



(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)



1-0024980

(51)⁷ C12P 13/00; A61K 31/785; A61K 35/742; A61K 8/88; C12R 1/125; A61P 35/00; C12N 1/20; C12N 15/09; A23L 33/10; A61P 3/06 (13) B

(21) 1-2019-01385

(22) 28/07/2017

(86) PCT/JP2017/027488 28/07/2017

(87) WO2018/037833 01/03/2018

(30) 2016-165099 25/08/2016 JP

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/07/2019 376A

(73) KAO CORPORATION (JP)

14-10, Nihonbashi-Kayabacho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038210 (JP)

(72) SAWADA, Kazuhisa (JP); TAMUKAI, Atsuko (JP).

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT POLY-GAMA-GLUTAMIC VÀ VI KHUẨN HÌNH QUE BACILLUS SUBTILIS

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất axit poly-gama-glutamic, phương pháp này bao gồm bước cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được xác định theo số truy cập: NITE BP-02276, số truy cập: NITE BP-02277, số truy cập: NITE BP-02278, số truy cập: NITE BP-02279, số truy cập: NITE BP-02280, hoặc số truy cập: NITE BP-02281. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập tới vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có khả năng sản xuất axit poly-gama-glutamic trong điều kiện môi trường có nồng độ muối cao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất axit poly-gama-glutamic và vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* dùng trong phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit poly-gama-glutamic (cũng được gọi là “axit γ -polyglutamic”, sau đây, cũng được đề cập đến như “PGA” trong bản mô tả sáng chế này) là hợp chất polyme của axit glutamic, mà được bao gồm các nhóm γ -cacboxyl và α -amino của từng axit glutamic bởi các liên kết peptit. PGA được biết đến như một chất nhót được sản xuất bởi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var.natto. Hợp chất này đang được quan tâm thu hút như một nguyên liệu thô polyme mới do các đặc tính khác nhau của nó.

Liên quan đến các đặc tính được biểu hiện bởi PGA có trọng lượng phân tử cao, ví dụ, tài liệu 1 mô tả rằng PGA có trọng lượng phân tử cao này, ở mức lớn hơn 2.000.000, có hoạt tính kháng khối u cao hơn khi so với PGA có trọng lượng phân tử là 100.000. Hơn nữa, tài liệu 2 mô tả rằng PGA có trọng lượng phân tử là 500.000, và trọng lượng phân tử lớn hơn là 2.000.000 có hoạt tính điều chỉnh chuyển hóa lipid.

Các ví dụ về các vi sinh vật tạo ra PGA bao gồm vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* thuộc về chi *Bacillus*, và các loài liên quan, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. chungkookjang, vi khuẩn hình que *Bacillus licheniformis*, vi khuẩn hình que *Bacillus amyloliquefaciens*, vi khuẩn hình que *Bacillus megaterium*, vi khuẩn hình que *Bacillus anthracis*, vi khuẩn hình que *Bacillus halodurans*, và hơn nữa *Natrialba aegyptiaca* thuộc về vi khuẩn cổ haloarchaea. Sau đó, đã biết rằng sản

lượng hoặc trọng lượng phân tử của PGA được sản xuất bởi các vi sinh vật này phụ thuộc lớn vào loại giống và điều kiện cấy của chúng.

Ví dụ, tài liệu sáng chế 1 và tài liệu 3 mô tả rằng một giống của vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. chungkookjang có tính kháng muối tạo ra PGA có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1.000.000. Sau đó, được biểu hiện rằng, trong giống này của vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. chungkookjang, trọng lượng phân tử của PGA để được sản xuất được suy giảm thành trọng lượng phân tử thấp nằm trong khoảng từ 10.000 đến 200.000 trong điều kiện cao hơn 10% (khối lượng/thể tích) theo nồng độ của natri clorua.

Hơn nữa, tài liệu sáng chế 2 mô tả rằng PGA được sản xuất bằng cách cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto trong môi trường chứa như nấm mốc nước tương, và nước tương ủ, trong đó chứa natri clorua. Tài liệu 4 mô tả rằng năng suất PGA được giảm bớt trong giống của vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. chungkookjang được biểu hiện trong tài liệu sáng chế 2, nếu tăng nồng độ của natri clorua có trong môi trường.

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto tạo ra PGA có khoảng 80/20 đến khoảng 50/50 theo tỷ lệ chất đồng phân quang học (tỷ lệ D/L) của axit glutamic. Ngoài ra, thực phẩm chứa vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto được tiêu thụ nhiều ở Nhật Bản, và tính an toàn của chúng được đảm bảo. Do đó, trong số các giống được biểu hiện ở trên, PGA được sản xuất bằng vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto là phù hợp để sử dụng trong thực phẩm, mỹ phẩm hoặc y học.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Các tài liệu sáng chế:

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-2002-233391

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-H8-242880

Các tài liệu khác:

Tài liệu 1: The Chemical Record, 2005, vol. 5, p. 352-366

Tài liệu 2: J. Microbiol. Biotechnol., 2011, vol.21, p. 766-775

Tài liệu 3: Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, vol. 57, p. 764-769

Tài liệu 4: Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, vol. 61(10), p. 1684-1687

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế liên quan đến phương pháp sản xuất PGA, phương pháp này bao gồm bước cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được xác định theo số truy cập: NITE BP-02276, số truy cập: NITE BP-02277, số truy cập: NITE BP-02278, số truy cập: NITE BP-02279, số truy cập: NITE BP-02280, hoặc số truy cập: NITE BP-02281.

Hơn nữa, sáng chế liên quan đến vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được xác định theo số truy cập: NITE BP-02276, số truy cập: NITE BP-02277, số truy cập: NITE BP-02278, số truy cập: NITE BP-02279, số truy cập: NITE BP-02280, hoặc số truy cập: NITE BP-02281.

Các đặc trưng và các thuận lợi khác và hơn nữa của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng và đầy đủ hơn từ phần mô tả chi tiết sáng chế dưới đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như đã nêu trên, các vi sinh vật được nêu trong các tài liệu sáng chế 1 và 2, và các tài liệu 1 và 2 là có khả năng để sản xuất PGA. Tuy nhiên, PGA có hoạt tính kháng khối u và hoạt tính điều chỉnh chuyển hóa lipid, và có trọng lượng phân tử lớn hơn 2.000.000 có tính nhớt cao, và do đó khó có thể sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao với hiệu suất cao trong giống vi khuẩn hình que *Bacillus* và các loài liên quan của chúng.

Trong khi đó, để sản xuất PGA với hiệu suất cao, điều cần thiết là giảm các lượng nạp trong quá trình sản xuất. Ở đây, như một trong số các cách thức để làm giảm lượng nạp trong quá trình sản xuất, việc giảm tính nhớt của môi trường đã được xem xét. Nếu tính nhớt được giảm bớt, hiệu suất khuếch tán của oxy hoặc chất nền được cải thiện, và sự cải thiện về hiệu suất sản xuất có thể được mong đợi trong quá trình cấy. Hơn nữa, sự cải thiện về hiệu suất của việc lọc và ly tâm này cũng được mong đợi trong quá trình tách và thu hồi.

Các ví dụ cụ thể về phương pháp để làm giảm tính nhớt của môi trường bao gồm phương pháp kết hợp muối như natri clorua có trong môi trường ở nồng độ cao. Tuy nhiên, như đã nêu trên, nếu tăng nồng độ của natri clorua trong môi trường, thì nhìn chung PGA được sản xuất được tạo thành trong nguyên liệu trọng lượng phân tử thấp, và/hoặc năng suất của PGA bị giảm bớt, trong giống vi khuẩn hình que *Bacillus* là vi khuẩn và các loài liên quan của chúng.

Do đó, khó có thể sản xuất PGA có trọng lượng phân tử lớn hơn 300.000 dưới các điều kiện nồng độ muối cao trong giống vi khuẩn hình que *Bacillus* và các loài liên quan của chúng.

Do đó, sáng chế liên quan tới việc cung cấp phương pháp sản xuất PGA, trong đó lượng nạp lên quá trình sản xuất của PGA được giảm bớt, và PGA có trọng lượng phân tử cao có thể được sản xuất.

Ngoài ra, sáng chế liên quan tới việc cung cấp vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có tính kháng với các nồng độ muối cao, và có khả năng sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao dưới các điều kiện nồng độ muối cao.

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu tỉ mỉ để cung cấp phương pháp sản xuất PGA và vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được biểu hiện ở trên. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã tìm ra vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có tính kháng với nồng độ muối cao, và có khả năng sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao dưới các điều kiện nồng độ muối cao. Sau đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện

ra rằng, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* này được cấy dưới các điều kiện nồng độ muối cao, sự sản xuất của PGA có trọng lượng phân tử cao có thể được thực hiện, và đồng thời lượng nạp lên quá trình sản xuất của PGA có thể được giảm.

Sáng chế được hoàn thành dựa vào các kết quả này.

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có tính kháng với nồng độ muối cao, và khả năng sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao dưới các điều kiện nồng độ muối cao.

Do đó, PGA có trọng lượng phân tử cao có thể được sản xuất bằng cách cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế. Hơn nữa, PGA có thể được sản xuất với hiệu suất cao mà không áp dụng lượng nạp lên quá trình sản xuất của PGA bằng cách cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* dưới các điều kiện nồng độ muối cao.

Thuật ngữ “Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto” trong bản mô tả sáng chế này có nghĩa là các vi sinh vật mà có thể được phân loại trong vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* từ các đặc tính vi sinh vật học, sự phân tích các kết quả của trình tự nucleotit của gen 16S rARN và khả năng sản xuất PGA.

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có tính kháng với nồng độ muối cao, và có khả năng sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao dưới các điều kiện nồng độ muối cao. Do đó, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế được phân loại trong vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto. Dưới các điều kiện nồng độ muối cao, PGA được sản xuất bởi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có trọng lượng phân tử lớn hơn khi so sánh với PGA được sản xuất bởi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto thông thường. Hơn nữa, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có tính kháng với nồng độ muối cao mạnh hơn so với vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto thông thường có khả năng sản xuất PGA.

PGA có trọng lượng phân tử cao có thể được sản xuất bằng cách cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế dưới các điều kiện phù hợp. Cụ thể là, PGA có trọng lượng phân tử cao có thể được sản xuất mà không áp dụng lượng nạp lên quá trình sản xuất của PGA bằng cách cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế dưới các điều kiện nồng độ muối cao.

Hơn nữa, PGA cũng có thể được điều chỉnh đến trọng lượng phân tử mong muốn bằng cách xử lý PGA đã thu được thành nguyên liệu trọng lượng phân tử thấp. Ví dụ, trọng lượng phân tử của PGA có thể được điều chỉnh đến phạm vi mong muốn bằng cách sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao bằng cách cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế dưới điều kiện phù hợp, và xử lý PGA đã thu được thành nguyên liệu trọng lượng phân tử thấp bằng cách như xử lý nhiệt dưới điều kiện axit và việc xử lý sử dụng các enzym làm giảm giá trị PGA. Ở đây, thuật ngữ “trọng lượng phân tử” được thể hiện trong bản mô tả sáng chế này là đồng nghĩa với “trọng lượng phân tử trung bình khối”. Hơn nữa, tất cả trong số “% (khối lượng/thể tích)” hoặc “M” như một ký hiệu của nồng độ muối, “% (khối lượng/thể tích)” hoặc “(g/L)” như một ký hiệu của nồng độ thành phần môi trường, và “(g/L)” như một ký hiệu của PGA nồng độ đề cập đến nồng độ ở nhiệt độ phòng.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế là vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có tính kháng với nồng độ muối cao, và vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* mà có thể tăng trưởng trong môi trường LB trong đó nồng độ của natri clorua được điều chỉnh đến 12% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 2,05 M, nhiệt độ phòng) hoặc cao hơn.

