhiên, oxy được mong muốn có đủ trong hệ thống dành cho sự sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus*, và một số chủng của vi khuẩn *Bacillus* sinh trưởng kém khi được nuôi cấy ở các điều kiện thiếu oxy trong pha sinh trưởng logarit. Do đó, các vi khuẩn mà áp dụng được cho phương pháp này là có hạn.

Tài liệu sáng chế 2 bộc lộ phương pháp sản xuất tăng cường proteaza, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* sản sinh proteaza trong môi trường chứa nguyên liệu thô là nguồn đường và nguồn nitơ ở nồng độ cao. Tuy nhiên,

phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy bằng nuôi cấy mẻ, do đó chỉ thu được một lượng proteaza giới hạn bằng sự nuôi cấy đơn.

Nói chung, khi thu được các bào tử hoặc các chất chuyển hóa ở nồng độ cao hơn nhờ quá trình xử lý đơn, phương pháp nuôi cấy mà bao gồm việc tăng nồng độ các cơ chất dinh dưỡng trong môi trường thường được áp dụng. Tuy nhiên, phương pháp này gặp vấn đề là khi vi khuẩn *Bacillus* được nuôi cấy với sự gia tăng các lượng của các cơ chất có thể đồng hóa bởi vi khuẩn *Bacillus*, nồng độ tế bào vi khuẩn và các chất chuyển hóa tăng theo tỷ lệ, và khi tiếp tục nuôi cấy ngay cả sau khi nồng độ các cơ chất vượt quá các mức quy định, hệ thống nuôi cấy trở nên không thể oxy hóa một cách thỏa đáng do nhu cầu oxy tăng lên, dẫn đến sự sinh trưởng kém và thời gian nuôi cấy cần thiết lâu hơn, chẳng hạn. Tài liệu phi sáng chế 1 báo cáo cụ thể rằng việc nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* trong môi trường chứa glucoza ở nồng độ cao hơn 20 g/l làm ức chế sự hình thành bào tử.

Do đó, sự nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất (nuôi cấy bán tĩnh) được tiến hành để thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus* và các chất chuyển hóa ở nồng độ cao nhờ quá trình xử lý đơn mà không ức chế sự hình thành bào tử của vi khuẩn *Bacillus*. Kỹ thuật này bao gồm việc bổ sung cơ chất dinh dưỡng mà biến mất trong quá trình nuôi cấy ở nồng độ thích hợp và thời điểm thích hợp, để các tế bào vi khuẩn và các chất chuyển hóa có thể thu được ở các nồng độ cao hơn các nồng độ trong trường hợp không bổ sung cơ chất này.

Tài liệu phi sáng chế 1 bộc lộ là nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất đã cải thiện được năng suất của các tế bào vi khuẩn đến một mức đáng kể cao hơn năng suất của nuôi cấy mẻ, và thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus* ở nồng độ cao. Tuy nhiên, tài liệu này chứng minh là sự hình thành bào tử bị ức chế do sử dụng môi trường chứa glucoza với lượng 20g/l hoặc lớn hơn. Cụ thể, trong tài liệu này, nồng độ đường giảm xuống ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy, và nguyên liệu thô là nguồn đường và nguồn nitơ được bổ sung theo phương pháp sao cho nồng độ của nó vẫn ở mức thấp. Điều này làm tăng thời gian bổ sung các nguyên liệu này và cuối cùng dẫn đến thời gian nuôi cấy lâu là 60 giờ. Hơn nữa, về các thành phần môi trường được sử dụng trong tài liệu này, môi trường chứa các hợp chất tinh khiết về mặt hóa học ở dạng kết hợp, và là môi trường

tổng hợp hoàn toàn. Do đó, cần phải đầu tư chi phí khổng lồ để thu được các bào tử nhờ nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* ở quy mô lớn để ứng dụng trong công nghiệp. Do đó, người ta mong muốn nuôi cấy sử dụng bã thải ra ở bước sản xuất thực phẩm ở quy mô lớn hoặc tương tự, hoặc nguyên liệu thô được làm từ hỗn hợp như bột đậu tương đã loại chất béo hoặc chất chiết nấm men, trong đó sự sản xuất các sản phẩm này không đòi hỏi nhiều nhân công. Tuy nhiên, phương pháp để thu được các bào tử vi khuẩn *Bacillus* một cách hiệu quả bằng cách sử dụng môi trường chứa các nguyên liệu này ở nồng độ cao chưa từng được báo cáo.

Tài liệu sáng chế 3 bộc lộ phương pháp bao gồm bổ sung glucoza ở các khoảng thời gian xác định vào môi trường theo sự tiêu thụ glucoza trong khi nuôi cấy theo phương pháp sao cho nồng độ cuối cùng của glucoza là 1%. Đối với việc nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus*, việc bổ sung hợp chất chứa nitơ đồng thời với bổ sung của các sacarit có lợi hơn cho sự sinh trưởng.

Tài liệu sáng chế 4 bộc lộ phương pháp bao gồm nuôi cấy *Bacillus licheniformis* bằng nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất trong môi trường chứa đường ở nồng độ cao để sản xuất 3-hydroxybutyrat, và được cấu tạo bởi các nguyên tử cacbon và các nguyên tử nitơ ở tỷ lệ trọng lượng (tỷ lệ C/N) từ 12,4 đến 24. Tuy nhiên, việc nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* trong môi trường chứa các đường ở nồng độ cao hơn mức cần thiết không thích hợp để thu được các bào tử vi khuẩn *Bacillus* ở nồng độ cao.

Tài liệu trích dẫn

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP2007-236286A

Tài liệu sáng chế 2: JP H11-103855A (1999)

Tài liệu sáng chế 3: JP H06-254584A (1994)

Tài liệu sáng chế 4: JP H09-502097A (1997)

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Advances in Microbiology, 2014, 4, 444-454

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Như được mô tả ở trên, *Bacillus* phải được nuôi cấy ở các điều kiện trong đó cơ chất nuôi cấy được bổ sung theo lượng thích hợp cần thiết để tạo ra các bào tử và các chất chuyển hóa của vi khuẩn *Bacillus* ở nồng độ cao, để nhanh chóng thu được các bào tử vi khuẩn *Bacillus* và các chất hữu ích như các chất chuyển hóa ở nồng độ cao bởi môi trường lỏng. Do đó, việc tìm ra các điều kiện mới đáp ứng các nhu cầu như vậy đã được yêu cầu. Vì vậy, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp nuôi cấy mà bằng phương pháp này các bào tử và các chất hữu ích như các chất chuyển hóa có thể được sản xuất hữu hiệu từ vi khuẩn *Bacillus* mà các bào tử và các chất chuyển hóa ở nồng độ cao không thể dễ dàng thu được bằng môi trường lỏng thông thường dùng cho vi khuẩn.

