



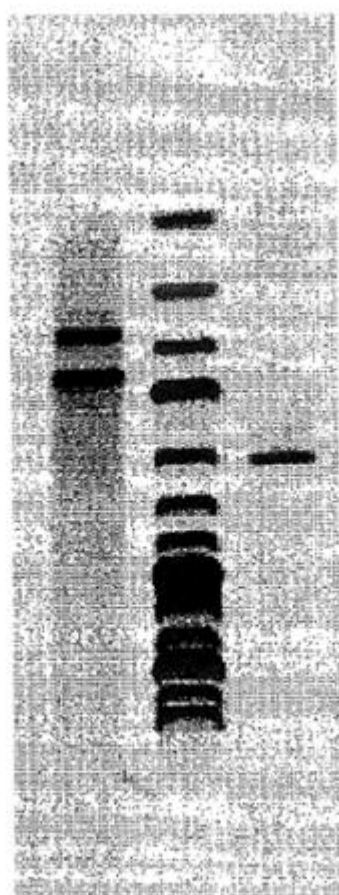
- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2006.01} C12N 1/20; C12R 1/01; C12P 21/00; (13) B
C07K 7/28



1-0042113

-
- (21) 1-2019-06710 (22) 19/05/2017
(62) 1-2018-06053
(86) PCT/RU2017/000326 19/05/2017 (87) WO2017/209651 07/12/2017
(30) 2016121667 01/06/2016 RU
(45) 25/12/2024 441 (43) 25/02/2020 383A
(73) 1. Biotika a.s. (SK)
Slovenska Lupca 566, 976 13, Slovak Republic
2. JOINT STOCK COMPANY "VALENTA PHARMACEUTICALS" (RU)
ul. Fabrichnaya, 2 Shchyolkovo, Moskovskaya obl., 141101, Russian Federation
(72) NESTERUK Vladimir Viktorovich (RU); SYROV Kirill Konstantinovich (RU).
(74) Công ty TNHH Trà và cộng sự (TRA & ASSOCIATES CO.,LTD)
-

- (54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ LỌC GRAMICIDIN S
(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất và lọc gramicidin S bằng cách sử dụng chủng *Aneurinibacillus migulanus* VKPM B-10212.



1 2 3

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học và có thể được dùng để sản xuất hoạt chất gramicidin S bằng cách sử dụng chủng *Aneurinibacillus migulanus* VKPM B-10212. Chủng đột biến thu được cho phép sản xuất chất gramicidin năng suất cao.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phương pháp sản xuất gramicidin S đã biết bao gồm việc nuôi cấy chìm chủng *Bacillus brevis* trong môi trường tổng hợp [V.V. Korshunov. Chức năng sinh lý của sự chuyển hóa *Bacillus brevis* subsp. G.-B. kết hợp với việc sinh tổng hợp gramicidin S.- Luận văn ứng cử, 1962, Moscow, MSU, V.V. Korshunov, N.S. Egorov. Môi trường tổng hợp để nuôi cấy *Bacillus brevis* và sản xuất gramicidin. Mikrobiologiya, 1962; 31: 3, 515-519, V.N. Shaposhnikov, I.L. Rabotnova, A.B. Silaev *et. al.* Phương pháp sản xuất gramicidin S kết tinh. Patent số 187243, 1963, M.B. Kupletskaya. Tác dụng thông khí về sự phát triển và sản xuất gramicidin nhờ nuôi cấy *Bacillus brevis* var. G.-B. Mikrobiologiya, 1965; 34: 5, 905-909, G.G. Zharikova. Sự biến đổi tự nhiên của vi khuẩn bào tử và sự sinh tổng hợp chất kháng sinh polypeptit. - Doct. diss., 1972, Moscow, MSU, A.I. Berezovskaya, A.N. Vypiyach, N.S. Egorov *et. al.* Chủng *Bacillus brevis* 101 - sinh gramicidin S. - Patent số 686463, 1978, Phương pháp nuôi cấy chìm chủng *Bacillus brevis* 101 để sản xuất gramicidin S, -RU2447143, 11/24/2008].