Như cũng được thể hiện trong phần ví dụ thực hiện sáng chế được đề cập sau đây, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto đã biết công khai có khả năng sản xuất PGA không có tính kháng với nồng độ muối cao, và không thể

tăng trưởng trong môi trường LB có 12% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn theo nồng độ của natri clorua. Ngược lại, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có tính kháng với nồng độ muối cao, và có thể tăng trưởng ngay cả trong môi trường LB có 12% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn theo nồng độ của natri clorua. Giới hạn trên của nồng độ của natri clorua trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có thể tăng trưởng là 16 đến 17% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 2,74 đến 2,91 M) dưới điều kiện sử dụng môi trường TSB, và 15% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 2,57 M) dưới điều kiện sử dụng môi trường LB.

Ở đây, cụm từ “có thể tăng trưởng trong môi trường LB được điều chỉnh đến 12% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn theo nồng độ của natri clorua” có nghĩa là số các tế bào được cấy thêm vào tăng bằng cách cấy dưới điều kiện là 12% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn theo nồng độ của natri clorua. Ngoài ra, “sự tăng trưởng” trong bản mô tả này có thể được tính tương đối bằng sự tăng về độ hấp thụ sau khi đo độ hấp thụ (OD600) của cả việc cấy trước và sau khi cấy.

Hơn nữa, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có khả năng sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao. Cụ thể là, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có khả năng sản xuất PGA có trọng lượng phân tử là 300.000 hoặc lớn hơn, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy dưới điều kiện nồng độ muối cao là 10% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 1,71 M, nhiệt độ phòng) theo nồng độ của natri clorua. Trọng lượng phân tử của PGA được sản xuất bởi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế tốt hơn là 500.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1.000.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 2.000.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 5.000.000 hoặc lớn hơn, và còn tốt hơn nữa là 10.000.000 hoặc lớn hơn, bằng cách cấy dưới điều kiện trong đó nồng độ của natri clorua là 10% (khối lượng/thể tích). Ngoài ra, giới hạn trên của chúng thường là 50.000.000.

Ngoài ra, cụm từ “có khả năng sản xuất PGA có trọng lượng phân tử là 300.000 hoặc lớn hơn dưới điều kiện nồng độ muối cao” có nghĩa cụ thể rằng, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy bằng cách sử dụng môi trường chứa 10% (khối lượng/thể tích) của natri clorua và chứa các chất dinh dưỡng hoặc các khoáng chất cần thiết cho sự tăng trưởng, PGA có trọng lượng phân tử là 300.000 hoặc lớn hơn được sản xuất ít nhất theo sản lượng là 0,1 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn là theo sản lượng là 0,5 g/L/ 3 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là theo sản lượng là 1,0 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn, và còn tốt hơn nữa là theo sản lượng là 5,0 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn. Hơn nữa, axit glutamic đóng vai trò như một chất nền của PGA có thể được bao gồm hoặc không cần được bao gồm trong môi trường sử dụng. Hơn nữa, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy trong môi trường chứa 8% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 1,37 M) của natri glutamat monohydrat, PGA có thể tốt hơn là được sản xuất theo sản lượng là 10 g/L hoặc nhiều hơn, và khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy trong môi trường không chứa axit glutamic, PGA có thể tốt hơn là được sản xuất theo sản lượng là 0,3 g/L hoặc nhiều hơn.

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế tốt hơn là có gen 16S rARN bao gồm trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7 hoặc 8. Ngoài ra, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế tốt hơn là có gen 16S rARN bao gồm trình tự nucleotit có 99,75% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 99,85% hoặc cao hơn, và tốt hơn nữa là 99,90% hoặc cao hơn tương đồng với trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7 hoặc 8. Ngoài ra, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế tốt hơn là có gen 16S rARN bao gồm trình tự nucleotit trong đó tốt hơn là 1 đến 3 nucleotit, tốt hơn nữa là 1 nucleotit được xóa bỏ, được thay thế, được chèn và/hoặc được bổ sung cho trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7 hoặc 8.

Trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7 là trình tự nucleotit của gen 16S rARN của giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA610.

Hơn nữa, trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 8 là trình tự nucleotit của gen 16S rARN của giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB553.

Tính đồng nhất của các trình tự nucleotit, theo sáng chế, có thể được xác định bằng cách sử dụng “BLAST cơ bản” trong “BLAST” trong nhãn chọn “Nucleotit” của cơ sở dữ liệu chung NCBI (Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học quốc gia, <http://www.ncbi.nlm.gov/>). Ngoài ra, tính đồng nhất của các trình tự nucleotit cũng có thể được xác định thông qua việc sử dụng chương trình phân tích tính đồng nhất của Genetyx-Win (phần mềm xử lý thông tin di truyền, được sản xuất bởi GENETYX) với cỡ đơn vị (lớp dữ liệu k) được đặt đến 6.

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế tốt hơn là có các đặc tính vi sinh vật học được thể hiện ở Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Dạng	Dạng roi
Đặc tính nhuộm vi khuẩn gram	+
Sự hình thành bào tử	+
Di động	+
Dạng khuẩn lạc (môi trường thạch LB)	Dạng tròn, màu kem, nhót
Thử nghiệm nhiệt độ tăng trưởng	37°C, tốt 45°C, tốt
Phản ứng Catalaza	+
Phản ứng Oxidaza	+
Sản xuất axit/khí từ Glucoza	-/-
Thử nghiệm O/F (sự oxy hóa/sự lên men)	-/-

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế tốt hơn là vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* (1) hoặc (2), được biểu hiện dưới đây.

(1) Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* biểu hiện các đặc tính vi sinh vật học được thể hiện ở Bảng 1, và có gen 16S rARN tương đồng với trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7, trình tự nucleotit tốt hơn là có 99,75% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 99,85% hoặc cao hơn, và còn tốt hơn nữa là 99,90% hoặc cao hơn tương đồng với trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7, hoặc trình tự nucleotit trong đó tốt hơn là 1 đến 3 nucleotit, tốt hơn nữa là 1 nucleotit được xóa bỏ, được thay thế, được chèn và/hoặc được bổ sung cho trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7.

(2) Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* biểu hiện các đặc tính vi sinh vật học được thể hiện ở Bảng 1 và có gen 16S rARN tương đồng với trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 8, trình tự nucleotit tốt hơn là có 99,75% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 99,85% hoặc cao hơn, và còn tốt hơn nữa là 99,90% hoặc cao hơn tương đồng với trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 8, hoặc trình tự nucleotit trong đó tốt hơn là 1 đến 3 nucleotit, tốt hơn nữa là 1 nucleotit được xóa bỏ, được thay thế, được chèn, và/hoặc được bổ sung cho trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 8.

Trong số vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA610 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02276. Giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA610 này đã thu được bởi các tác giả trong phòng thí nghiệm của người nộp đơn (Tochigi, Japan) khoảng tháng 6 năm 2012.

Ngoài ra, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA631 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá

và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02277. Giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA631 này đã thu được bởi các tác giả trong phòng thí nghiệm của người nộp đơn (Tochigi, Japan) khoảng tháng 6 năm 2012.

Ngoài ra, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB406 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02278. Giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB406 này đã thu được bởi các tác giả trong phòng thí nghiệm của người nộp đơn (Tochigi, Japan) khoảng tháng 6 năm 2013.

Ngoài ra, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB425 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02279. Giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB425 này đã thu được bởi các tác giả trong phòng thí nghiệm của người nộp đơn (Tochigi, Japan) khoảng tháng 6 năm 2013.

Ngoài ra, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB540 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02280. Giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB540 này đã thu được bởi các tác giả trong phòng thí nghiệm của người nộp đơn (Tochigi, Japan) khoảng tháng 6 năm 2013.

Ngoài ra, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB553 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02281. Giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB553 này đã thu được bởi các tác giả trong phòng thí nghiệm của người nộp đơn (Tochigi, Japan) khoảng tháng 6 năm 2013.

Ngoài ra, tất cả vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế là các vi sinh vật của dạng tự nhiên, và được phân loại trong vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*, và có khả năng sản xuất PGA là đặc trưng của vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto.

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có thể được phân lập hoặc thu được bằng cách thực hiện các phương pháp dưới đây hoặc sự kết hợp của chúng.

Cụ thể là, các vi sinh vật xuất hiện trên môi trường thạch có thể thu được bằng cách khuấy đục một mẫu thực phẩm có sẵn trên thị trường hoặc một mẫu trong môi trường xung quanh như đất trong một dung dịch muối sinh lý, rải nguyên liệu tạo thành lên môi trường thạch, và cung cấp nguyên liệu tạo thành để cấy tĩn. Ngoài ra, đối với việc sử dụng được phẩm và/hoặc thực phẩm của PGA, nguồn tách của chúng tốt hơn là được lấy từ mẫu thực phẩm. Các ví dụ cụ thể về việc tách các vi sinh vật bao gồm phương pháp trong đó khuẩn lạc đơn được cho xuất hiện bằng cách cấy ria các vi sinh vật từ môi trường thạch lên môi trường thạch mới, hoặc bằng cách pha loãng mẫu khuấy đục được biểu hiện ở trên bằng cách sử dụng dung dịch được pha loãng phù hợp như dung dịch muối sinh lý, và sau đó rải nguyên liệu tạo thành trên môi trường thạch.

Các ví dụ cụ thể về phương pháp để thu được vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có hiệu suất cao bao gồm phương pháp áp dụng xử lý nhiệt trước cho

mẫu được biểu hiện ở trên do vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* là vi khuẩn tạo thành bào tử, phương pháp sử dụng sự khác biệt về việc sử dụng các chất dinh dưỡng như đường, và phương pháp xác nhận sự sản xuất của nguyên liệu nhót xung quanh khuẩn lạc. Ngoài ra, các ví dụ cụ thể về phương pháp để thu được các vi sinh vật có tính kháng với nồng độ muối cao bao gồm phương pháp tách trước các vi sinh vật trong môi trường thạch chứa muối ở nồng độ cao, và phương pháp chọn lựa các vi sinh vật biểu hiện tốt sự tăng trưởng trong môi trường lỏng chứa muối ở nồng độ cao.

Hơn thế nữa, các ví dụ cụ thể về phương pháp để thu được các vi sinh vật không cần đến axit glutamic đối với sự sản xuất PGA bao gồm phương pháp để thu được các vi sinh vật tạo thành khuẩn lạc nhót trong môi trường thạch mà không bổ sung axit glutamic, và phương pháp để thu được các vi sinh vật sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao trong dịch môi trường nuôi cấy bằng cách cấy sử dụng môi trường lỏng mà không bổ sung axit glutamic.