Cách thức giải quyết vấn đề

Nhờ các nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết các vấn đề trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng sự nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất được tiến hành bằng cách bổ sung môi trường được chuẩn bị chứa nguồn cacbon chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường và nguồn nitơ chứa muối amoni, amoniac hoặc bột đậu tương đã loại chất béo và dịch chiết ngô cô đặc v.v., ở các tỷ lệ các thành phần xác định, vào môi trường với nguyên liệu thô là nguồn đường ở nồng độ cao ở giai đoạn bắt đầu nuôi cấy, để có thể phát triển vi khuẩn *Bacillus* mà không ức chế sự sinh trưởng, và, để đạt được nồng độ cao của các bào tử vi khuẩn *Bacillus* và các chất hữu ích như các chất chuyển hóa, mà không thể thu được bằng các phương pháp thông thường. Như vậy, các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế.

Sáng chế đề cập đến các khía cạnh dưới đây.

[1] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus*, bao gồm nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* trong môi trường lỏng chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường có nồng độ từ 50,1 g/l đến 100g/l ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy, và sau đó trong quá trình nuôi cấy, bổ sung môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất vào môi trường lỏng, trong đó môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất này chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn

đường và hợp chất chứa nitơ, và có tỷ lệ trọng lượng (tỷ lệ C/N) của các nguyên tử cacbon đối với các nguyên tử nitơ từ 5,5 đến 13,5.

[2] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục [1], bao gồm nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* bằng cách bổ sung môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất có tỷ lệ trọng lượng (tỷ lệ C/N) của các nguyên tử cacbon đối với các nguyên tử nitơ từ 5,5 đến 12 vào môi trường lỏng.

[3] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục [1] hoặc [2], trong đó tổng lượng đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường được bổ sung từ môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất cho đến khi kết thúc nuôi cấy là 100g hoặc ít hơn trên mỗi lít môi trường trước khi bổ sung.

[4] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [3], trong đó môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất được bổ sung ở thời điểm trong khoảng thời gian bảy giờ trước hoặc sau thời điểm tỷ lệ tiêu thụ oxy của vi khuẩn *Bacillus* là lớn nhất.

[5] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [4], trong đó môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất được bổ sung ở thời điểm trong khoảng thời gian từ ba giờ đến ba mươi giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy.

[6] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [5], trong đó môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất thu được bằng cách khử trùng bằng nhiệt dung dịch chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường và hợp chất chứa nitơ.

[7] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [6], trong đó đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường là đường không khử.

[8] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục [7], trong đó đường không khử là ít nhất một đường được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, trehaloza, kestosa, melequitoza, gentianoza, neobifurcoza, fungitetraoza, planteoza, raffinosa, stachyoza, và bifurcoza.

[9] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [8], trong đó hợp chất chứa nitơ là ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm

hợp chất nitơ vô cơ bao gồm các muối amoni và amoniac, và nhóm hợp chất nitơ hữu cơ bao gồm các axit amin, các peptit, các protein, ure, bột đậu tương đã loại chất béo, các thành phần có nguồn gốc từ đậu tương, các thành phần có nguồn gốc từ nấm men, dịch chiết ngô cô đặc, bột khô của dịch chiết ngô cô đặc, các thành phần có nguồn gốc từ ngô, các protein động vật và thực vật và các sản phẩm thủy phân của nó.

[10] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [9], trong đó nồng độ oxy hòa tan trong môi trường lỏng được duy trì ở 10% hoặc lớn hơn.

[11] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [10], trong đó nhiệt độ của môi trường lỏng được điều chỉnh từ 20°C đến 60°C để kiểm soát sự sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus*.

[12] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục [11], trong đó vi khuẩn *Bacillus* được nuôi cấy ở 28°C đến 32°C trong pha sinh trưởng logarit, và sau đó được nuôi cấy ở 35°C đến 39°C.

[13] Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo mục bất kỳ trong số các mục từ mục [1] đến [12], trong đó vi khuẩn *Bacillus* 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.

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

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

[16] Phương pháp sản xuất chất hữu ích theo mục [14], trong đó chất hữu ích là chất chuyển hóa của vi khuẩn *Bacillus*.

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

[18] Phương pháp sản xuất chất hữu ích theo [17], trong đó lipopeptit vòng là ít nhất một lipopeptit vòng được chọn từ nhóm bao gồm iturin, surfactin, plipastatin, fengycin, baxilomyxin, lichenysin, kurstakin, mycosubtilin, colistin, fusarixidin, paenibacterin, polymyxin và pumilaxidin.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, vi khuẩn *Bacillus* có thể được sinh trưởng đến nồng độ vi khuẩn cao và do đó các bào tử và các chất hữu ích như các chất chuyển hóa có thể được sản xuất ở các tỷ lệ cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* của sáng chế bao gồm nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* trong môi trường lỏng chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường có nồng độ nằm trong khoảng từ 50,1g/l đến 100g/l ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy, và sau đó trong quá trình nuôi cấy, bổ sung môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất vào môi trường lỏng, trong đó môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường và hợp chất chứa nitơ, và có tỷ lệ trọng lượng (tỷ lệ C/N) của các nguyên tử cacbon đối với các nguyên tử nitơ nằm trong khoảng từ 5,5 đến 13,5.

Bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* của sáng chế, các bào tử và các chất hữu ích như các chất chuyển hóa có thể được sinh ra ở các tỷ lệ cao trong môi trường lỏng.

Các ví dụ về vi khuẩn *Bacillus* được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn là chúng là các 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.*

Trong sáng chế, thuật ngữ “các chất hữu ích” chỉ các chất thể hiện hoạt tính sinh học như tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng của động vật và thực vật, tác dụng diệt vi khuẩn hoặc tác dụng kìm hãm vi khuẩn, và tác dụng hoạt hóa các gen, các chất có thể ứng dụng trong công nghiệp như các enzym khác nhau, axit lactic, và axit amin, và các sản phẩm lên men của chúng để 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 vi khuẩn *Bacillus* 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 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 được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* chứa ít nhất nguồn cacbon và nguồn nitơ.

Nguồn cacbon mà có thể được dị hóa bởi vi khuẩn *Bacillus* có thể được sử dụng để nuôi cấy. Các ví dụ về nguồn cacbon có thể dị hóa này bao gồm các đường mà có thể được dị hóa bởi vi khuẩn *Bacillus* (như glucoza, lactoza, glyxerol, arabinoza, riboza, xyloza, galactoza, fructoza, manozo, inositol, manitol, sorbitol, glucosamin, N-axetylglucosamin, xelobioza, maltoza, sucroza, trehaloza, và xylitol) hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường. Thuật ngữ “nguyên liệu thô là nguồn đường” là cơ chất giải phóng ra các đường có thể dị hóa ở trên bởi enzym như xenlulaza được sản xuất bởi nhiều vi sinh vật bao gồm vi khuẩn *Bacillus* và chỉ nguyên liệu thô như các polysacarit

bao gồm tinh bột, xenluloza, pectin, và kitin, v.v., và sinh khối như rạ, rơm, trấu, các rác thải thực phẩm, gỗ có nguồn gốc từ xây dựng, và các nguyên liệu còn lại của các nhà máy cưa. Các ví dụ về nó bao gồm đường không khử được ưu tiên, và các ví dụ cụ thể của nó bao gồm ít nhất một đường không khử được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, trehaloza, kestosa, melezitoza, gentianoza, neobifurcoza, fungitetraoza, planteoza, raffinosa, stachyoza và bifurcoza.