Quy trình tuần hoàn đã biết để sản xuất gramicidin S bao gồm việc nuôi cấy hầu hết các chủng *Bacillus brevis* [T.P. Udalova, Đặc tính của *Bacillus brevis* var. Sự tăng trưởng và phát triển G.-B gắn với sự sinh tổng hợp gramicidin S. - Cand. Diss., 1979, Moscow, MSU], đã được sử dụng để tổng hợp sản phẩm khi nuôi cấy chìm chủng *Bacillus brevis* 101 [T.P. Yudina, đặc tính sinh lý và hóa sinh của *Bacillus brevis* subsp sinh gramicidin. G.-B. và các biến thể của chúng - Cand. Diss., 2002, Moscow, MSU], được đặc trưng bởi việc thực hiện nạp một lần môi trường dinh dưỡng vào lò phản ứng, gieo giống bằng chất cấy, nuôi cấy trong khi sục khí và khuấy trong vòng 27 giờ cho đến khi đạt được độ pH 6,0 và nhỏ hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tạo ra một phương pháp hiệu quả hơn để sản xuất gramicidin với năng suất cao về mặt công nghiệp và tạo ra các vi sinh vật có thể được sử dụng trong phương pháp. Mục đích đạt được bằng cách tạo ra chủng mới *Aneurinibacillus migulanus*, VKPM B-10212.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là kết quả phân tích giới hạn của đoạn ADN mã hóa gen 16S ARN trong chủng thử nghiệm 101.

Fig.2 là cây phát sinh loài với các chủng tương đồng được xây dựng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong một phương án thực hiện, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Aneurinibacillus migulanus* VKPM B-10212.

Trong một phương án thực hiện, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Aneurinibacillus migulanus* VKPM B-10212 sinh gramicidin.

Trong một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chủng vi khuẩn *Aneurinibacillus migulanus* VKPM B-10212 để sản xuất gramicidin.

Tên chung và tên riêng của sự nuôi cấy: *Aneurinibacillus migulanus*.

Số truy cập: VKPM B-10212.

Phương pháp: chủng được tạo ra như một đột biến.

Việc nuôi cấy được nhận dạng bởi RNCIM FSUI "GosNII Genetika" (Moscow), báo cáo nhận dạng về chủng số 101 sử dụng phương pháp phân tích 16S ARN ngày 16/03/2009. Giấy chứng nhận nộp lưu kèm theo. Ngày nộp lưu: 03/03/2009.

Đặc tính nuôi cấy và hình thái của chủng: các que dài từ 4 μm đến 8 μm , rộng từ 0,6 μm đến 0,7 μm , chủng sinh các bào tử có các cạnh hình bầu dục trong khoảng từ 0,8 μm đến 1,0 μm . Nó là loại ưa khí. Nó không biến thành thể lỏng gelatin. Nó không thủy phân tinh bột. Nó sử dụng nitơ ở dạng amoni và amin. Khi được nuôi cấy trên môi trường phát triển thạch trắng của Gauze và Brazhnikova trong khoảng từ 40 giờ đến 48 giờ ở nhiệt độ trong khoảng $40 \pm 1^\circ\text{C}$, nó tạo ra các cụm khuẩn hình tròn, nhô lên bên trên bề mặt thạch trắng với hình miệng núi lửa xác định hoặc tâm điểm. Các cụm khuẩn có màu be, mờ đục và có độ sệt nhão. Các cụm khuẩn có thể được loại bỏ một cách dễ dàng ra khỏi bề mặt

thạch trắng sử dụng một vòng lặp tiêm chủng. Hình dạng và kích thước của các cụm thay đổi lớn phụ thuộc vào thành phần môi trường, mật độ gieo và các nhân tố khác. Trong quá trình nuôi cấy, nó có thể tách ra thành các biến thể có hình thái học khác biệt và việc sản xuất kháng sinh giảm.

Lĩnh vực ứng dụng đối với chủng: sản xuất công nghiệp các kháng sinh.

Sản phẩm tổng hợp bởi chủng: hydroclorua gramicidin S (kết tinh).