Như phương pháp sản xuất PGA của sáng chế, PGA được sản xuất bằng cách sử dụng vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* nêu trên của sáng chế.

Như đã nêu trên, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có tính kháng với nồng độ muối cao khi được so sánh với vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto thông thường. Do đó, môi trường có nồng độ muối cao hơn thông thường có thể được sử dụng để sản xuất PGA bằng cách sử dụng vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế.

Nói chung, chất điện phân polyme trở thành ion polyme trong dung dịch có nước để gây ra sự phân ly với ion ngược. Trường tĩnh điện mạnh được sinh ra bởi sự phân ly này, và do đó các ion ngược được hóa đặc trong đường tròn bởi lực tĩnh điện này. Kết quả là, đã được báo cáo rằng sự giảm rõ ràng về hoạt tính ion ngược được gây ra. Hơn nữa, được dự đoán là dạng sợi đơn của ion polyme chủ yếu được gây ra bởi sự tương tác tĩnh điện, và sự co rõ ràng được gây ra bởi

sự tăng về nồng độ muối (Seigou Kawaguchi, Polymer, vol. 53, p. 716-718, 2004). Do đó, ngoài hoạt động của PGA là chất điện phân polyme trong dung dịch có nước, tính nhớt của dung dịch có nước có thể được giảm bằng cách tăng nồng độ muối trong môi trường. Hơn nữa, hiệu suất về hoạt động của các phân tử oxy được hòa tan được giảm bớt trong chất lỏng có tính nhớt cao và độ lỏng thấp, và do đó cần nảy sinh để thực hiện việc khuấy thông khí sử dụng một lượng lớn không khí để đảm bảo khả năng cung cấp oxy cần thiết cho sự tăng trưởng của các vi sinh vật ưa khí. Hơn nữa, trong hệ thống cấy sử dụng chất gây men với việc khuấy thông khí sử dụng một lượng lớn không khí này, sự sinh ra các bọt khí khi tính nhớt của canh trường cấy cao có thể được mong đợi để làm cho việc cấy khó khăn. Hơn thế nữa, một mẫu chất lỏng có độ lỏng thấp là kém về hiệu suất truyền trong quá trình sản xuất, và có thể được mong đợi để làm giảm đáng kể tính thấm được, cụ thể là trong sự loại bỏ tế bào vi khuẩn bằng sự ly tâm, và các xử lý màng như vi lọc và siêu lọc. Phương pháp sản xuất PGA theo sáng chế do đó có thể làm giảm lượng nạp trong quá trình sản xuất PGA, mà là chất điện phân polyme biểu hiện tính nhớt cao trong dung dịch có nước.

Trong quá trình sản xuất của PGA bằng cách sử dụng vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế được cấy trong môi trường phù hợp và PGA được sản xuất ngoại bào được thu hoạch từ môi trường.

Như môi trường đã đề cập, môi trường bao gồm nhóm đường như glyxerol, glucoza, fructoza, maltoza, sucroza, xyloza, mannoza, galactoza, hoặc tinh bột, như nguồn cacbon để sản xuất PGA có thể được sử dụng. Hơn nữa, môi trường chứa các axit hữu cơ khác nhau như axit xitric hoặc axit axetic, hoặc muối của chúng, và axit glutamic hoặc muối của chúng như nguồn cacbon để sản xuất PGA có thể được sử dụng.

Trong phương pháp sản xuất PGA của sáng chế, như nguồn cacbon để sản xuất PGA, một loại của các nguồn cacbon được biểu hiện ở trên có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại hơn của chúng có thể được kết hợp và được sử dụng.

Trong môi trường được sử dụng trong phương pháp sản xuất PGA của sáng chế, nguồn nitơ như một sản phẩm tự nhiên bao gồm các protein dễ tương tác khác nhau, axit amin, polypepton, trypton, amôni clorua, amôni sulfat, amôni nitrat và urê có thể được kết hợp, khi cần. Như nguồn nitơ mà có thể được sử dụng trong sáng chế, một loại trong số các nguồn nitơ được biểu hiện ở trên có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại của chúng có thể được kết hợp và được sử dụng.

Môi trường được sử dụng theo sáng chế có thể là môi trường tổng hợp, hoặc môi trường tự nhiên.

Xét về việc cải thiện hơn nữa năng suất PGA, axit glutamic và/hoặc muối của chúng có thể được bổ sung trong môi trường.

Nồng độ của axit glutamic và/hoặc muối của chúng trong môi trường có thể bố trí thích hợp. Ví dụ, nồng độ của axit glutamic và/hoặc muối của chúng (giá trị tương đương của axit glutamic) trong môi trường tốt hơn là 0,005 g/L hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 0,05 g/L hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn nữa là 0,1 g/L hoặc nhiều hơn, và còn tốt hơn nữa là 0,5 g/L hoặc nhiều hơn. Giới hạn trên của chúng là, xét về việc ngăn chặn sự kết tủa của axit glutamic hoặc các thành phần môi trường khác trong môi trường, tốt hơn là 600 g/L hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 500 g/L hoặc ít hơn, còn tốt hơn nữa là 400 g/L hoặc ít hơn, và còn tốt hơn nữa là 300 g/L hoặc ít hơn.

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có thể sản xuất PGA bằng cách sử dụng nguồn nitơ vô cơ, và nguyên liệu khác ngoài axit glutamic, như glucoza và glyxerol như nguồn cacbon ngay cả dưới dự không tồn tại của axit glutamic.

Axit glutamic có thể được sản xuất bằng phương pháp lên men sử dụng sinh khối như một nguyên liệu thô, và được sử dụng như một nguyên liệu thực phẩm hoặc vật liệu cung cấp. Các vi sinh vật mà có thể sản xuất PGA là nguyên liệu polyme hữu ích với hiệu suất cao mà không sử dụng axit glutamic này như nguyên liệu thô được coi là hữu ích từ quan điểm ngăn ngừa sự cạnh tranh với thực phẩm này hoặc còn xét về chi phí sản xuất công nghiệp.

Do đó, xét về sự không có cạnh tranh với thực phẩm sự sản xuất, và chi phí sản xuất, có thể thích hợp là để sản xuất PGA bằng cách cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế trong môi trường chứa nguồn nitơ rẻ khác ngoài axit glutamic, và nguồn cacbon, mà không chứa axit glutamic.

Loại muối được bao gồm trong môi trường có thể được lựa chọn thích hợp. Các ví dụ bao gồm natri clorua và kali clorua là các muối kim loại có hóa trị một, và canxi clorua, ma-giê clorua, canxi cacbonat, ma-giê cacbonat, canxi sulfat, và ma-giê sulfat là các muối kim loại có hóa trị hai. Trong số đó, có thể thích hợp để sử dụng ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, kali clorua, canxi clorua, và ma-giê clorua.

Hơn nữa, nồng độ muối trong môi trường có thể được lựa chọn thích hợp.

Ví dụ, trong trường hợp trong đó muối là muối kim loại có hóa trị một, nồng độ của chúng tốt hơn là 0,01 M hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,1 M hoặc lớn hơn, còn tốt hơn nữa là 0,5 M hoặc lớn hơn, và còn tốt hơn nữa là 1,0 M hoặc lớn hơn. Ngoài ra, giới hạn trên của chúng tốt hơn là nồng độ mà không ức chế sự tăng trưởng tế bào hoặc sự sản xuất PGA. Cụ thể là, tốt hơn là 2,5 M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 2,0 M hoặc nhỏ hơn, và còn tốt hơn nữa là 1,75 M hoặc nhỏ hơn.

Hơn nữa, ví dụ, trong trường hợp trong đó muối là muối kim loại có hóa trị hai, nồng độ của chúng tốt hơn là 0,01 M hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,1 M hoặc lớn hơn, còn tốt hơn nữa là 0,5 M hoặc lớn hơn, và còn tốt hơn nữa là 1,0

M hoặc lớn hơn. Ngoài ra, giới hạn trên của chúng tốt hơn là nồng độ mà không ức chế sự tăng trưởng tế bào hoặc sự sản xuất PGA. Cụ thể là, tốt hơn là 2,0 M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 1,75 M hoặc nhỏ hơn, và còn tốt hơn nữa là 1,5 M hoặc nhỏ hơn.

Ngoài ra, tính nhớt của môi trường được sử dụng và dịch môi trường nuôi cấy sau khi cấy có thể được điều chỉnh trong phạm vi mong muốn bằng cách điều chỉnh nồng độ muối trong môi trường. Ngoài ra, phương pháp để đo tính nhớt của môi trường theo sáng chế có thể được thực hiện bằng máy đo độ nhớt Brookfield phù hợp để đo tính nhớt của chất lưu phi Newton.

Điều kiện cấy của vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có thể được lựa chọn thích hợp phù hợp với vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được sử dụng, hoặc tương tự. Cụ thể là, nhiệt độ tối ưu tốt hơn là 20°C hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 25°C hoặc cao hơn, và còn tốt hơn nữa là 30°C hoặc cao hơn. Giới hạn trên của chúng tốt hơn là 50°C, tốt hơn nữa là 45°C, và còn tốt hơn nữa là 40°C. Giá trị pH tối ưu tốt hơn là 5 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 5,5 hoặc lớn hơn, và còn tốt hơn nữa là 6,5 hoặc lớn hơn. Giới hạn trên của chúng tốt hơn là 8, tốt hơn nữa là 7,5, và còn tốt hơn nữa là 7.

Thời gian cấy tốt hơn là 0,5 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 1 ngày hoặc nhiều hơn, và còn tốt hơn nữa là 3 ngày hoặc nhiều hơn, sau khi cấy ghép. Phương pháp cấy không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ của chúng bao gồm cấy lắng, cấy khuấy, cấy thông khí, và cấy tĩnh điện.

Để thu hoạch PGA được tích lũy trong môi trường, cần thiết loại bỏ tế bào vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* mà có sản xuất PGA. Phương pháp để loại bỏ tế bào không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ của chúng bao gồm, phương pháp ly tâm, phương pháp loại bỏ sử dụng màng vi lọc hoặc màng siêu lọc, sự loại bỏ của sự kết tủa sử dụng chất làm đông, và phương pháp thẩm tách. Hơn nữa, các phương pháp này có thể được sử dụng kết hợp thích hợp.

Hơn nữa, phương pháp để tách PGA từ dịch môi trường nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, hoặc, và PGA có thể được tách bằng phương pháp thông thường được sử dụng khi nguyên liệu được sản xuất được phân lập hoặc được thu hoạch. Ví dụ, PGA mục tiêu có thể được phân lập hoặc được thu hoạch bằng sự kết tủa dung môi hữu cơ sử dụng axeton, metanol, etanol hoặc tương tự, sự phân đoạn ghi sắc sử dụng cột lọc chất keo hoặc cột trao đổi ion, sự tách bằng sự kết tủa axit trong đó pH được điều chỉnh đến vùng lân cận của điểm đẳng điện của PGA, thẩm tách ion bằng điện, hoặc tương tự.