Nguồn nitơ có thể được dị hóa nhờ vi khuẩn *Bacillus* có thể được sử dụng để nuôi cấy. Các ví dụ về nguồn nitơ có thể dị hóa này bao gồm các hợp chất chứa nitơ như các axit amin, các peptit, các protein động vật và thực vật và các sản phẩm thủy phân của nó, ure, các thành phần có nguồn gốc từ đậu tương ví dụ, bột đậu tương đã loại chất béo, các thành phần có nguồn gốc từ nấm men, dịch chiết ngô cô đặc, bột khô của dịch chiết ngô cô đặc, các thành phần có nguồn gốc từ ngô, các muối amoni ví dụ, amoni nitrat, amoni sulfat, amoni clorua, và amoni axetat, amoniac, natri nitrat, kali nitrat, natri glutamat, và ure.

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

Lượng đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường chứa trong môi trường ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy nằm trong khoảng từ 50,1 đến 100g/l. Khi vi khuẩn *Bacillus* được nuôi cấy, và đặc biệt khi vi khuẩn *Bacillus* được nuôi cấy trong môi trường chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường ở nồng độ cao như vậy, vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh trưởng tích cực hơn ở giai đoạn bắt đầu nuôi cấy, trong khi đó đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường này được tiêu thụ một cách hiệu quả trong quá trình sinh trưởng mà không còn lại ở giai đoạn nuôi cấy muộn, sao cho có thể kích thích sự hình thành bào tử và sự sản xuất các chất hữu ích như các chất chuyển hóa một cách hiệu quả. Khi bổ sung, việc nuôi cấy trong môi trường có nồng độ dưới 50,1g/l làm cho nguồn đường sớm được tiêu thụ hoàn toàn và sự hình thành bào tử diễn ra trước khi sinh trưởng đầy đủ. Hơn nữa, nuôi cấy trong môi trường có

nồng độ cao hơn 100g/l ức chế sự sinh trưởng và sự hình thành bào tử. Điều này đòi hỏi nuôi cấy với chế phẩm môi trường chứa đường hoặc đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường nằm trong phạm vi nêu trên.

Lượng hợp chất chứa nitơ chứa trong môi trường ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy tốt hơn nằm trong khoảng từ 8 đến 72g/l, và tỷ lệ C/N của môi trường ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy tốt hơn nằm trong khoảng từ 5,5 đến 13,5.

Môi trường trên chứa đường, hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường và hợp chất chứa nitơ cũng có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy mà có bổ sung cơ chất được bổ sung trong khi nuôi cấy. Tuy nhiên, trong sáng chế, tỷ lệ trọng lượng (tỷ lệ C/N) của các nguyên tử cacbon đối với các nguyên tử nitơ trong môi trường nuôi cấy mà có bổ sung cơ chất được điều chỉnh sao cho nằm trong khoảng từ 5,5 đến 13,5, và tốt hơn 5,5 đến 12. Bằng cách điều chỉnh tỷ lệ C/N nằm trong phạm vi này, việc sản xuất các bào tử và các chất hữu ích như các chất chuyển hóa ở nồng độ cao có thể đạt được mà không ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn. Mặt khác, việc nuôi cấy trong môi trường chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường ở tỷ lệ cao (tỷ lệ C/N vượt quá 13,5) làm cho đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường vẫn còn lại trong môi trường ở thời điểm kết thúc nuôi cấy. Đường còn lại này được biết là làm ức chế sự hình thành bào tử của các tế bào vi khuẩn *Bacillus* sống. Hơn nữa, việc nuôi cấy trong môi trường chứa hợp chất là nguồn nitơ ở tỷ lệ cao (tỷ lệ C/N dưới 5,5) dẫn đến thiếu nguồn cacbon cần thiết cho sự sinh trưởng và do đó gây bất lợi.

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

Hàm lượng cacbon là nguyên liệu thô tự nhiên trong các thành phần môi trường có thể được tính toán sơ bộ là tổng lượng đường là 40% trọng lượng và tổng lượng protein là 50% trọng lượng. Tổng lượng đường có thể được xác định là nồng độ đường khử 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.

Lượng môi trường được bổ sung trước khi kết thúc nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể. Tốt hơn, tổng lượng đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường được bổ sung

từ môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất là 100 g hoặc ít hơn trên mỗi lit môi trường trước khi bổ sung.

Môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất tốt hơn thu được bằng cách khử trùng bằng nhiệt dung dịch chứa đường không khử hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường chứa đường không khử và hợp chất chứa nitơ.

Các thành phần môi trường thường được cho khử trùng bằng nhiệt như khử trùng bằng nồi hấp trước khi bắt đầu nuôi cấy. Tuy nhiên, khi nồi hấp được tiến hành ở các điều kiện trong đó đường khử và nguồn nitơ cùng tồn tại, chúng đóng vai trò làm các cơ chất để gây ra phản ứng Maillard, các thành phần dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng được biến đổi thành các hợp chất khác, và các nguồn dinh dưỡng không còn các chức năng ban đầu nữa. Điều này làm cho vi khuẩn *Bacillus* khó sinh trưởng hiệu quả, để không thể thu được đủ các tế bào vi khuẩn và các chất hữu ích như các chất chuyển hóa. Do đó, phương pháp chung bao gồm tiến hành khử trùng bằng nhiệt nguồn đường và khử trùng bằng nhiệt nguồn nitơ riêng, làm lạnh đủ, trộn hai nguồn này, và sau đó đưa hỗn hợp đi nuôi cấy. Bước trộn này gây ra vấn đề là làm cho hệ thống mở trong đó hệ thống này được giữ ở các điều kiện vô trùng, làm tăng nguy cơ nhiễm khuẩn và làm tăng điều kiện cần thiết và các quá trình hoạt động.

Ngược lại, phương pháp của sáng chế bao gồm sử dụng đường không khử như sucroza, để không gây ra phản ứng Maillard v.v., ngay cả nếu nguồn cacbon và nguồn nitơ đồng thời được cho khử trùng bằng nhiệt, và do đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc chuẩn bị môi trường.

Môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất có thể được bổ sung chỉ một lần hoặc nhiều lần, như 2 đến 6 lần một cách không liên tục. Môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất tốt hơn được bổ sung liên tục theo tỷ lệ tiêu thụ các nguồn dinh dưỡng.

Môi trường nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất được bổ sung tốt hơn ở các thời điểm khi vi khuẩn *Bacillus* sinh trưởng tích cực và tiêu thụ oxy và các nguồn dinh dưỡng tích cực hơn. Nếu bắt đầu bổ sung ở giai đoạn bắt đầu nuôi cấy, nồng độ các chất dinh dưỡng tăng lên, sự sinh trưởng được kích hóa, oxy được tiêu thụ nhanh chóng dẫn đến sự oxy hóa không đủ, và kém sinh trưởng do kết quả thẩm lọc. Hơn nữa, phải kéo dài thời gian nuôi cấy để thu được đủ các bào tử và các chất hữu ích như các

chất chuyển hóa nếu bổ sung được tiến hành sau khoảng thời gian sinh trưởng được hoạt hóa. Nói chung, sự hình thành bào tử diễn ra khi rút chất dinh dưỡng ra. Nếu tiếp tục bổ sung ở giai đoạn nuôi cấy muộn, cơ chất nuôi cấy vẫn còn lại với lượng lớn trong môi trường và do đó không tạo ra bào tử. Do đó, chẳng hạn, môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất được bổ sung tốt hơn ở thời điểm trong khoảng thời gian bảy giờ trước hoặc sau thời điểm tỷ lệ tiêu thụ oxy của các vi sinh vật là lớn nhất (chẳng hạn, ở thời điểm sau khi bắt đầu nuôi cấy 8 giờ), và tốt hơn ở thời điểm trong khoảng thời gian từ ba giờ đến ba mươi giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. Tốt hơn nữa, bắt đầu bổ sung môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất từ 5 đến 20 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, và sau đó kết thúc từ 13 đến 25 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. Tổng thời gian nuôi cấy nằm trong khoảng từ 24 đến 48 giờ, chẳng hạn.

Khi bổ sung, có thể giám sát thời gian thực của nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng cảm biến điện cực có màng chắn hoặc tương tự.

Các điều kiện nuôi cấy có thể là các điều kiện thường được sử dụng đối với môi trường lỏng của vi khuẩn *Bacillus*. Chẳng hạn, sự sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus* tốt hơn được kiểm soát bằng cách điều chỉnh nhiệt độ từ 20°C đến 60°C, và tốt hơn từ 20°C đến 40°C, chẳng hạn. Chẳng hạn, có thể thu được sự hình thành bào tử hiệu quả hơn bằng cách nuôi cấy ở 28°C đến 32°C, và tốt hơn trong khoảng 30°C±1°C trong pha sinh trưởng logarit để kiểm soát sự sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus* và sự tiêu thụ đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường, sau đó nuôi cấy ở 35°C đến 39°C, và tốt hơn trong khoảng 37°C ± 1°C.

Hơn nữa, việc nuôi cấy ở các điều kiện hiếu khí (chẳng hạn, nồng độ oxy là 10% hoặc lớn hơn và tốt hơn là 15% đến 50%) cùng với khuấy được ưu tiên, và 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.

Tiền nuôi cấy có thể được tiến hành trước khi nuôi cấy trong môi trường lỏng chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường ở nồng độ từ 50,1g/l đến 100g/l.

Như được mô tả ở trên, các tế bào vi khuẩn *Bacillus* có tốc độ sự hình thành bào tử cao (chẳng hạn, 50% hoặc lớn hơn, tốt hơn 80% hoặc lớn hơn) và các chất chuyển hóa của vi khuẩn *Bacillus* có thể thu được. Các tế bào vi khuẩn *Bacillus* có tốc

độ hình thành bào tử cao này và các chất chuyển hóa của vi khuẩn *Bacillus* có thể được sử dụng với mục đích mong muốn sau hoạt động thích hợp như ngưng tụ hoặc loại bỏ và làm khô môi trường.

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.

Bảng 1 cho thấy các thành phần của môi trường được sử dụng ở các ví dụ, các ví dụ tham khảo và các ví dụ so sánh. Hàm lượng cacbon của glucoza, sucroza, và CSL trong các thành phần môi trường mỗi loại được tính là tổng lượng đường là 40% trọng lượng và tổng lượng protein là 50% trọng lượng. Tổng lượng đường được xác định 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 xác định bằng cách xác định tổng lượng nitơ bằng phương pháp Kjeldahl, và sau đó nhân tổng lượng nitơ này với hệ số chuyển đổi 6,25.

Bảng 1

Các điều kiện môi trường	1	2	3	4	5
Glukoza g/L	12,5	50	0	0	250
Sucroza	0	0	50	250	0
CSL [bột]	15	60	60	90	90
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,09	0,36	0,36	1,8	1,8
KH ₂ PO ₄	0,25	1	1	5	5
Lượng C (g/l)	8,70	34,8	34,8	72,19	72,19
Lượng N (g/l)	1,05	4,20	4,20	6,31	6,31
C/N	8,28	8,28	8,28	11,45	11,45
Tổng lượng đường(g/l)	13,4	56	56	280	280

Ví dụ tham khảo 1. So sánh nguyên liệu thô là nguồn đường (glukoza và sucroza)

Mỗi 100ml môi trường chứa glucoza (Wako Pure Chemicals), CSL (ROQUETTE), MnCl₂ (Wako Pure Chemicals), và KH₂PO₄ (Wako Pure Chemicals) được chuẩn bị trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml, để các nồng độ cuối cùng như được nêu trong điều kiện môi trường 1 của bảng 1 và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp (glukoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng). Một vòng đủ của *Bacillus subtilis* MBI-600 được lấy từ khuẩn lạc sinh trưởng trên đĩa thạch chứa môi trường dinh dưỡng, được cấy trong điều kiện vô trùng vào môi trường

được mô tả trong điều kiện môi trường 1 của bảng 1 và được nuôi cấy qua đêm cùng với lắc ở 30°C và 150 vòng/phút để thu được chất lỏng tiền nuôi cấy.

Sử dụng thùng nuôi cấy 5L, mỗi 2L của hai môi trường được chuẩn bị để các nồng độ cuối cùng như được nêu trong điều kiện môi trường 2 (thử nghiệm số 2) và 3 (thử nghiệm số 3) của bảng 1, và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp (glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng và sucroza (Wako Pure Chemicals) được trộn trước với tất cả các thành phần môi trường, sau đó khử trùng hỗn hợp này).