Khi được nuôi cấy trong bình lắc ở môi trường “Phòng thí nghiệm Thông thường” lỏng trong 72 giờ, độ hoạt tính của chủng (khả năng sinh), hiệu suất sản xuất khác, sinh $2 \pm 0,3$ g/L gramicidin S tương ứng với $0,2 \pm 0,02$ g_{gramicidin S}/g_{sinh khối}. Khi phát triển trong thiết bị lên men ở các điều kiện tối ưu, việc sản xuất cụ thể gramicidin S có thể tăng lên đến $0,4$ g_{gramicidin S}/g_{sinh khối}. Khả năng sinh trung bình của chủng duy trì ở trạng thái hoạt động trên môi trường thạch trắng vào ngày 27/01/2009 là 2.073 g/L gramicidin S; hàm lượng tạp chất liên quan là 15,3%.

Phương pháp xác định sự hoạt động của chủng bao gồm kỹ thuật: chiết gramicidin S từ chất lỏng nuôi cấy bằng rượu etyl, sau khi xác định nồng độ gramicidin S bằng kỹ thuật sắc ký chất lỏng hiệu quả cao.

Phương pháp, điều kiện và thành phần môi trường để lưu chủng lâu dài: lưu các bào tử trên hạt kê, lưu các tế bào sinh dưỡng và các bào tử ở trạng thái khô đông lạnh (với khoảng từ 10 đến 20% sữa).

Phương pháp, điều kiện và thành phần môi trường để mở rộng chủng: phát triển trên môi trường thạch của Gauze và Brazhnikova (nước men 50% thể tích hoặc 28 mg% dựa vào amin nitơ, pepton 1%, NaCl 0,5%, thạch-thạch 3%, độ pH 7,0) trong khoảng thời gian từ 48 đến 70 giờ ở 40°C. Việc nuôi cấy trên môi trường “Phòng thí nghiệm Thông thường” chất lỏng bán tổng hợp (đối với 1 lít dung dịch: 20 mL glyxerol chung cất, 8 mL axit lactic mức độ thực phẩm 40%, 9,9g K₂HPO₄, 5g NaCl, 0x2 g MgSO₄·7H₂O, 8,12g amoni oxalat, đến 5mg% thể tự phân giải nấm men) trong bình lắc 0,75 L (có 0,1L dung môi) trên bình lắc tròn (tốc độ quay 220 vòng/phút, biên độ 1 m) ở nhiệt độ 40°C trong khoảng thời gian từ 48 đến 72 giờ.

Các điều kiện tối ưu và thành phần môi trường lên men: Môi trường “Lên men Thông thường” (30 mL glyxerol, 24,6 mL axit lactic 40%, 2 g K₂HPO₄, 5 g NaCl; 0,2 g

MgSO₄·7H₂O, 12g amoni oxalat, đến 10 mg% thể tự phân giải nấm men, đến 20 mg% hydrolyzat casein, 2 mL Laprol, độ pH sau khi tiệt trùng nằm trong khoảng từ 7,02 đến 7,2). Sự sục khí là 1,25 m³ O₂/m³ dung dịch/giờ; áp suất là 0,5 MPa; cường độ khuấy nên tạo ra việc chuyển đổi khối oxy nằm trong khoảng từ 0,2 mmol đến 0,3 mmol O₂/L·phút vào lúc bắt đầu lên men đến trong khoảng từ 0,4 mmol đến 1,0 mmol O₂/L·phút vào lúc kết thúc việc lên men, tùy thuộc vào sinh khối đã thu được (trong khoảng từ 0,035 mmol đến 0,045 mmol O₂/g_{biomass}·phút). Trạng thái hóa học ở pH trong khoảng từ 6,4 đến 7,2. Việc nuôi cấy ở trong khoảng thời gian từ 16 giờ đến 48 giờ, tùy thuộc vào phương pháp lên men. ADN của chủng chứa vị trí giới hạn HindIII.

Chủng không gây bệnh ở động vật và không gây bệnh ở cây.

Fig.1. Phân tích giới hạn của đoạn ADN mã hóa gen 16S ARN trong chủng thử nghiệm 101.