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có năng suất PGA tuyệt vời, và có thể sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao cũng dưới điều kiện nồng độ muối cao. Sản lượng PGA được sản xuất bởi sáng chế tốt hơn là 0,1 g/3 ngày hoặc nhiều hơn, 0,5 g/3 ngày hoặc nhiều hơn, 1,0 g/3 ngày hoặc nhiều hơn, và 5,0 g/3 ngày hoặc nhiều hơn, cho mỗi 1 L của môi trường.

Khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế được cấy dưới điều kiện này là 7,3% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 1,25 M) theo nồng độ của natri clorua trong đó năng suất PGA được giảm bớt trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto, sản lượng là 10 g/3 ngày hoặc nhiều hơn cho mỗi 1 L của môi trường là có thể thích hợp dưới điều kiện chứa 8% (khối lượng/thể tích) của natri glutamat monohydrat đóng vai trò như chất nền của PGA.

Hơn nữa, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế được cấy dưới điều kiện này là 10,2% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 1,75 M) theo nồng độ của natri clorua trong đó sự tăng trưởng trở nên khó khăn trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto, sản lượng của 0,5 g/3 ngày hoặc nhiều hơn cho mỗi 1 L của môi trường là có thể thích hợp dưới điều kiện chứa 8% (khối lượng/thể tích) của natri glutamat monohydrat đóng vai trò như chất nền của PGA. Hơn thế nữa, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của

sáng chế được cấy dưới điều kiện này của 7,3% (khối lượng/thể tích) theo nồng độ của natri clorua trong đó sự sản xuất của PGA không thể được mong đợi trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto, và dưới điều kiện của sự không tồn tại của axit glutamic đóng vai trò như chất nền của PGA, sản lượng của 0,1 g/3 ngày hoặc nhiều hơn cho mỗi 1 L của môi trường là có thể thích hợp.

Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế tạo ra PGA có trọng lượng phân tử cao dưới điều kiện của 0 đến nhỏ hơn 10% (khối lượng/thể tích) trong nồng độ muối. Ngoài ra, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có thể sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao tương đương thêm vào cũng dưới điều kiện là 10% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn trong nồng độ muối.

Trọng lượng phân tử của PGA, được sản xuất bởi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế được cấy dưới điều kiện trong đó nồng độ của natri clorua là 10% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn, tốt hơn là 300.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 500.000 hoặc lớn hơn, còn tốt hơn nữa là 1.000.000 hoặc lớn hơn, còn tốt hơn nữa là 2.000.000 hoặc lớn hơn, còn tốt hơn nữa là 5.000.000 hoặc lớn hơn, và còn tốt hơn nữa là 10.000.000 hoặc lớn hơn. Giới hạn trên của chúng là 50.000.000, tốt hơn là 40.000.000, và tốt hơn nữa là 35.000.000.

PGA được sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng trong các ứng dụng khác nhau như các mỹ phẩm, dược phẩm, thực phẩm, tác nhân tinh chế nước, vật liệu giữ nước và tác nhân làm đầy.

Cụ thể là, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế được phân loại trong vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto. Sau đó, PGA được sản xuất bởi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có trọng lượng phân tử cao hơn khi so sánh với PGA được sản xuất bởi các vi sinh vật khác. Do đó, PGA được sản xuất bởi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có thể tốt hơn

là được sử dụng trong các ứng dụng như các mỹ phẩm, dược phẩm và thực phẩm có hoạt tính kháng khối u hoặc hoạt tính điều chỉnh chuyển hóa lipid.

Đề cập đến các phương án được biểu hiện ở trên, sáng chế cũng bộc lộ các phương pháp, và vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*, được biểu hiện dưới đây.

(1) Phương pháp sản xuất PGA, trong đó phương pháp này bao gồm bước cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được xác định theo số truy cập: NITE BP-02276, số truy cập: NITE BP-02277, số truy cập: NITE BP-02278, số truy cập: NITE BP-02279, số truy cập: NITE BP-02280, hoặc số truy cập: NITE BP-02281.

(2) Phương pháp được biểu hiện theo mục (1) nêu trên, trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có tính kháng với nồng độ muối cao và có thể tăng trưởng trong môi trường LB trong đó nồng độ của natri clorua được điều chỉnh đến 12% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 2,05 M, nhiệt độ phòng) hoặc cao hơn, tốt hơn là 12% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn và 16 đến 17% (khối lượng/thể tích) hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 12% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn và 15% (khối lượng/thể tích) hoặc thấp hơn, và; trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có khả năng sản xuất PGA có trọng lượng phân tử trung bình khối là 300.000 hoặc lớn hơn, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy dưới điều kiện là 10% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 1,71 M, nhiệt độ phòng) theo nồng độ của natri clorua.

(3) Phương pháp được biểu hiện theo mục (1) hoặc (2) nêu trên, trong đó khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy dưới điều kiện là 10% (khối lượng/thể tích) theo nồng độ của natri clorua, trọng lượng phân tử trung bình khối của PGA được sản xuất được tạo ra là 300.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn là 500.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1.000.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 2.000.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 5.000.000 hoặc lớn hơn, và còn tốt hơn nữa là 10.000.000 hoặc lớn hơn, và tốt hơn là 50.000.000 hoặc nhỏ hơn.

(4) Phương pháp được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (1) đến (3) nêu trên, trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy dưới điều kiện là 10% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn theo nồng độ của natri clorua, PGA được sản xuất theo sản lượng là 0,1 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 0,5 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 1,0 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn nữa là 5,0 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn.

(5) Phương pháp được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (1) đến (4) nêu trên, trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có gen 16S rARN tương đồng với trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7 hoặc 8, trình tự nucleotit có tốt hơn là 99,75% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 99,85% hoặc cao hơn, hoặc còn tốt hơn nữa là 99,90% hoặc cao hơn tương đồng với trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7 hoặc 8, hoặc trình tự nucleotit trong đó tốt hơn là 1 đến 3 nucleotit, hoặc tốt hơn là 1 nucleotit được xóa bỏ, được thay thế, được chèn và/hoặc được bổ sung cho trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7 hoặc 8.

(6) Phương pháp được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (1) đến (5) nêu trên, trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* biểu hiện các đặc tính vi sinh vật học được thể hiện ở Bảng 1.

(7) Phương pháp được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (1) đến (6) nêu trên, trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy trong môi trường chứa ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, glucoza, fructoza, maltoza, sucroza, xyloza, mannoza, galactoza, tinh bột, axit xitric hoặc muối của chúng, axit axetic hoặc muối của chúng, và axit glutamic hoặc muối của chúng, tốt hơn là ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, glucoza, maltoza, và axit glutamic hoặc muối của chúng, như các nguồn cacbon.

(8) Phương pháp được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên (1) đến (7), trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy trong môi trường chứa axit glutamic hoặc muối của chúng.

(9) Phương pháp được biểu hiện theo mục (8) nêu trên, trong đó nồng độ của axit glutamic hoặc muối của chúng là 0,005 g/L hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 0,05 g/L hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 0,1 g/L hoặc nhiều hơn, và còn tốt hơn nữa là 0,5 g/L hoặc nhiều hơn, và 600 g/L hoặc ít hơn, tốt hơn là 500 g/L hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 400 g/L hoặc ít hơn, và còn tốt hơn nữa là 300 g/L hoặc ít hơn.

(10) Phương pháp được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (1) đến (7) nêu trên, trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy với sự có mặt của axit glutamic.

(11) Phương pháp được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (1) đến (10) nêu trên, trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy trong môi trường chứa ít nhất một loại muối được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, kali clorua, canxi clorua, ma-giê clorua, canxi cacbonat, ma-giê cacbonat, canxi sulfat, và ma-giê sulfat, tốt hơn là ít nhất một loại muối được lựa chọn từ natri clorua, kali clorua, canxi clorua, và ma-giê clorua.

(12) Phương pháp được biểu hiện theo mục (11), trong đó nồng độ của muối trong môi trường là 0,01 M hoặc lớn hơn và 2,5 M hoặc nhỏ hơn.

(13) Phương pháp được biểu hiện theo mục (11) hoặc (12), trong đó muối là muối kim loại có hóa trị một, và nồng độ của muối trong môi trường là 0,1 M hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,5 M hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 1,0 M hoặc lớn hơn, và tốt hơn là 2,0 M hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là 1,75 M hoặc nhỏ hơn.

(14) Phương pháp được biểu hiện theo mục (11) hoặc (12), trong đó muối là muối kim loại có hóa trị hai, và nồng độ của muối trong môi trường là 0,1 M

hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,5 M hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 1,0 M hoặc lớn hơn, và tốt hơn là 2,0 M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 1,75 M hoặc nhỏ hơn, và còn tốt hơn nữa là 1,5 M hoặc nhỏ hơn.

(15) Phương pháp được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (1) đến (14) nêu trên, trong đó thời gian cấy của vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* là 0,5 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 1 ngày hoặc nhiều hơn, hoặc nhiều hơn tốt hơn là 3 ngày hoặc nhiều hơn.

(16) Phương pháp được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (1) đến (15) nêu trên, trong đó PGA được sản xuất theo sản lượng là 0,1 g/3 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 0,5 g/3 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 1,0 g/3 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 5,0 g/3 ngày hoặc nhiều hơn, cho mỗi 1 L của môi trường, bằng cách cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*.

(17) Phương pháp được biểu hiện theo mục (16), trong đó trọng lượng phân tử trung bình khối của PGA được sản xuất là 300.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn là 500.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1.000.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 2.000.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 5.000.000 hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 10.000.000 hoặc lớn hơn, và 50.000.000 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 40.000.000 hoặc nhỏ hơn, và 35.000.000 hoặc nhỏ hơn.

(18) Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được xác định theo số truy cập: NITE BP-02276, số truy cập: NITE BP-02277, số truy cập: NITE BP-02278, số truy cập: NITE BP-02279, số truy cập: NITE BP-02280, hoặc số truy cập: NITE BP-02281.

(19) Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được nêu trong mục (18), trong đó vi khuẩn này có thể tăng trưởng trong môi trường LB trong đó nồng độ của natri clorua được điều chỉnh đến 12% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn, tốt hơn là 12% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn và 17% (khối lượng/thể tích) hoặc thấp hơn, hoặc cao hơn tốt hơn là 12% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn và 15%

(khối lượng/thể tích) hoặc thấp hơn, và; có khả năng sản xuất PGA có trọng lượng phân tử trung bình khối là 300.000 hoặc lớn hơn, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy dưới điều kiện là 10% (khối lượng/thể tích) theo nồng độ của natri clorua.

(20) Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được nêu trong mục (18) hoặc (19), tạo ra PGA có trọng lượng phân tử trung bình khối là 300.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn là 500.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1.000.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 2.000.000 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 5.000.000 hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 10.000.000 hoặc lớn hơn, và tốt hơn là 50.000.000 hoặc nhỏ hơn, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy dưới điều kiện là 10% (khối lượng/thể tích) theo nồng độ của natri clorua.

(21) Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được nêu trong mục bất kỳ trong số các mục (18) đến (20) nêu trên, trong đó vi khuẩn này tạo ra PGA theo sản lượng là 0,1 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 0,5 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 1,0 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 5,0 g/L/3 ngày hoặc nhiều hơn, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy dưới điều kiện là 10% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn theo nồng độ của natri clorua.