Mỗi 100ml từ chất lỏng nuôi cấy sơ bộ *Bacillus subtilis* MBI-600 thu được như đã mô tả nêu trên được cấy trong điều kiện vô trùng vào thùng nuôi cấy 5l để bắt đầu nuôi cấy ở điều kiện 30°C và 500 vòng/phút, và sự cung cấp oxy được điều chỉnh để ngăn nồng độ oxy hòa tan không hạ xuống dưới 10%. Thuật ngữ “nồng độ oxy hòa tan” chỉ giá trị số được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm lượng oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy trên mỗi đơn vị thể tích, và có thể đo được bằng cách sử dụng thiết bị như thiết bị nuôi cấy mặt bàn (MDL-8C) (B. E. MARUBISHI CO., LTD.).

Sau 34 giờ nuôi cấy, chất lỏng nuôi cấy thu được theo cách đó được pha loãng bằng nước vô trùng, và sau đó được áp dụng cho môi trường thạch nước thịt thông thường (Eiken Chemical Co., Ltd.), sau đó được nuôi cấy tĩnh qua đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng các tế bào. Hơn nữa, dung dịch loãng đã được chuẩn bị trước được làm nóng ở 80°C trong 30 phút và sau đó được áp dụng tương tự cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh qua đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng vi khuẩn chịu nhiệt. Tỷ lệ hình thành bào tử được tính toán từ các kết quả này và được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2

Các điều kiện môi trường	2	3
Số lượng các tế bào (cfu/ml)	1,50E+10	1,36E+10
Số lượng các tế bào chịu nhiệt (cfu/ml)	1,39E+10	1,29E+10
Tỷ lệ hình thành bào tử	92,22%	95,04%

Trong thử nghiệm nuôi cấy này, không có sự khác biệt đáng kể được xác nhận về số lượng vi khuẩn chịu nhiệt giữa môi trường chứa glucoza làm nguồn cacbon được khử trùng riêng từ nguồn nitơ và môi trường chứa sucroza làm nguồn cacbon được khử trùng đồng thời với nguồn nitơ, mà trong đó *Bacillus subtilis* MBI-600 được nuôi cấy.

Ví dụ 1. So sánh số lượng vi khuẩn được nuôi cấy bằng nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất

Mỗi 100ml môi trường được chuẩn bị trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml, để các nồng độ cuối cùng được điều chỉnh như được nêu trong điều kiện môi trường 1 của bảng 1 và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp (glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng). Một vòng đủ của *Bacillus subtilis* MBI-600 được lấy từ khuẩn lạc sinh trưởng trên đĩa thạch chứa môi trường dinh dưỡng, được cấy trong điều kiện vô trùng vào môi trường và được nuôi cấy qua đêm cùng với lắc ở 30°C và 150 vòng/phút để thu được chất lỏng nuôi cấy sơ bộ.

Sử dụng thùng nuôi cấy 5L, mỗi 2L của hai môi trường được chuẩn bị để các nồng độ cuối cùng như được nêu trong điều kiện môi trường 3 của bảng 1, và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp (tất cả các thành phần môi trường được trộn trước và sau đó được cho khử trùng bằng nồi hấp).

Sử dụng chai Duran 500ml, một chai 0,4L chứa môi trường được chuẩn bị để các nồng độ cuối cùng như được nêu trong điều kiện môi trường 4 của bảng 1. Chai này được nối trước qua một ống để môi trường có thể bổ sung vào thùng nuôi cấy 5L chứa môi trường của điều kiện môi trường 3, và sau đó nồi hấp được tiến hành (tất cả các thành phần môi trường được trộn trước và sau đó được cho khử trùng bằng nồi hấp).

Mỗi 100ml từ chất lỏng nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy trong điều kiện vô trùng vào mỗi thùng nuôi cấy 5L chứa 2L môi trường ở trên để bắt đầu nuôi cấy ở điều kiện 37°C. Năm giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, cứ mỗi hai giờ môi trường của điều kiện môi trường 4 được bổ sung theo lượng 100ml cho mỗi lần bổ sung được chia làm 4 đợt bổ sung vào một trong các thùng nuôi cấy 5L. Sau khi bắt đầu bổ sung, nhiệt độ nuôi cấy được giảm xuống 30°C để nuôi cấy. Ở thời điểm này, sự cung cấp oxy được điều

chỉnh bằng cách kiểm soát của số vòng để ngăn nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy không hạ xuống dưới 10%. Tỷ lệ tiêu thụ oxy là lớn nhất ở khoảng 8 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. Hai mươi tư giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy được giảm xuống 37°C để nuôi cấy.

Sau 34 giờ nuôi cấy, các chất lỏng nuôi cấy thu được theo cách đó được pha loãng bằng nước vô trùng, và sau đó được áp dụng cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh quá đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng các tế bào. Hơn nữa, dung dịch loãng đã được chuẩn bị trước được làm nóng ở 80°C trong 30 phút và sau đó được áp dụng tương tự cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh quá đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng vi khuẩn chịu nhiệt. Tỷ lệ hình thành bào tử được tính toán từ các kết quả này và được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3

Các điều kiện môi trường	3	3+4
Số lượng các tế bào (cfu/ml)	1,36E+10	1,87E+10
Số lượng các tế bào chịu nhiệt (cfu/ml)	1,29E+10	1,83E+10
Tỷ lệ hình thành bào tử	95,04%	97,90%

Trong thử nghiệm nuôi cấy này, nồng độ vi khuẩn được nhận thấy là tăng 1,5 lần và sự tăng được nhận thấy ở các bào tử *Bacillus subtilis* chịu nhiệt được nuôi cấy bằng nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất trong môi trường chứa sucroza làm nguồn cacbon, trong đó tất cả các thành phần môi trường được khử trùng đồng thời, so với nồng độ của *Bacillus subtilis* không được nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất.

Ví dụ 2. Thử nghiệm nuôi cấy sử dụng môi trường chứa đường khử hoặc đường không khử được khử trùng đồng thời

Mỗi 100ml môi trường được chuẩn bị trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml, để các nồng độ cuối cùng được điều chỉnh như được nêu trong điều kiện môi trường 1 của bảng 1 và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp (glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng). Một vòng đủ của *Bacillus subtilis* MBI-600 được lấy từ khuẩn lạc sinh trưởng trên đĩa thạch chứa môi trường dinh dưỡng, được

cấy trong điều kiện vô trùng vào môi trường và được nuôi cấy qua đêm cùng với lắc ở 30°C và 150 vòng/phút để thu được chất lỏng nuôi cấy sơ bộ.

Mỗi 2L môi trường được chuẩn bị trong thùng nuôi cấy 5L để các nồng độ cuối cùng như được nêu trong điều kiện môi trường 2 và 3 của bảng 1 (glucoza và sucroza được trộn trước với tất cả các thành phần môi trường và sau đó tiến hành khử trùng).