1. Đoạn ADN mã hóa gen 16S ARN của chủng thử nghiệm 101, điều trị bằng enzym giới hạn.

2. Dấu Thang ADN 1 kb (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp, từ dưới lên).

3. Đoạn ADN mã hóa gen 16S ARN của chủng thử nghiệm 101, không điều trị bằng enzym giới hạn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Định danh chủng 101 cho loài sử dụng xét nghiệm 16S ARN

Các giai đoạn làm việc

I. Sàng lọc nuôi cấy cho đến khi thành cụm khuẩn riêng và thu được sinh khối cho xét nghiệm 16S ARN

II. Phân lập ADN

III. Chọn chế độ và môi PCR

Môi bảo toàn để sản xuất 16S rADN:

8f - aga gtt tga tcc tgg ctc ag

926r - ccg tca att cct ttr agt tt

1492r - ggt tac cct tgt tac gac tt

với các chế độ phản ứng:

1. 95°C cho 3 phút.

2. 35 chu kỳ

95°C cho 30 giây.

57°C cho 30 giây.

72°C cho 1 phút. 30 giây.

3. 72°C cho 5 phút.

IV. Giải Trình tự 16S rADN, so sánh trình tự và xây dựng cây phân loại

Việc giải trình tự được thực hiện trên máy giải trình tự tự động AE3000.

Đối với việc phân tích trình tự, các chương trình máy tính phát sinh loài chuyên dụng được dùng.

Sự ổn định của việc tái sinh kết quả. Các phản ứng PCR được thực hiện ở ít nhất ba bản sao.

Điều kiện đối với điện di PCR mẫu

Gel agarosa 1,0%, điện di ở điện trường 5V/cm.

V. Phân tích giới hạn mã hóa đoạn ADN gen 16S ARN

a) Giải trình tự vùng biến đổi 16S rADN

Việc giải trình tự các vùng biến đổi 16S rADN tạo ra trình tự nucleotit sắp xếp như sau đối với chủng 101:

```
atgaaggttttcgatcgtaaagttctgttgtagggaagaaccgccggggatgacctccc
cggctctgacggttnctaaacgagaaagccccggctaattctacggtgcccagcagccgc
ggtaatacgtagggggcaagcgttgccggaattattgggcgtaaagcgcgcgagggcgg
cttcttaagtcaggtgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggccacttgaaactggga
agcttgagtgacaggagaggagagcggaattccacgtgtagcgggtgaaatgcgtagagatg
tgagggaacacccgtggcgaaggcggctctctggcctgtaactgacgctgagggcgcgaaa
```

gcgtggggagcgaacaggattagatacccctggttagtccacgccgtaaactgtgagtgct

agggtgtggggactccaatcctcagtgctcgcagctaacgcaat

aagcactccgcctggg

b) Phân tích kết quả giải trình tự và xây dựng cây phân loại

Sàng lọc sơ bộ các cơ sở dữ liệu RDP-II và GenBank cho thấy rằng chủng thử nghiệm thuộc nhóm có hệ thống dưới sau đây: Vi khuẩn; Firmicutes; Bacillales; Paenibacillaceae; nhóm *Aneurinibacillus*; *Aneurinibacillus*, tính tương đồng 98% với loài *Aneurinibacillus migulanus* và *Aneurinibacillus aneurinilyticus*.

Các trình tự được bắt cặp với các trình tự tương ứng từ các loài vi khuẩn liên quan nhất sẵn có từ cơ sở dữ liệu GenBank.

Các kết quả trình tự xử lý bằng chương trình máy tính đặt ở website của RDB II (Ribosomal Database Project II), kết quả này đóng vai trò xác định họ hàng giữa các vi sinh vật và xây dựng các cây phát sinh loài, được trình bày dưới dạng đồ họa.