(22) Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (18) đến (21) nêu trên, mà có gen 16S rARN tương đồng với trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7 hoặc 8, trình tự nucleotit có tốt hơn là 99,75% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 99,85% hoặc cao hơn, hoặc còn tốt hơn nữa là 99,90% hoặc cao hơn tương đồng với trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7 hoặc 8, hoặc trình tự nucleotit trong đó tốt hơn là 1 đến 3 nucleotit, hoặc tốt hơn là 1 nucleotit được xóa bỏ, được thay thế, được chèn và/hoặc được bổ sung cho trình tự nucleotit được đưa ra trong SEQ ID NO: 7 hoặc 8.

(23) Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (18) đến (22) nêu trên, biểu hiện các đặc tính vi sinh vật học được thể hiện ở Bảng 1.

(24) Phương pháp điều chỉnh trọng lượng phân tử của PGA, trong đó PGA được sản xuất bởi phương pháp được biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục (1) đến (17) nêu trên đến trọng lượng phân tử thấp, để thu được axit poly-gama-glutamic có trọng lượng phân tử mong muốn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được thể hiện chi tiết hơn cùng với sự tham khảo các ví dụ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Hơn nữa, chất phản ứng có sẵn thông thường có thể được sử dụng cho chất phản ứng trong đó nhà sản xuất không được biểu hiện.

Ở đây, các trình tự nucleotit của các môi được sử dụng trong các ví dụ được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2

Môi	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO
27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1
1525r	5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'	2
rE1L	5'-GTAGGAGTCTGGACCGTGT-3'	3
f2L(-)	5'-CCAGCAGCCGCGGTAATA-3'	4
926f	5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG-3'	5
r2L'	5'-GACTACCAGGGTATCTAATC-3'	6

Ví dụ thử nghiệm 1: Phương pháp để thu được các vi sinh vật tạo thành bào tử

Trong 15 mL ống hình nón (mã sản phẩm 352096, được sản xuất bởi BD (Becton, Dickinson and Company) Falcon), khoảng 5 g mẫu thực phẩm của dưa chua, đậu hũ, gia vị lên men, natto hoặc tương tự có sẵn trên thị trường được gom vô trùng, và 1% (khối lượng/thể tích) dung dịch natri clorua có nước (được

khử trùng) gấp hai lần khối lượng được bổ sung này cho mẫu này. Nguyên liệu tạo thành được nén ngược với bề mặt rung của Máy trộn tiếp xúc (loại MT-31, được sản xuất bởi Yamato Scientific Co., Ltd.), và được treo để được trộn đều, và mẫu tạo thành được cung cấp đối với xử lý nhiệt ở 80°C trong 10 phút. Sau đó, các mẫu này được pha loãng thích hợp từng bước với 1% (khối lượng/thể tích) dung dịch natri clorua có nước (được khử trùng), và từng mẫu này được rải trên môi trường để dò vi sinh vật (môi trường thạch LB), môi trường thạch LB được điều chỉnh đến 10% theo nồng độ cuối cùng của natri clorua (môi trường LB + 10% NaCl), môi trường thạch GAM, được sửa đổi (tên thương mại: “Nissui”, được sản xuất bởi Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), hoặc môi trường thạch M+Yex như được thể hiện ở các Bảng 3 đến 6.

Môi trường thạch này được cung cấp để cấy tĩnh ở 30°C trong 2 đến 5 ngày, và sau đó sự tăng trưởng và dạng của các vi sinh vật trên môi trường thạch được quan sát. Sau đó, số đông các khuẩn lạc đơn mà được nổi lên trên từng môi trường thạch được lựa chọn, và các khuẩn lạc được lựa chọn được cấy ria trên môi trường thạch cùng loại trong đó sự tăng trưởng được xác nhận, và khuẩn lạc đơn được nổi lên được lấy làm như một chủng tinh khiết. Hơn nữa, chủng tinh khiết này được trưởng thành trong loại môi trường giống như của môi trường thạch, và do đó đã thu được tế bào vi khuẩn tạo dịch huyền phù trong môi trường lỏng LB chứa 20% (khối lượng/thể tích) của glyxerol, và nguyên liệu tạo thành được bảo quản lạnh ở -80°C.

Bảng 3

Môi trường Luria-Bertani (LB)	% (khối lượng/thể tích)
Bacto tryptone (Becton, and Dickinson Company)	1,00
Chất chiết nấm men (Becton, and Dickinson Company)	0,50
Natri clorua (Wako Pure Chemical Corporation)	1,00
A-ga (Wako Pure Chemical Corporation)	1,50

Bảng 4

Môi trường Luria-Bertani (LB) + 10% NaCl	% (khối lượng/thể tích)
Bacto tryptone (Becton, and Dickinson Company)	1,00
Chất chiết nấm men (Becton, and Dickinson Company)	0,50
Natri clorua (Wako Pure Chemical Corporation)	10,0
Aga (Wako Pure Chemical Corporation)	1,50

Bảng 5

Môi trường thạch GAM, được sửa đổi	% (khối lượng/thể tích)
Môi trường gốc bột hỗn hợp nguyên liệu (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.)	5,67

Bảng 6

Môi trường thạch M+Yex	% (khối lượng/thể tích)
Amôni sulfat	1,00
Chất chiết nấm men (Becton, and Dickinson Company)	0,05
Glucosa	1,00
Ma-giê Sulfat Heptahydrat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,05
Mangan Sulfat Pentahydrat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,003
Dikali Hydrophosphat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,10
Dinatri hydro phosphat, dodecahydrat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,10
Aga (Wako Pure Chemical Corporation)	1,50

Ví dụ thử nghiệm 2: Phương pháp chọn lựa vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*
(1)

Giống (được bảo quản lạnh mẫu ở -80°C) thu được trong ví dụ thử nghiệm 1 được cấy rìa trên môi trường thạch LB bằng que cấy vô trùng (mã sản phẩm 254410, được sản xuất bởi Nunc Inc.). Nguyên liệu tạo thành được cung cấp để cấy tĩnh ở 30°C trong 1 ngày, và sự tăng trưởng của từng giống được xác nhận về bên ngoài.

Tiếp theo, từng giống được trưởng thành trên môi trường thạch LB được cấy cho môi trường thạch M+Yex bằng tấm được khử trùng trước, và nguyên liệu tạo thành được cung cấp để cấy tĩnh ở 30°C trong 1 ngày, và sự tăng trưởng của từng giống được xác nhận về bên ngoài.

Sau đó, các giống được trưởng thành trên môi trường thạch M+Yex được cấy cho tấm thử nghiệm hữu ích M/Glucoza được thể hiện ở Bảng 7 và tấm thử nghiệm hữu ích M/Tagatoza được thể hiện ở Bảng 8, tương ứng, và các nguyên liệu tạo thành được cung cấp để cấy tĩnh ở 37°C trong 1 đến 3 ngày.

Trong ví dụ thử nghiệm này, sự tăng trưởng trên tấm thử nghiệm hữu ích được quan sát về bên ngoài, và một giống trong đó dạng khuẩn lạc là chất chỉ thị của sự tăng trưởng được quan sát trong tấm thử nghiệm hữu ích M/Glucoza, và không được quan sát thấy trên tấm thử nghiệm hữu ích M/Tagatoza được lựa chọn như một giống ứng cử vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*.

Bảng 7

Tấm thử nghiệm hữu ích M/Glucoza	% (khối lượng/thể tích)
Amôni sulfat	1,00
D-Glucoza	1,00
Ma-giê Sulfat Heptahydrat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,05

Tấm thử nghiệm hữu ích M/Glucoza	% (khối lượng/thể tích)
Mangan Sulfat Pentahydrat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,003
Dikali Hydrophosphat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,10
Dinatri hydro phosphat, dodecahydrat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,10
A-ga (Wako Pure Chemical Corporation)	1,50

Bảng 8

Tấm thử nghiệm hữu ích M/Tagatoza	% (khối lượng/thể tích)
Amôni sulfat	1,00
D-Tagatoza	1,00
Ma-giê Sulfat Heptahydrat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,05
Mangan Sulfat Pentahydrat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,003
Dikali Hydrophosphat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,10
Dinatri hydro phosphat, dodecahydrat (Wako Pure Chemical Corporation)	0,10
A-ga (Wako Pure Chemical Corporation)	1,50

Ví dụ thử nghiệm 3: Phương pháp chọn lựa vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* (2)

Các mẫu bảo quản - glyxerol được điều chế trong ví dụ thử nghiệm 1 được pha loãng 30 lần với dung dịch đệm 1 mM TE (pH 8,0), mà được sử dụng như một mẫu, và PCR được thực hiện sử dụng mồi 27f và mồi 1525r được thể hiện ở Bảng 2 để khuếch đại mảnh ADN nằm trong khoảng từ 1,5 kb trong vùng gen 16S rARN. Đối với ADN polymeraza, TaKaRa LA Taq (được sản xuất bởi

TaKaRa Bio) được sử dụng. Sau khi làm biến tính mẫu ADN ở 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ của 95°C trong 1 phút, 55°C trong 30 giây, và 72°C trong 2 phút được thực hiện, tiếp theo bằng cách nung nóng ở 72°C trong 2 phút.

Trình tự nucleotit ADN là 550 bp trên mảnh ADN đã thu được nằm trong khoảng từ 1,5 kb trong vùng gen 16S rARN được xác định bằng cách sử dụng mỗi 27f được thể hiện ở Bảng 2.

Mẫu cho sự phân tích sắp xếp thứ tự để điều chế bằng bộ dụng cụ Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (được sản xuất bởi Applied Biosystems), theo giao thức kèm theo. Đối với sự tinh chế mẫu trước khi phân tích, bộ dụng cụ Montage SEQ (được sản xuất bởi MILLIPORE) được sử dụng. Sau đó, sự phân tích trình tự của các mẫu trình tự được điều chế được thực hiện bằng cách sử dụng bộ sắp xếp trình tự ADN (tên thương mại: ABI 3100 Genetic Analyzer, được sản xuất bởi Applied Biosystems), và trình tự nucleotit được xác định.

Đối với sự tìm kiếm tương đồng trình tự, “BLAST cơ bản” trong “BLAST” trong nhãn chọn “Nucleotit” của cơ sở dữ liệu công khai NCBI (Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia, <http://www.ncbi.nlm.gov/>) được sử dụng, và “nucleotit mầm” được lựa chọn từ chương trình BLAST. Sự tìm kiếm tương đồng được thực hiện bằng cách định rõ “Các trình tự bộ gen tham khảo (refseq_genomics)” như cơ sở dữ liệu đối tượng tìm kiếm, và “Các trình tự tương đồng cao (megablast)” như một chương trình chọn lựa.

Từ các kết quả đã thu được, giống mà được xác định như vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* là giống có tính tương đồng cao nhất trong ví dụ thử nghiệm này, và có 98,9% hoặc cao hơn tương đồng với trình tự giữa 550 bp trong đó trình tự được biểu hiện nêu trên được xác định và giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* (giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* DSM 10) tương đương thêm vào được lựa chọn như một giống ứng cử vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*.