Sử dụng chai Duran 500ml, mỗi 0,4L môi trường được chuẩn bị để các nồng độ cuối cùng được điều chỉnh như được nêu trong điều kiện môi trường 4 và 5 của bảng 1. Các chai này được nối trước qua các ống, để môi trường của điều kiện môi trường 4 có thể được bổ sung vào thùng nuôi cấy 5L chứa môi trường của điều kiện môi trường 2, môi trường của điều kiện môi trường 5 có thể được bổ sung vào thùng nuôi cấy 5L chứa các thành phần của điều kiện môi trường 3, và sau đó nôi hấp được tiến hành (glucoza và sucroza được trộn trước với tất cả các thành phần môi trường và sau đó tiến hành khử trùng).

Mỗi 100ml từ chất lỏng nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy trong điều kiện vô trùng vào thùng nuôi cấy 5L chứa 2L môi trường ở trên để bắt đầu nuôi cấy ở điều kiện 37°C. Năm giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, cứ mỗi 2 giờ môi trường của điều kiện môi trường 4 được bổ sung vào môi trường của điều kiện môi trường 3 và môi trường của điều kiện môi trường 5 được bổ sung vào môi trường của điều kiện môi trường 2 theo lượng 100ml cho mỗi lần bổ sung được chia làm 4 đợt bổ sung. Sau khi bắt đầu bổ sung, nhiệt độ nuôi cấy được giảm xuống 30°C để nuôi cấy. Ở thời điểm này, sự cung cấp oxy được điều chỉnh bằng cách kiểm soát số vòng, để ngăn nồng độ oxy hòa tan trong mỗi môi trường nuôi cấy không hạ xuống dưới 10%. Khi bắt đầu bổ sung, nồng độ glucoza của môi trường nuôi cấy được nuôi cấy với điều kiện môi trường 2 nhỏ hơn 40 g/l, và tỷ lệ tiêu thụ oxy là lớn nhất ở khoảng 8 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. Hai mươi tư giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy được giảm xuống 37°C để nuôi cấy.

Sau 34 giờ nuôi cấy, các chất lỏng nuôi cấy thu được theo cách đó được pha loãng bằng nước vô trùng, và sau đó được áp dụng cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh quá đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được

tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng các tế bào. Hơn nữa, dung dịch loãng đã được chuẩn bị trước được làm nóng ở 80°C trong 30 phút và sau đó được áp dụng tương tự cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh quá đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng vi khuẩn chịu nhiệt. Tỷ lệ hình thành bào tử được tính toán từ các kết quả này và được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4

Các điều kiện môi trường	3+4	2+5
Số lượng các tế bào (cfu/ml)	1,87E+10	1,85E+10
Số lượng các tế bào chịu nhiệt (cfu/ml)	1,83E+10	1,48E+10
Tỷ lệ hình thành bào tử	97,90%	80,30%

Trong thử nghiệm nuôi cấy này, nồng độ vi khuẩn của *Bacillus subtilis*; tức là, số lượng vi khuẩn sinh bào tử thu được bằng nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất trong môi trường chứa glucoza làm nguồn cacbon, trong đó tất cả các thành phần môi trường được khử trùng đồng thời, thấp hơn nồng độ của *Bacillus subtilis* được nuôi cấy bằng nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất sử dụng sucroza làm nguồn cacbon.

Ví dụ 3. Thử nghiệm nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất đối với *Bacillus thuringiensis*

Mỗi 100ml môi trường được chuẩn bị trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml, để các nồng độ cuối cùng được điều chỉnh như được nêu trong điều kiện môi trường 1 của bảng 1 và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp (glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng). Một vòng đủ của *Bacillus thuringiensis* NBRC 101235 được lấy từ khuẩn lạc của nó sinh trưởng trên đĩa thạch chứa môi trường dinh dưỡng, được cấy trong điều kiện vô trùng vào môi trường và được nuôi cấy qua đêm cùng với lắc ở 30°C và 150 vòng/phút để thu được chất lỏng tiền nuôi cấy.

Mỗi 2L của tổng cộng ba môi trường được chuẩn bị trong thùng nuôi cấy 5L để các nồng độ cuối cùng được điều chỉnh như được nêu trong điều kiện môi trường 2 của bảng 1 (glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng).

Sử dụng chai Duran 500ml, mỗi 0,4L môi trường được chuẩn bị để các nồng độ cuối cùng được điều chỉnh như được nêu trong điều kiện môi trường 4 và 5 của bảng 1. Các chai này được nối trước qua các ống, để môi trường của điều kiện môi

trường 4 và 5 có thể được bổ sung riêng vào các thùng nuôi cấy 5L chứa môi trường của điều kiện môi trường 2, và sau đó nổi hấp được tiến hành (glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng, và sucroza được trộn trước với tất cả các thành phần môi trường và sau đó tiến hành khử trùng). Môi trường của điều kiện môi trường 2, mà không được đưa đi nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất, được sử dụng làm đối chứng.

Mỗi 100ml từ chất lỏng nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy trong điều kiện vô trùng vào mỗi thùng nuôi cấy 5L chứa 2L môi trường nêu trên để bắt đầu nuôi cấy ở điều kiện 37°C. Sáu giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, cứ mỗi hai giờ môi trường của điều kiện môi trường 4 hoặc 5 được bổ sung vào một trong hai môi trường trong các thùng nuôi cấy 5l theo lượng 100ml cho mỗi lần bổ sung được chia làm 4 đợt bổ sung. Sau khi bắt đầu bổ sung, nhiệt độ nuôi cấy được giảm xuống 30°C để nuôi cấy. Ở thời điểm này, sự cung cấp oxy được điều chỉnh bằng cách kiểm soát số vòng, để ngăn nồng độ oxy hòa tan trong mỗi môi trường nuôi cấy không hạ xuống dưới 10%, cũng như là dung dịch axit clohydric trong nước 10% và dung dịch natri hydroxit 2M được bổ sung vào mỗi thùng lên men, để điều chỉnh độ pH của mỗi môi trường nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy đến khoảng từ 6,7 đến 7,3. Khi bắt đầu bổ sung, nồng độ glucoza của môi trường nuôi cấy được nuôi cấy với điều kiện môi trường 2 thấp hơn 40g/l, và tỷ lệ tiêu thụ oxy là lớn nhất ở khoảng 8 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. Hai mươi tư giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy được tăng lên 37°C để nuôi cấy.

Sau 34 giờ nuôi cấy, các chất lỏng nuôi cấy thu được theo cách đó được pha loãng bằng nước vô trùng, và sau đó được áp dụng cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh quá đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng các tế bào. Hơn nữa, dung dịch loãng đã được chuẩn bị trước được làm nóng ở 80°C trong 30 phút và sau đó được áp dụng tương tự cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh quá đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng vi khuẩn chịu nhiệt. Tỷ lệ hình thành bào tử được tính toán từ các kết quả này và được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5

Các điều kiện môi trường	2	2+5	2+4
Số lượng các tế bào (cfu/ml)	1,25E+09	1,33E+09	1,74E+09
Số lượng các tế bào chịu nhiệt (cfu/ml)	1,19E+09	1,22E+09	1,61E+09
Tỷ lệ hình thành bào tử	95,1%	91,6%	92,6%

Trong thử nghiệm nuôi cấy này, *Bacillus thuringiensis* được nuôi cấy bằng nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất, để số lượng bào tử chịu nhiệt thu được theo cách đó lớn hơn số lượng bào tử thu được ở các điều kiện không tiến hành bổ sung. Hơn nữa, số lượng các bào tử chịu nhiệt thu được bằng cách bổ sung môi trường chứa sucroza tức là đường không khử lớn hơn số lượng bào tử chịu nhiệt thu được bằng cách bổ sung môi trường chứa glucoza tức là đường khử.