Bảng 1. Ma trận khoảng cách

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
101.txt	1	---	0,980	0,987	0,958	0,991	0,892	0,907	0,989	0,958	0,989
Ab.anurly3	2	0,020	---	0,985	0,955	0,989	0,895	0,909	0,991	0,955	0,991
Ab.migulan	3	0,013	0,015	---	0,962	0,996	0,902	0,912	0,994	0,962	0,994
Ab.thaerph	4	0,042	0,045	0,038	---	0,967	0,903	0,912	0,965	1	0,965
Ab.migula2	5	0,009	0,011	0,004	0,033	---	0,902	0,917	0,998	0,967	0,998
B.badius2	6	0,108	0,105	0,098	0,097	0,098	---	0,889	0,905	0,903	0,905
Ox1.oxali2	7	0,093	0,091	0,088	0,088	0,083	0,111	---	0,919	0,912	0,919
Ab.anurly2	8	0,011	0,009	0,006	0,035	0,002	0,095	0,081	---	0,965	1
Ab.thaerp2	9	0,042	0,045	0,038	0,000	0,033	0,097	0,088	0,035	---	0,965
Ab.anurlyt	10	0,011	0,009	0,006	0,035	0,002	0,095	0,081	0,000	0,035	---

Bảng 2. Mô tả trình tự

Ab.migula2 *Aneurinibacillus migulanus* DSM 2895 (T)

Ab.anurly2	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> DSM 5562 (T)
Ab.migulan	<i>Aneurinibacillus migulanus</i> ATCC 9999 (T)
Ab.anurlyt	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> NCIMB 10056
Ab.anurly3	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> ATCC 12856 (T)
Ab.thaerph	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> str. L420-91 DSM 10154 (T)
Ab.thaerp2	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> DSM 10155
Ox1.oxali2	<i>Oxalophagus oxalicus</i> str. Alt Ox1 DSM 5503 (T)
B.badius2	<i>Bacillus badius</i> ATCC 14574 (T)
101.txt	Chủng thử nghiệm 101

Phân tích thêm về cơ sở dữ liệu 16S rARN RDP II cho thấy tính tương đồng với cùng loài vi khuẩn, và loài liên quan nhất là *Aneurinibacillus migulanus* và *Aneurinibacillus aneurinilyticus*.

Dựa vào dữ liệu phân tích, cây phát sinh loài với các chủng tương đồng được xây dựng (Fig.2).

Tiêu chuẩn có liên quan của vi sinh vật với một loài cụ thể ít nhất là 97% tính tương đồng. Sử dụng tiêu chuẩn này, chủng thử nghiệm có thể được gọi là loài *Aneurinibacillus migulanus* hoặc *Aneurinibacillus aneurinilyticus*.

Đối với việc định danh chính xác hơn, phân tích giới hạn mã hóa đoạn ADN gen 16S ARN được sử dụng.

Đoạn ADN trong *Aneurinibacillus migulanus* được báo cáo là bao gồm vị trí giới hạn HindIII, trong đó *Aneurinibacillus aneurinilyticus* không chứa vị trí giới hạn này.

Việc phân tích giới hạn được thực hiện để mã hóa đoạn ADN gen 16S ARN trong chủng thử nghiệm 101. Kết quả phân tích được thể hiện trên Fig.1.

Sự có mặt của các đoạn 620 bp và 870 bp sau khi xử lý đoạn ADN với enzym giới hạn HindIII chỉ ra rằng vị trí HindIII được bao gồm trong đoạn ADN từ chủng thử nghiệm 101. Tiêu chuẩn này cho phép đề cập chủng thử nghiệm 101 đến loài *Aneurinibacillus migulanus*.

Ví dụ 2. Phương pháp sản xuất gramicidin S

Gramicidin S được sản xuất sử dụng công nghệ lên men. Phương pháp bao gồm bốn bước: xử lý chủng sinh *Aneurinibacillus migulanus* VKPM B-10212 trong phòng thí nghiệm, bào chế nguyên liệu vacxin, nuôi cấy chất dùng để tiêm chủng trong thiết bị lên men ở phòng thí nghiệm, tạo ra sự sinh tổng hợp gramicidin S trong thiết bị lên men chính.