Ví dụ thử nghiệm 4: Phương pháp chọn lựa vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* tạo ra PGA dưới điều kiện mà không bổ sung axit glutamic

Tế bào vi khuẩn được bảo quản lạnh được gom từ các mẫu được bảo quản lạnh mà được thừa nhận như vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 3 bằng cách sử dụng que cấy vô trùng (mã sản phẩm 254410, được sản xuất bởi Nunc Inc.), và tế bào được cấy trong 5 mL của môi trường lỏng LB, và nguyên liệu tạo thành được cung cấp để cấy lắc ở 30°C trong 24 giờ. Nguyên liệu tạo thành được lấy làm môi trường nuôi giống, và 1% (thể tích/thể tích) của chúng được cấy trong 30 mL của môi trường để sản xuất PGA mà không bổ sung axit glutamic [thành phần môi trường: 7,5% glucoza, 1,8% amôni clorua, 0,5% chất chiết nấm men, 0,035% ma-giê sulfat heptahydrat, 0,005% mangan sulfat tetrahydrat đến pentahydrat, 100 mM là axit 3-morpholinopropanesulfonic (được điều chỉnh đến pH 7,0 với kali hydroxit, được sản xuất bởi Dojin Chemical Laboratory)], và môi trường này được cung cấp để cấy lắc ở 37°C trong 72 giờ.

Sau khi hoàn thành việc cấy, trọng lượng phân tử PGA được bao gồm trong dịch huyền phù nuôi cấy được xác định theo phương pháp được thể hiện ở ví dụ đo 1 được biểu hiện dưới đây. Kết quả là, giống trong đó một phần nhỏ nước giải hấp của nguyên liệu polyme có sự hấp thụ của UV 210 nm được gây ra từ PGA được tìm thấy trong dịch huyền phù nuôi cấy được lựa chọn như một giống ứng cử vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* mà có thể để sản xuất PGA dưới điều kiện mà không bổ sung axit glutamic.

Ví dụ thử nghiệm 5: Phương pháp chọn lựa vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có tính kháng với nồng độ muối cao (1)

Các mẫu được bảo quản lạnh của các giống mà được thừa nhận như vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 3, và hơn nữa được lựa chọn như sự sản xuất PGA giống ứng cử vi khuẩn hình que *Bacillus*

subtilis trong ví dụ thử nghiệm 4, và các mẫu được bảo quản lạnh của các giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto đã biết công khai (giống NBRC 16449, giống NBRC 3336 và giống NBRC 3936) mà đã thu được từ Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản, và được điều chế theo quy trình giống như ở ví dụ thử nghiệm 1 từng mẫu được cấy cho môi trường lỏng LB+10% NaCl để là 1×10^3 đến 1×10^4 tế bào/mL, và các nguyên liệu tạo thành được cung cấp để cấy lắc ở 37°C trong 24 giờ. Sau khi cấy lắc, mẫu dịch môi trường nuôi cấy được pha loãng thích hợp với 1% (khối lượng/thể tích) dung dịch natri clorua có nước, và độ hấp thụ là 600 nm (OD600) của môi trường cấy lỏng, đóng vai trò như một chất chỉ thị của sự tăng trưởng, được đo bằng cách sử dụng máy đo ảnh phổ (loại U-2900, được sản xuất bởi Hitachi High-Technologies Corporation).

Kết quả là, không có sự tăng về độ hấp thụ được quan sát trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto. Dưới điều kiện thử nghiệm này, sáu giống trong đó sự tăng về độ hấp thụ được quan sát được lựa chọn như các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có tính kháng với nồng độ muối cao, và có khả năng sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao dưới các điều kiện nồng độ muối cao.

Ví dụ thử nghiệm 6: Phương pháp thử nghiệm đánh giá đối với nồng độ muối giới hạn tăng trưởng đối với giống ứng cử vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*

Môi trường nuôi giống được điều chế bằng cách cấy giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto NBRC 3336 như một giống chuẩn và giống ứng cử vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* bằng cách sử dụng môi trường lỏng LB dưới điều kiện giống với ví dụ thử nghiệm 4.

Tiếp theo, môi trường LB trong đó nồng độ cuối cùng của natri clorua được điều chỉnh là 10% (khối lượng/thể tích), 12% (khối lượng/thể tích), 13% (khối lượng/thể tích), 14% (khối lượng/thể tích), 15% (khối lượng/thể tích) hoặc 16%

(khối lượng/thể tích) được điều chế, và môi trường nuôi giống được biểu hiện ở trên được cấy thêm vào để đạt 0,05 trong độ hấp thụ ban đầu, và nguyên liệu tạo thành được cung cấp để cấy lắ ở 37°C trong 2 ngày. Trong quá trình cấy lắ này, dịch môi trường nuôi cấy được gom tạm thời, mẫu dịch môi trường nuôi cấy được pha loãng thích hợp với dung dịch natri clorua có nước (dung dịch natri clorua có nước có nồng độ giống như trong môi trường được sử dụng), sau đó độ hấp thụ là 600 nm (OD600) của môi trường cấy lỏng, đóng vai trò như một chất chỉ thị của sự tăng trưởng, được đo bằng cách sử dụng máy đo ảnh phổ (loại U-2900, được sản xuất bởi Hitachi High-Technologies Corporation).

Ví dụ thử nghiệm 7: Thử nghiệm xác nhận về nồng độ muối giới hạn tăng trưởng đối với được lựa chọn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*

Môi trường nuôi giống được điều chế bằng cách cấy giống ừng cử vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có tính kháng với nồng độ muối cao bằng cách sử dụng môi trường lỏng LB + 10% NaCl dưới điều kiện giống với ví dụ thử nghiệm 5.

Tiếp theo, môi trường nuôi giống được biểu hiện ở trên được cấy vào môi trường TSB (Trypticase Soy broth, được sản xuất bởi Becton, and Dickinson Company) trong đó nồng độ cuối cùng của natri clorua được điều chỉnh đến 10% (khối lượng/thể tích), 12% (khối lượng/thể tích), 14% (khối lượng/thể tích), 15% (khối lượng/thể tích), 16% (khối lượng/thể tích), 17% (khối lượng/thể tích), 18% (khối lượng/thể tích), 19% (khối lượng/thể tích) hoặc 20% (khối lượng/thể tích) để đạt 0,1 trong độ hấp thụ ban đầu, và nguyên liệu tạo thành được cung cấp để cấy lắ ở 37°C trong 2 ngày. Việc cấy lắ được thực hiện, và sau đó canh trường cấy mẫu được gom vào ngày thứ hai để từ khi bắt đầu cấy và được pha loãng thích hợp với 10% (khối lượng/thể tích) dung dịch natri clorua có nước, và độ hấp thụ là 600 nm (OD600) của môi trường cấy, đóng vai trò như một chất

chỉ thị của sự tăng trưởng, được đo bằng cách sử dụng máy đo ảnh phổ (loại U-2900, được sản xuất bởi Hitachi High-Technologies Corporation).

Trong ví dụ thử nghiệm này, nồng độ muối trong đó độ hấp thụ của dịch môi trường nuôi cấy được cấy ở ngày thứ hai ít nhất cao gấp hai lần so với độ hấp thụ của môi trường nuôi giống ban đầu được xác định là nồng độ giới hạn tăng trưởng đối với giống.

Ví dụ thử nghiệm 8: Thử nghiệm xác nhận về nồng độ muối tăng trưởng tối ưu đối với vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được lựa chọn

Môi trường nuôi giống được điều chế bằng cách cấy giống ứng cử vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có tính kháng với nồng độ muối cao bằng cách sử dụng môi trường lỏng LB + 10% NaCl dưới điều kiện giống với ví dụ thử nghiệm 5.

Tiếp theo, môi trường TSB trong đó không có natri clorua được bổ sung thêm vào hoặc nồng độ cuối cùng của natri clorua được điều chỉnh đến 1% (khối lượng/thể tích), 2% (khối lượng/thể tích), 3% (khối lượng/thể tích), 4% (khối lượng/thể tích), 5% (khối lượng/thể tích), 6% (khối lượng/thể tích), 7% (khối lượng/thể tích), 8% (khối lượng/thể tích) hoặc 10% (khối lượng/thể tích) được điều chế, và từng nguyên liệu tạo thành được phân phối lên đĩa cấy 96 giếng tròn (số kiểu: 3870-096, được sản xuất bởi IWAKI) với thể tích 200 μ L cho từng giếng. Môi trường nuôi giống được biểu hiện ở trên được cấy thêm vào để đạt 0,05 trong độ hấp thụ ban đầu trong từng giếng, và nguyên liệu tạo thành được cung cấp để cấy lắc ở 37°C trong 24 giờ bằng cách sử dụng đầu đọc Bio Microplate (loại HiTS-S2, được sản xuất bởi Scinics Corporation).

Trong đầu đọc Bio Microplate, nguyên liệu tạo thành được lắc ở 150 vòng/phút, và độ hấp thụ là 600 nm (OD600) được đo qua thời gian ở khoảng thời gian là 30 phút bằng máy lọc giao thoa. Tỷ lệ tế bào tăng trưởng vi khuẩn tối đa trong suốt thử nghiệm cấy được xác định bằng cách tính sự tăng về độ hấp

thụ cho từng đơn vị thời gian từ giá trị của độ hấp thụ do đó đã thu được, và lấy tỷ lệ này làm tỷ lệ tế bào tăng trưởng vi khuẩn (ΔOD_{600} /giờ).

Trong ví dụ thử nghiệm này, nồng độ muối từ giá trị tối đa (giá trị tối đa trừ 0,2) theo tỷ lệ tế bào tăng trưởng vi khuẩn (ΔOD_{600} /giờ) được xác định là nồng độ muối tăng trưởng tối ưu.

Ví dụ 1: Các đặc trưng của vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được lựa chọn

Các đặc trưng tăng trưởng của các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* (giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA610, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA631, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB406, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB425, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB540, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB553) thu được bằng các phương pháp được thể hiện ở các ví dụ thử nghiệm 1 đến 8, và có tính kháng với nồng độ muối cao và việc sản xuất PGA được thể hiện ở các Bảng 9 đến 13.

Bảng 9

Số giống	Khả năng tăng trưởng (OD_{600})	Chú ý
NBRC 16449 (giống chuẩn vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i> var.natto)	0,00	Ví dụ so sánh
NBRC 3336 (giống chuẩn vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i> var.natto)	0,00	Ví dụ so sánh
NBRC 3936 (giống chuẩn vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i> var.natto)	0,00	Ví dụ so sánh
KSM-FFA610 (giống vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>)	3,32	Sáng chế hiện tại
KSM-FFA631 (giống vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>)	2,44	Sáng chế hiện tại

Số giống	Khả năng tăng trưởng (OD600)	Chú ý
KSM-FFB406 (giống vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>)	0,78	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB425 (giống vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>)	3,09	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB540 (giống vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>)	2,76	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB553 (giống vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>)	2,95	Sáng chế hiện tại

Bảng 9 thể hiện các kết quả của ví dụ thử nghiệm 5.

Như được thể hiện ở Bảng 9, khi giống được cấy trong môi trường lỏng LB chứa natri clorua ở nồng độ cao, độ hấp thụ là bằng hoặc thấp hơn giới hạn dò trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto được sử dụng như một đối chứng và không quan sát được sự tăng trưởng. Ngược lại, trong các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được lựa chọn trong các ví dụ thử nghiệm 2 đến 4, các giống có độ hấp thụ (OD600) vượt quá 0,5 (tương đương với 1×10^7 tế bào/mL) được tìm thấy dưới điều kiện thử nghiệm được thể hiện trong ví dụ thử nghiệm 5.