Ví dụ so sánh 1. Nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất chỉ sử dụng nguồn cacbon

Mỗi 100ml môi trường được chuẩn bị trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml, để các nồng độ cuối cùng được điều chỉnh như được nêu trong điều kiện môi trường 1 của bảng 1 và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp (glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng). Một vòng đủ của *Bacillus subtilis* MBI-600 được lấy từ khuẩn lạc của nó sinh trưởng trên đĩa thạch chứa môi trường dinh dưỡng, được cấy trong điều kiện vô trùng vào môi trường và được nuôi cấy qua đêm cùng với lắc ở 30°C và 150 vòng/phút để thu được chất lỏng tiền nuôi cấy.

Mỗi 2L môi trường được chuẩn bị trong thùng nuôi cấy 5L để các nồng độ cuối cùng như được nêu trong điều kiện môi trường 2 của bảng 1 và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp (glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng).

Sử dụng chai Duran 500ml, mỗi 0,4L môi trường được chuẩn bị để nồng độ cuối cùng của glucoza là 125g/l. Chai này được nối trước qua một ống, để môi trường có thể được bổ sung vào thùng nuôi cấy 5L chứa môi trường của điều kiện môi trường 2, và sau đó nồi hấp được tiến hành (glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng).

100ml chất lỏng nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy trong điều kiện vô trùng vào môi trường trên để bắt đầu nuôi cấy ở điều kiện 37°C. Năm giờ sau khi bắt đầu

nuôi cấy, cứ mỗi 2 giờ bổ sung dung dịch glucoza theo lượng 100ml cho mỗi lần bổ sung được chia làm 4 đợt bổ sung. Sau khi bắt đầu bổ sung, nhiệt độ nuôi cấy được giảm xuống 30°C để nuôi cấy. Ở thời điểm này, sự cung cấp oxy được điều chỉnh bằng cách kiểm soát số vòng, để ngăn nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy không hạ xuống dưới 10%. Khi bắt đầu bổ sung, nồng độ glucoza của môi trường nuôi cấy được nuôi cấy với điều kiện môi trường 2 thấp hơn 40g/l, và tỷ lệ tiêu thụ oxy là lớn nhất ở khoảng 8 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. Hai mươi tư giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy được tăng lên đến 37°C để nuôi cấy.

Sau 34 giờ nuôi cấy, các chất lỏng nuôi cấy thu được theo cách đó được pha loãng bằng nước vô trùng, và sau đó được áp dụng cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh quá đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng các tế bào. Hơn nữa, dung dịch loãng đã được chuẩn bị trước được làm nóng ở 80°C trong 30 phút và sau đó được áp dụng tương tự cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh quá đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng vi khuẩn chịu nhiệt. Tỷ lệ hình thành bào tử được tính toán từ các kết quả này và được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6

Các điều kiện môi trường	2+Glu
Số lượng các tế bào (cfu/ml)	1,39E+10
Số lượng các tế bào chịu nhiệt (cfu/ml)	1,13E+10
Tỷ lệ hình thành bào tử	81,29%

Trong thử nghiệm nuôi cấy này, nồng độ vi khuẩn; tức là, nồng độ bào tử *Bacillus subtilis* thu được theo cách đó được nuôi cấy qua bổ sung chỉ glucoza làm nguồn cacbon được nhận thấy là thấp hơn nồng độ của trường hợp (2+5 ở bảng 4) của nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất sử dụng môi trường đồng thời chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ.

Ví dụ 4. So sánh lượng iturin có nguồn gốc từ sự nuôi cấy bởi nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất

Mỗi 100ml môi trường được chuẩn bị trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml, để các nồng độ cuối cùng được điều chỉnh như được nêu trong điều kiện môi trường 1 của bảng 1 và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp (glucoza được khử trùng riêng và được trộn trong điều kiện vô trùng). Một vòng của *Bacillus subtilis* MBI-600 được lấy từ khuẩn lạc của nó sinh trưởng trên đĩa thạch chứa môi trường dinh dưỡng, được cấy trong điều kiện vô trùng vào môi trường và được nuôi cấy qua đêm cùng với lắc ở 30°C và 150 vòng/phút để thu được chất lỏng tiền nuôi cấy.

Mỗi 2L của hai môi trường được chuẩn bị trong thùng nuôi cấy 5L để các nồng độ cuối cùng như được nêu trong điều kiện môi trường 2 của bảng 1 và sau đó tiến hành khử trùng trong nồi hấp (tất cả các thành phần môi trường được trộn trước và sau đó được cho khử trùng bằng nồi hấp).

Sử dụng chai Duran 500ml, một 0,4L của môi trường được chuẩn bị để các nồng độ cuối cùng như được nêu trong điều kiện môi trường 4 của bảng 1. Chai này được nối trước qua một ống, để môi trường có thể được bổ sung vào mỗi thùng nuôi cấy 5L chứa môi trường của điều kiện môi trường 2, và sau đó nồi hấp được tiến hành (tất cả các thành phần môi trường được trộn trước và sau đó được cho khử trùng bằng nồi hấp).

Mỗi 100ml từ chất lỏng nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy trong điều kiện vô trùng vào mỗi thùng nuôi cấy 5L chứa 2L môi trường nói trên của điều kiện môi trường 2 để bắt đầu nuôi cấy ở điều kiện 30°C. Năm giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, cứ mỗi 2 giờ, môi trường của điều kiện môi trường 4 được bổ sung vào một trong các thùng nuôi cấy 5L theo lượng 100ml cho mỗi lần bổ sung được chia làm 4 đợt bổ sung, và tiếp tục nuôi cấy. Ở thời điểm này, sự cung cấp oxy được điều chỉnh bằng cách kiểm soát số vòng, để ngăn nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy không hạ xuống dưới 10%. Tỷ lệ tiêu thụ oxy là lớn nhất ở khoảng 12 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy.