Các tham số chính của việc lên men được chọn dựa vào hình thái và độ ổn định của chủng sinh *Aneurinibacillus migulanus*, VKPM B-10212. Thời gian nuôi cấy chủng sinh trên môi trường thạch trong lồng ấp nằm trong khoảng từ 48 giờ đến 120 giờ và cho phép chất dùng để tiêm chủng với một lượng lớn so với nuôi cấy trên đĩa Petri. Huyền phù vi khuẩn được lưu trong dung dịch glyxerol bảo vệ 15% ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20°C đến -80°C.

Việc điều chế sơ bộ chất dùng để tiêm chủng được thực hiện trong thiết bị lên men ở phòng thí nghiệm trên môi trường thạch và không có các vi sinh vật khác.

Sau đó, chất dùng để tiêm chủng được chuyển đến thiết bị lên men tiếp theo với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 2,5% khối lượng dung dịch lên men chứa natri xitrat, amoni clorua, kali đihydro phosphat, axit D- và L-lactic theo tỷ lệ 1:1, bột chiết xuất nấm men, bột casein, chất khử bọt Struktol J 647. Các tham số tối ưu cho quy trình lên men là mật độ quang học nằm trong khoảng từ 10 đến 20, độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5 và không có các vi sinh vật khác. Quy trình lên men diễn ra trong khoảng thời gian từ 48 giờ đến 120 giờ.

Giai đoạn sản xuất tiếp theo bao gồm việc lên men chất dùng để tiêm chủng trong thiết bị lên men chính. Khối lượng chất dùng để tiêm chủng là nằm trong khoảng từ 8% đến 17% môi trường lên men chứa natri xitrat, amoni clorua, kali đihydro phosphat, axit D- và L-lactic theo tỷ lệ 1:1, bột chiết xuất nấm men, bột casein, chất khử bọt Struktol J 647. Giá trị pH tối ưu nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,0 được điều khiển bằng cách bổ sung dung dịch amoniac. Nồng độ dinh dưỡng tối ưu được duy trì bằng cách bổ sung dung dịch glyxerol, amoni sulfat và bột ngô. Quy trình lên men diễn ra trong khoảng thời gian từ 48 đến 120 giờ.

Sinh khối tạo ra được lọc bằng thiết bị bộ lọc gồm sử dụng phương pháp lọc qua máy siêu lọc, làm sạch sinh khối bằng nước khử iôn hóa để loại bỏ các chất bẩn ra khỏi sinh khối. Sinh khối đã cô đặc được sấy khô trong máy sấy phun ở nhiệt độ 180°C. Sinh khối đã sấy được làm sạch bằng axeton ở nhiệt độ 40°C để loại bỏ các chất bẩn có màu.

Axeton được loại bỏ bằng cách rửa bằng nitơ tiếp theo một hoặc nhiều lần tráng bằng axeton và sấy chân không với nhiệt độ 45°C.

Tiếp theo, gramicidin S được chiết bằng etanol, điều chỉnh độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 4,0 bằng axit clohydric pha loãng (HCl:etanol = 1:2). Việc chiết được thực hiện lặp đi lặp lại, loại bỏ chất chiết bằng nitơ nén. Sau khi tách etanol, sinh khối được làm khô chân không ở nhiệt độ khoảng 47°C.

Sinh khối khô được hòa tan trong nước và được làm mất màu bằng cacbon hoạt tính tiếp theo việc lọc trên máy lọc ép, tráng bằng etanol để giảm thất thoát sản phẩm qua việc thấm hút bề mặt cacbon.

Chất chiết đã thu được chuyển vào thiết bị kết tinh, được pha loãng bằng nước khử iôn hóa, được bổ sung dung dịch natri clorua và được làm nóng lên nhiệt độ trong khoảng từ 55°C đến 65°C. Sau khi được làm sạch, dung dịch được làm lạnh xuống nhiệt độ không quá 5°C. Tinh thể đã thu được tách trong máy ly tâm và sấy chân không ở nhiệt độ cao nhất khoảng 65°C, được nghiền pin, sàng qua các lưới sàng 400 µm và 200 µm và được đóng gói trong các túi nhựa polyetylen đặt trong các thùng chứa bằng nhôm.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất gramicidin S sử dụng công nghệ lên men, phương pháp bao gồm bốn bước:

- tạo ra, như một chủng sinh, chủng *Aneurinibacillus migulanus*, được nộp lưu tại cơ quan nộp lưu VKPM và có số nộp lưu B-10212, trong phòng thí nghiệm;
- bào chế chất dùng để tiêm chủng;
- nuôi cấy chất dùng để tiêm chủng trong thiết bị lên men ở phòng thí nghiệm;
- tạo ra sự sinh tổng hợp gramicidin S trong thiết bị lên men chính.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc tạo ra chủng *Aneurinibacillus migulanus*, được nộp lưu tại cơ quan nộp lưu VKPM và có số truy cập B-10212, trong phòng thí nghiệm, bao gồm việc xử lý chủng sinh bằng cách lưu huyền phù vi khuẩn trong dung dịch glyxerol bảo vệ 15% ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20°C đến -80°C.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc bào chế chất dùng để tiêm chủng bao gồm việc nuôi cấy chủng sinh trên môi trường thạch trong lồng ấp trong khoảng thời gian từ 48 giờ đến 120 giờ.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc nuôi cấy chất dùng để tiêm chủng trong thiết bị lên men ở phòng thí nghiệm được tiến hành trong môi trường lên men chứa natri xitrat, amoni clorua, kali dihydro phosphat, axit D- và L-lactic, bột chiết xuất nấm men, bột casein, chất khử bọt.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó quy trình lên men diễn ra trong khoảng thời gian từ 48 giờ đến 120 giờ.

6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó lượng chất dùng để tiêm chủng đã nuôi cấy nằm trong khoảng từ 1% đến 2,5% khối lượng môi trường lên men.

7. Phương pháp theo điểm 4, trong đó tỷ lệ giữa axit D- và L-lactic trong môi trường lên men là 1:1.

8. Phương pháp theo điểm 4, trong đó các tham số sau cho quy trình lên men được sử dụng: mật độ quang học nằm trong khoảng từ 10 đến 20, độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sự sinh tổng hợp gramicidin S trong thiết bị lên men chính được tiến hành trong môi trường lên men chứa natri xitrat, amoni clorua, kali dihydrophosphat, axit D- và L-lactic, bột chiết xuất nấm men, bột casein, chất khử bọt.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó khối lượng chất dùng để tiêm chủng là nằm trong khoảng từ 8% đến 17% lượng môi trường lên men.
11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó tỷ lệ giữa axit D- và L-lactic trong môi trường lên men là 1:1.
12. Phương pháp theo điểm 9, trong đó giá trị độ pH tối ưu trong môi trường lên men nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,0.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó giá trị độ pH tối ưu trong môi trường lên men được điều khiển bằng cách bổ sung dung dịch amoniac.
14. Phương pháp theo điểm 9, trong đó nồng độ dinh dưỡng tối ưu được duy trì bằng cách bổ sung dung dịch glyxerol, amoni sulfat và bột ngô.
15. Phương pháp theo điểm 9, trong đó quy trình lên men diễn ra trong khoảng thời gian từ 48 giờ đến 120 giờ.
16. Phương pháp lọc gramicidin S, trong đó sinh khối *Aneurinibacillus migulanus*, được nộp lưu tại cơ quan nộp lưu VKPM và có số nộp lưu B-10212, được lọc bằng thiết bị bộ lọc gồm sử dụng phương pháp lọc qua máy siêu lọc, làm sạch sinh khối bằng nước khử iôn hóa để loại bỏ các chất bẩn ra khỏi sinh khối, sau đó sinh khối đã cô đặc được sấy khô trong máy sấy phun, sinh khối đã sấy được làm sạch bằng axeton để loại bỏ các chất bẩn có màu, axeton được loại bỏ bằng cách rửa bằng nitor tiếp theo một hoặc nhiều lần tráng bằng axeton và sấy chân không;
sau đó, gramicidin S được chiết bằng etanol, điều chỉnh độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 4,0 bằng axit clohydric pha loãng, việc chiết được thực hiện lặp đi lặp lại, loại bỏ chất chiết bằng nitor nén, sau khi tách etanol, sinh khối được sấy chân không;
sinh khối đã sấy được hòa tan trong nước và được làm mất màu bằng cacbon hoạt tính tiếp theo việc lọc trên máy lọc ép, tráng bằng etanol;
chất chiết đã thu được chuyển vào thiết bị kết tinh, được pha loãng bằng nước khử iôn hóa, được bổ sung dung dịch natri clorua và được làm nóng lên nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55°C đến 65°C;