Từ các kết quả được biểu hiện ở trên, được xác nhận rằng giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế là giống có tính kháng với nồng độ muối cao mà có thể tăng trưởng ở nồng độ muối trong đó sự tăng trưởng là không thể tạo thành trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto.

Bảng 10: Sự so sánh về mức độ tăng trưởng được cấy trong 1 ngày (24 giờ)

Số giống	Nồng độ NaCl (%)						Chú ý
	10	12	13	14	15	16	
NBRC 3336	0,47	0,04	0,01	0,02	0,04	0,05	Ví dụ so sánh
KSM-FFA610	2,52	3,43	2,61	0,33	0,04	0,05	Sáng chế hiện tại

Số giống	Nồng độ NaCl (%)						Chú ý
	10	12	13	14	15	16	
KSM-FFA631	3,17	3,66	2,26	0,12	0,17	0,05	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB406	3,23	3,34	1,82	0,37	0,04	0,04	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB425	3,03	3,37	0,56	0,26	0,03	0,04	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB540	2,95	3,54	0,69	0,21	0,03	0,04	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB553	2,83	3,47	1,07	0,23	0,03	0,04	Sáng chế hiện tại

Bảng 11 Sự so sánh về mức độ tăng trưởng được cấy trong hai ngày (48 giờ)

Số giống	Nồng độ NaCl (%)						Chú ý
	10	12	13	14	15	16	
NBRC 3336	1,37	0,15	0,00	0,00	0,12	0,09	Ví dụ so sánh
KSM-FFA610	1,07	1,97	2,14	3,82	1,00	0,08	Sáng chế hiện tại
KSM-FFA631	1,36	1,97	1,95	2,44	0,18	0,09	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB406	1,45	2,21	2,34	1,94	0,20	0,06	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB425	1,38	2,06	2,03	0,97	0,30	0,08	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB540	1,32	2,03	1,95	1,17	0,23	0,07	Sáng chế hiện tại
KSM-FFB553	1,37	2,01	1,90	2,54	0,22	0,06	Sáng chế hiện tại

Các Bảng 10 và 11 thể hiện các kết quả của ví dụ thử nghiệm 6.

Như được thể hiện ở Bảng 10, trong khi độ hấp thụ là khoảng 0,5 trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto (giống NBRC 3336) được sử dụng như một đối chứng dưới điều kiện của nồng độ cuối cùng của natri clorua là 10% (khối lượng/thể tích) vào ngày cấy thứ nhất, tất cả trong số các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế đã thể hiện giá trị vượt quá 2,0 trong độ hấp thụ.

Hơn nữa, dưới điều kiện của nồng độ cuối cùng của natri clorua là 13% (khối lượng/thể tích), trong khi sự tăng trưởng của các tế bào vi khuẩn không được quan sát trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto được sử dụng như một đối chứng, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế đã thể hiện giá trị vượt quá 0,5 trong độ hấp thụ.

Từ các kết quả được biểu hiện ở trên, được xác nhận rằng giống ứng cử vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế là giống có tính kháng nồng độ muối cao hơn giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto.

Như được thể hiện ở Bảng 11, trong khi sự tăng trưởng của các tế bào vi khuẩn không được quan sát trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto được sử dụng như đối chứng, dưới điều kiện của nồng độ cuối cùng của natri clorua là 13% (khối lượng/thể tích) vào ngày cấy thứ hai, tất cả trong số các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế thể hiện giá trị vượt quá 1,5 trong độ hấp thụ.

Hơn thế nữa, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế thể hiện giá trị vượt quá 0,5 trong độ hấp thụ, dưới điều kiện của nồng độ cuối cùng của natri clorua là 14% (khối lượng/thể tích).

Từ các kết quả được biểu hiện ở trên, được xác nhận rằng giống ứng cử vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế là giống có tính kháng nồng độ muối cao hơn giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto.

Bảng 12 Mức độ tăng trưởng của các giống của vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được lựa chọn (ngày cấy thứ hai)

Số giống	Nồng độ NaCl (%)								
	10	12	14	15	16	17	18	19	20
KSM-FFA610	1,33	1,06	2,94	1,55	0,35	0,58	0,32	0,06	0,04
KSM-FFA631	2,88	2,30	2,15	0,85	0,35	0,10	0,04	0,04	0,03

Số giống	Nồng độ NaCl (%)								
	10	12	14	15	16	17	18	19	20
KSM-FFB406	1,80	2,47	1,58	0,83	0,32	0,12	0,09	0,08	0,08
KSM-FFB425	2,33	1,32	2,51	1,13	0,56	0,30	0,11	0,06	0,06
KSM-FFB540	1,99	1,28	2,54	1,11	0,58	0,37	0,18	0,09	0,09
KSM-FFB553	1,87	1,02	2,64	1,43	0,56	0,38	0,15	0,10	0,10

Bảng 12 thể hiện các kết quả của ví dụ thử nghiệm 7.

Như được thể hiện ở Bảng 12, trong thử nghiệm tăng trưởng ở nồng độ muối cao sử dụng môi trường TSB, trong giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế, độ hấp thụ vào ngày cấy thứ hai có giá trị lớn gấp hai lần hoặc cao hơn giá trị trong khi nuôi giống dưới các điều kiện là 16% (khối lượng/thể tích), theo nồng độ cuối cùng của natri clorua, đối với giống KSM-FFA631 và giống KSM-FFB406, 17% (khối lượng/thể tích) đối với giống KSM-FFB425, giống KSM-FFB540 và giống KSM-FFB553, và 18% (khối lượng/thể tích) đối với giống KSM-FFA610.

Từ các kết quả được biểu hiện ở trên, được xác nhận rằng giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có nồng độ giới hạn tăng trưởng đối với natri clorua là từ 16 đến 18% (khối lượng/thể tích), trong thử nghiệm xác nhận về nồng độ muối giới hạn tăng trưởng sử dụng môi trường TSB.

Bảng 13: Tỷ lệ tăng trưởng của các giống được lựa chọn của vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* (ΔOD_{600} /giờ)

Số giống	Nồng độ NaCl (%)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10
KSM-FFA610	0,35	0,41	0,43	0,45	0,45	0,39	0,31	0,29	0,25	0,19
KSM-FFA631	0,47	0,43	0,40	0,39	0,35	0,27	0,20	0,19	0,15	0,11

Số giống	Nồng độ NaCl (%)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10
KSM-FFB406	0,48	0,50	0,49	0,47	0,44	0,39	0,31	0,41	0,33	0,18
KSM-FFB425	0,49	0,47	0,46	0,43	0,40	0,32	0,30	0,24	0,49	0,39
KSM-FFB540	0,51	0,49	0,47	0,42	0,40	0,36	0,29	0,37	0,40	0,27
KSM-FFB553	0,50	0,48	0,48	0,47	0,43	0,36	0,31	0,27	0,26	0,24

Bảng 13 thể hiện các kết quả của ví dụ thử nghiệm 8.

Như được thể hiện ở Bảng 13, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có giá trị là 0,3 đến 0,5 theo tỷ lệ tế bào tăng trưởng vi khuẩn ($\Delta OD_{600}/\text{giờ}$) dưới các điều kiện bổ sung của sự tự bổ sung hoặc đến nồng độ natri clorua cuối cùng là 6% (khối lượng/thể tích) (nhiệt độ phòng) trong thử nghiệm về nồng độ muối tối ưu tăng trưởng sử dụng môi trường TSB.

Từ các kết quả được biểu hiện ở trên, được xác nhận rằng, trong thử nghiệm xác nhận về nồng độ muối tối ưu tăng trưởng đối với vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được lựa chọn sử dụng môi trường TSB liên quan đến giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế, nồng độ tối ưu tăng trưởng của natri clorua là 0 đến 5% (khối lượng/thể tích) trong giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA610, 0 đến 4% (khối lượng/thể tích) trong giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA631, 0 đến 5% (khối lượng/thể tích) trong giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB406, 0 đến 4% (khối lượng/thể tích) trong giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB425, 0 đến 5% (khối lượng/thể tích) trong giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB540, và 0 đến 5% (khối lượng/thể tích) trong giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB553.

Ví dụ 2: Sự nhận dạng về các loài vi khuẩn dựa vào các đặc tính vi sinh vật học, và sự phân tích về trình tự nucleotit là gen 16S rARN

Các đặc tính vi sinh vật học của các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được biểu hiện ở trên (giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA610, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA631, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB406, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB425, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB540, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB553) được kiểm tra chi tiết. Bảng 14 thể hiện các kết quả.

Hơn nữa, các loài vi khuẩn được nhận dạng trên các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được biểu hiện ở trên dựa vào sự phân tích về trình tự nucleotit của gen 16S rARN theo ví dụ đo 4 dưới đây. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 15.

Bảng 14

Dạng	Dạng roi
Đặc tính nhuộm vi khuẩn gram	+
Sự hình thành bào tử	+
Di động	+
Dạng khuẩn lạc (môi trường thạch LB)	Dạng tròn, màu kem, nhót
Thử nghiệm nhiệt độ tăng trưởng	37°C, tốt 45°C, tốt
Phản ứng Catalaza	+
Phản ứng Oxidaza	+
Sản xuất axit/khí từ Glucoza	-/-
Thử nghiệm O/F (sự oxy hóa/sự lên men)	-/-

Như được thể hiện ở Bảng 14, tất cả trong số các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được biểu hiện ở trên được xác nhận có các đặc tính vi sinh vật học của vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*.

Bảng 15

Giống	Chiều dài trình tự mã hóa (bp)	Độ tương đồng (%)	Các kết quả nhận dạng
KSM-FFA610	1.475	100	Vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>
KSM-FFA631	1.475	99,93	Vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>
KSM-FFB406	1.475	100	Vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>
KSM-FFB425	1.475	99,93	Vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>
KSM-FFB540	1.475	99,93	Vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>
KSM-FFB553	1.475	99,93	Vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i>

Như được thể hiện ở Bảng 15, kết quả của sự phân tích độ tương đồng dựa vào trình tự nucleotit của gen 16S rARN, rõ ràng rằng tất cả trong số các giống được biểu hiện ở trên có trình tự nucleotit của gen 16S rARN có độ tương đồng cao tới 99,9% hoặc cao hơn với giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* DSM 10.

Do đó, các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được biểu hiện ở trên được đánh giá là vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* từ các kết quả phân tích về trình tự nucleotit của gen 16S rARN kết hợp với các đặc tính vi sinh vật học.

Lưu ý rằng, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA610 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02276.

Ngoài ra, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFA631 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02277.

Ngoài ra, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB406 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá

và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02278.

Ngoài ra, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB425 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02279.

Ngoài ra, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB540 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02280.

Ngoài ra, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* KSM-FFB553 được nộp lưu với Ngân hàng lưu giữ giống vi sinh vật sáng chế NITE, Viện Đánh giá và Công nghệ Quốc gia Nhật Bản (địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 2 tháng 6 năm 2016, theo số truy cập là NITE BP-02281.