Sau 54 giờ nuôi cấy, các chất lỏng nuôi cấy thu được theo cách đó được pha loãng bằng nước vô trùng, và sau đó được áp dụng cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh quá đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng các tế bào. Hơn nữa, dung dịch

loãng đã được chuẩn bị trước được làm nóng ở 80°C trong 30 phút và sau đó được áp dụng tương tự cho môi trường thạch nước thịt thông thường, sau đó được nuôi cấy tĩnh quá đêm ở 37°C. Số lượng khuẩn lạc được tạo ra theo phương pháp đó được đếm để tính số lượng vi khuẩn chịu nhiệt. Tỷ lệ hình thành bào tử được tính toán từ các kết quả này và được thể hiện ở bảng 7.

Hơn nữa, một trong các của môi trường 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 thập được lớp bề mặt.

6ml axetonitril chứa TFA 0,1% được bổ sung vào cột chiết pha rắn (Nihon Waters K.K. Oasis HLB 3cc (400 mg) LP Extraction Cartridge) và được cho đi qua cột này, và sau đó 6ml nước cất chứa TFA 0,1% được bổ sung để đi qua cột. 2ml 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, và sau đó 6ml nước cất chứa TFA 0,1%, và 6ml axetonitril chứa TFA 0,1%/nước cất (20:80, thể tích/thể tích) được cho đi qua cột lần lượt để rửa. Tiếp đó, 5ml axetonitril chứa TFA 0,1%/nước cất (90:10, thể tích/thể tích) được cho đi qua cột, bằng cách đó thu thập được an 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 5ml, 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 3 phút A 80%/B 20%

3 đến 12 phút A 80%/B 20% $\rightarrow$ B 100%

12 đến 23 phút B 100%

23 đến 27 phút B 100% $\rightarrow$ A 80%/B 20%

27 đến 30 phút A 80%/B 20%

Tốc độ dòng chảy: 1 ml/phút

Nhiệt độ: 40°C

Bước sóng phát hiện: UV205 nm

Lượng phun: 10 µl

Mẫu thực: Iturin A từ *Bacillus subtilis* (Merck)

Nồng độ: 30 ppm, 120 ppm

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

Mỗi môi trường so với mẫu thực về diện tích đỉnh được phát hiện ở thời gian rửa giải 12,1 phút và thời gian rửa giải 12,7 phút, bằng cách đó tính toán được nồng độ iturin trong môi trường nuôi cấy.

Các kết quả được thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả thử nghiệm

Các điều kiện môi trường	2	2+4
Số lượng các tế bào (cfu/ml)	1,23E+10	1,18E+10
Số lượng các tế bào chịu nhiệt (cfu/ml)	0,87E+10	1,21E+10
Tỷ lệ hình thành bào tử	78,5%	101,8%
Nồng độ iturin (ppm)	149,5	319,8

Trong thử nghiệm nuôi cấy này, khoảng nồng độ vi khuẩn tăng khoảng 1,8 lần, nồng độ iturin tăng khoảng 2,1 lần, và lượng tăng nồng độ các bào tử chịu nhiệt được xác nhận ở *Bacillus subtilis* được nuôi cấy bằng nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất so với *Bacillus subtilis* không được nuôi cấy bằng nuôi cấy mẹ có bổ sung cơ chất.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* để thu bào tử và/hoặc các lipopeptit vòng, bao gồm bước nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* trong môi trường lỏng chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường mà có nồng độ nằm trong khoảng từ 50,1g/l đến 100g/l ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy, và sau đó trong quá trình nuôi cấy, bổ sung môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất vào môi trường lỏng để nuôi cấy, trong đó môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất này chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường và hợp chất chứa nitơ, và có tỷ lệ trọng lượng (tỷ lệ C/N) của các nguyên tử cacbon đối với các nguyên tử nitơ nằm trong khoảng từ 5,5 đến 13,5,

trong đó tổng lượng đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường được bổ sung từ môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất cho đến khi kết thúc nuôi cấy là 100g hoặc ít hơn trên mỗi lít môi trường trước khi bổ sung.

2. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm 1, bao gồm bước nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* bằng cách bổ sung môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất có tỷ lệ trọng lượng (tỷ lệ C/N) của các nguyên tử cacbon với các nguyên tử nitơ nằm trong khoảng từ 5,5 đến 12 vào môi trường lỏng.

3. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm 1 hoặc 2, trong đó môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất được bổ sung ở thời điểm trong khoảng thời gian bảy giờ trước hoặc sau thời điểm khi tốc độ tiêu thụ oxy của vi khuẩn *Bacillus* là lớn nhất.

4. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất được bổ sung ở thời điểm trong khoảng thời gian từ ba giờ đến ba mươi giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy.

5. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó môi trường nuôi cấy mẻ có bổ sung cơ chất thu được bằng cách khử trùng bằng nhiệt đối với dung dịch chứa đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường và hợp chất chứa nitơ.

6. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó đường hoặc nguyên liệu thô là nguồn đường là đường không khử.

7. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm 6, trong đó đường không khử là ít nhất một đường được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, trehaloza, kestosa, melezitosa, gentianoza, neobifurcoza, fungitetraoza, planteoza, rafinoza, stachyoza, và bifurcoza.

8. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó hợp chất chứa nitơ là ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm hợp chất nitơ vô cơ bao gồm các muối amoni và amoniac, và nhóm hợp chất nitơ hữu cơ bao gồm các axit amin, các peptit, các protein, ure, bột đậu tương đã loại chất béo, các thành phần có nguồn gốc từ đậu tương, các thành phần có nguồn gốc từ nấm men, dịch chiết ngô cô đặc, bột khô của dịch chiết ngô cô đặc, các thành phần có nguồn gốc từ ngô, các protein động vật và thực vật và các sản phẩm thủy phân của chúng.

9. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó nồng độ oxy hòa tan trong môi trường lỏng được duy trì ở mức 10% hoặc lớn hơn.

10. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó nhiệt độ của môi trường lỏng được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 20°C đến 60°C để kiểm soát sự sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus*.

11. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm 10, trong đó vi khuẩn *Bacillus* được nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28°C đến 32°C trong pha sinh trưởng logarit, và sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35°C đến 39°C.

12. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó vi khuẩn *Bacillus* 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.*

13. Phương pháp sản xuất chất hữu ích được chọn từ nhóm bao gồm bào tử và lipopeptit vòng, bao gồm bước sản xuất chất hữu ích trong môi trường lỏng bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12.
14. Phương pháp sản xuất chất hữu ích theo điểm 13, trong đó chất hữu ích là bào tử của vi khuẩn *Bacillus*.
15. Phương pháp sản xuất chất hữu ích theo điểm 13, trong đó chất hữu ích là lipopeptit vòng.
16. Phương pháp sản xuất chất hữu ích theo điểm 15, trong đó lipopeptit vòng là ít nhất một lipopeptit vòng được chọn từ nhóm bao gồm iturin, surfactin, plipastatin, fengycin, baxilomycin, lichenysin, kurstakin, mycosubtilin, colistin, fusarixidin, paenibacterin, polymyxin và pumilaxidin.