sau khi làm sạch, dung dịch được làm lạnh xuống nhiệt độ không quá 5°C, và tinh thể đã thu được tách trong máy ly tâm và sấy chân không ở nhiệt độ cao nhất là 65°C, được nghiền mịn và sàng.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó sinh khối đã cô đặc được sấy khô trong máy sấy phun ở nhiệt độ 180°C.

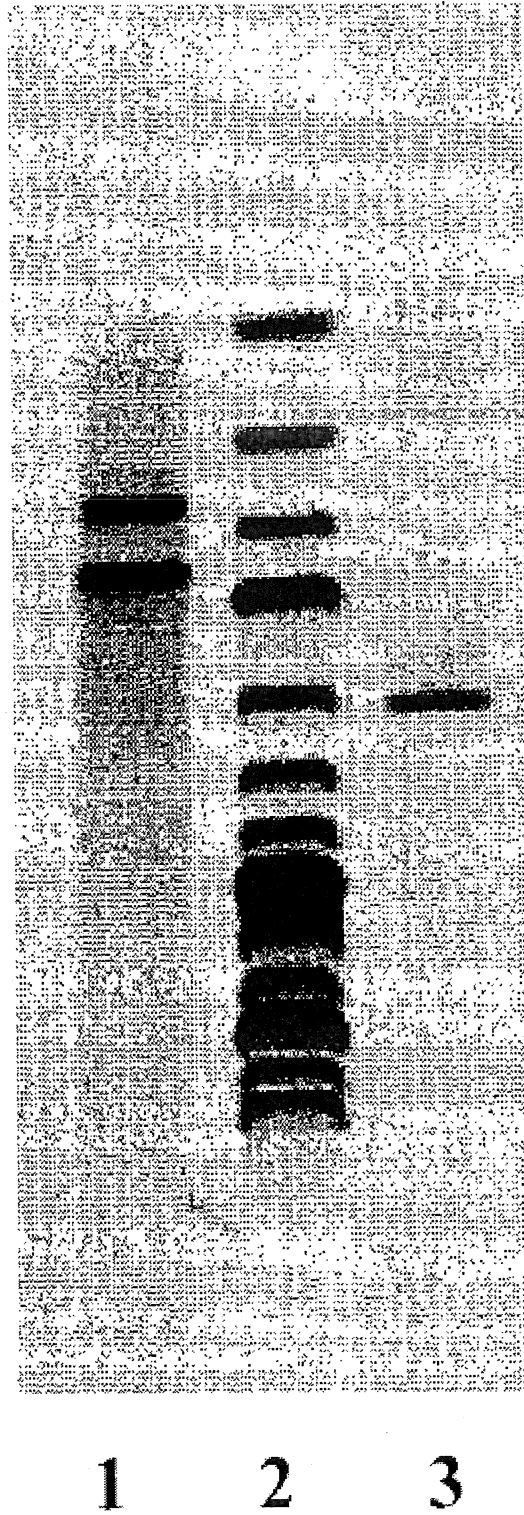
18. Phương pháp theo điểm 16, trong đó việc làm sạch bằng axeton để loại bỏ các chất bẩn có màu được tiến hành ở nhiệt độ 40°C.

19. Phương pháp theo điểm 16, trong đó sinh khối đã cô đặc được sấy khô sau khi lọc chân không ở nhiệt độ 45°C.

20. Phương pháp theo điểm 16, trong đó sinh khối được sấy khô sau khi chiết chân không ở nhiệt độ 47°C.

21. Phương pháp theo điểm 16, trong đó lưới sàng mà tinh thể đã thu được được sàng qua là 400 và 200 μm .

Fig. 1



1/2

Fig. 2