Ví dụ 3: Sự đánh giá năng suất PGA dưới điều kiện bổ sung muối ở nồng độ cao (1)

Năng suất PGA dưới các điều kiện nồng độ muối cao được đánh giá bằng cách sử dụng các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế (giống KSM-FFA610, giống KSM-FFA631, giống KSM-FFB406, giống KSM-FFB425, giống KSM-FFB540 và giống KSM-FFB553) bằng cách sử dụng các giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto đã biết công khai (giống NBRC 3336 và giống NBRC 16449) như các đối chứng.

Mẫu được bảo quản lạnh của giống được biểu hiện ở trên được thể hiện trong ví dụ thử nghiệm 1 và mẫu được bảo quản lạnh của giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto được điều chế theo các quy trình tương tự, và môi trường lỏng LB được sử dụng dưới điều kiện cấy giống với ví dụ thử nghiệm 4, và các nguyên liệu tạo thành được cung cấp để cấy lắc ở 30°C trong

24 giờ. Nguyên liệu tạo thành được sử dụng như môi trường nuôi giống, và 1% (thể tích/thể tích) của chúng được cấy trong 30 mL của môi trường đánh giá năng suất PGA [thành phần môi trường: 8,0% glucoza, 8,0% natri glutamat monohydrat, 1,25% chất chiết nấm men, 1,0% amôni sulfat, 0,2% ma-giê sulfat heptahydrat, 0,003% mangan sulfat tetrahydrat đến pentahydrat, 0,7% dikali hydro phosphat, 0,35% kali dihydro phosphat, và 7,3% (tương đương với 1,25 M) của natri clorua hoặc 10,2% (tương đương với 1,75 M) của natri clorua]. Môi trường này được cung cấp để cấy lắc ở 37°C trong 72 giờ.

Sau khi hoàn thành việc cấy, trọng lượng phân tử PGA được bao gồm trong dịch huyền phù nuôi cấy được xác định theo phương pháp được thể hiện trong ví dụ đo 1 được biểu hiện dưới đây. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 16.

Bảng 16

Giống	Nguồn gốc	NaCl 1,25M năng suất PGA (g/L)	NaCl 1,75M năng suất PGA (g/L)	Chú ý
NBRC 3336	giống chuẩn vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i> var.natto	2,7	Không có sự tăng trưởng	Ví dụ so sánh
NBRC 16449	giống chuẩn vi khuẩn hình que <i>Bacillus subtilis</i> var.natto	3,2	Không có sự tăng trưởng	Ví dụ so sánh
KSM- FFA610	Giống có nguồn gốc từ thực phẩm	32,7	3,6	Sáng chế hiện tại
KSM- FFA631	Giống có nguồn gốc từ thực phẩm	17,6	1,4	Sáng chế hiện tại
KSM- FFB406	Giống có nguồn gốc từ thực phẩm	31,5	0,7	Sáng chế hiện tại
KSM- FFB425	Giống có nguồn gốc từ thực phẩm	33,0	6,8	Sáng chế hiện tại
KSM- FFB540	Giống có nguồn gốc từ thực phẩm	44,1	9,6	Sáng chế hiện tại
KSM- FFB553	Giống có nguồn gốc từ thực phẩm	46,8	10,8	Sáng chế hiện tại

Như được thể hiện ở Bảng 16, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế được biểu hiện năng suất PGA tốt hơn năng suất của giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto ngay cả dưới điều kiện nồng độ muối cao. Hơn nữa, giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có thể sản xuất PGA ngay cả dưới điều kiện chứa natri clorua ở nồng độ cao này trong đó sự tăng trưởng là không thể được tạo thành trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto, và PGA không thể được sản xuất.

Từ các kết quả được biểu hiện ở trên, vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế được đánh giá là vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có tính kháng với nồng độ muối cao.

Ví dụ 4: Đánh giá năng suất PGA dưới điều kiện bổ sung muối ở nồng độ cao (2)

Năng suất PGA được đánh giá bằng cách sử dụng giống KSM-FFB553 là giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế dưới điều kiện của nồng độ cao của muối kim loại có hóa trị một.

Môi trường nuôi giống được điều chế theo cách giống với ví dụ thử nghiệm 4, và 1% (thể tích/thể tích) của chúng được cấy trong 30 mL của môi trường đánh giá năng suất PGA [thành phần môi trường: 8,0% glucoza, 8,0% natri glutamat monohydrat, 1,25% chất chiết nấm men, 1,0% amôni sulfat, 0,2% magiê sulfat heptahydrat, 0,003% mangan sulfat tetrahydrat đến pentahydrat, 0,7% dikali hydro phosphat, 0,35% kali dihydro phosphat, và 10,2% (tương đương với 1,75 M) của natri clorua hoặc 11,2% (tương đương với 1,5 M) của kali clorua]. Môi trường này được cung cấp để cấy lắc ở 37°C trong 72 giờ.

Sau khi hoàn thành việc cấy, trọng lượng phân tử PGA được bao gồm trong dịch huyền phù nuôi cấy được xác định theo phương pháp được thể hiện trong ví dụ đo 1 được biểu hiện dưới đây. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 17.

Bảng 17

Thành phần môi trường		KSM-FFB553
(Loại)	(Nồng độ)	Năng suất PGA (g/L)
NaCl	1,75M	10,1
KCl	1,5M	33,3

Như được thể hiện ở Bảng 17, được xác nhận rằng giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế biểu hiện năng suất PGA tuyệt vời ngay cả dưới điều kiện nồng độ cao của muối kim loại có hóa trị một.

Ví dụ 5: Đánh giá năng suất PGA dưới điều kiện bổ sung muối ở nồng độ cao (3)

Năng suất PGA được đánh giá bằng cách sử dụng giống KSM-FFB553 là giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế dưới điều kiện của nồng độ cao của muối kim loại có hóa trị hai.

Môi trường nuôi giống được điều chế theo cách giống với ví dụ thử nghiệm 4, và 1% (thể tích/thể tích) của chúng được cấy trong 30 mL của môi trường đánh giá năng suất PGA [thành phần môi trường: 8,0% glucoza, 8,0% natri glutamat monohydrat, 1,25% chất chiết nấm men, 1,0% amôni sulfat, 0,2% ma-giê sulfat heptahydrat, 0,003% mangan sulfat tetrahydrat đến pentahydrat, 0,7% dikali hydro phosphat, 0,35% kali dihydro phosphat, và 10,2% (tương đương với 0,5 M) của ma-giê clorua heptahydrat hoặc 7,4% (tương đương với 0,5 M) của canxi clorua dihydrat]. Môi trường này được cung cấp để cấy lắc ở 37°C trong 72 giờ.

Sau khi hoàn thành việc cấy, trọng lượng phân tử PGA được bao gồm trong dịch huyền phù nuôi cấy được xác định theo phương pháp được thể hiện trong ví dụ đo 1 được biểu hiện dưới đây. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 18.

Bảng 18

Thành phần môi trường		KSM-FFB553
(Loại)	(Nồng độ)	Năng suất PGA (g/L)
MgCl ₂	0,5M	20,4
CaCl ₂	0,5M	17,3

Như được thể hiện ở Bảng 18, được xác nhận rằng giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế biểu hiện năng suất PGA tuyệt vời ngay cả dưới điều kiện nồng độ cao của muối kim loại có hóa trị hai.

Ví dụ 6: Đo trọng lượng phân tử của PGA (1)

Trọng lượng phân tử của PGA được sản xuất bởi các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* (giống KSM-FFA610, giống KSM-FFA631, giống KSM-FFB406, giống KSM-FFB425, giống KSM-FFB540, và giống KSM-FFB553) của sáng chế được đo.

Môi trường nuôi giống được điều chế theo cách giống với ví dụ thử nghiệm 5, và 1% (thể tích/thể tích) của chúng được cấy đến 30 mL của môi trường đánh giá năng suất [thành phần môi trường: 8,0% glucoza, 8,0% natri glutamat monohydrat, 1,25% chất chiết nấm men, 1,0% amôni sulfat, 0,2% ma-giê sulfat heptahydrat, 0,003% mangan sulfat tetrahydrat đến pentahydrat, 0,7% dikali hydro phosphat, 0,35% kali dihydro phosphat, và 10,2% (tương đương với 1,75 M) của natri clorua]. Môi trường này được cung cấp để cấy lắc ở 37°C trong 72 giờ.

Sau khi hoàn thành việc cấy, trọng lượng phân tử PGA được bao gồm trong dịch huyền phù nuôi cấy được xác định theo phương pháp được thể hiện trong ví dụ đo 1 được biểu hiện dưới đây. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 19.

Bảng 19

Giống	Thành phần môi trường (Nồng độ của natri clorua)	Trọng lượng phân tử PGA
KSM-FFA610	1,75M	33.200.000
KSM-FFA631	1,75M	17.100.000
KSM-FFB406	1,75M	35.700.000
KSM-FFB425	1,75M	6.300.000
KSM-FFB540	1,75M	5.300.000
KSM-FFB553	1,75M	4.400.000

Như được thể hiện ở Bảng 19, được xác nhận rằng giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có thể sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao ngay cả dưới điều kiện bổ sung muối ở nồng độ cao này trong đó sự tăng trưởng là không thể được tạo ra trong giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto. Hơn thế nữa, được xác nhận rằng PGA có trọng lượng phân tử cao có thể được sản xuất bằng cách sử dụng giống có tính kháng với nồng độ muối cao của sáng chế.

Ví dụ 7: Đo trọng lượng phân tử của PGA (2)

Trọng lượng phân tử PGA được đánh giá bằng cách sử dụng giống KSM-FFB553 là giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế như được thể hiện trong Ví dụ 1 dưới điều kiện nồng độ cao của muối kim loại có hóa trị hai hoặc hóa trị một.

Môi trường nuôi giống được điều chế theo cách giống với ví dụ thử nghiệm 4, và 1% (thể tích/thể tích) của chúng được cấy trong 30 mL của môi trường đánh giá năng suất PGA [thành phần môi trường: 8,0% glucoza, 8,0% natri glutamat monohydrat, 1,25% chất chiết nấm men, 1,0% amôni sulfat, 0,2% magiê sulfat heptahydrat, 0,003% mangan sulfat tetrahydrat đến pentahydrat, 0,7% dikali hydro phosphat, 0,35% kali dihydro phosphat, và 11,2% (tương đương với

1,5 M) của kali clorua, 10,2% (tương đương với 0,5 M) của ma-giê clorua heptahydrat, hoặc 7,4% (tương đương với 0,5 M) của canxi clorua dihydrat]. Môi trường này được cung cấp để cấy lắc ở 37°C trong 72 giờ.

Sau khi hoàn thành việc cấy, trọng lượng phân tử PGA được bao gồm trong dịch huyền phù nuôi cấy được xác định theo phương pháp được thể hiện trong ví dụ đo 1 được biểu hiện dưới đây. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 20.

Bảng 20

Thành phần môi trường		KSM-FFB553 trọng lượng phân tử PGA
(Loại)	(Loại)	
KCl	1,5M	3.300.000
MgCl ₂	0,5M	3.100.000
CaCl ₂	0,5M	3.400.000

Như được thể hiện ở Bảng 20, được xác nhận rằng giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có thể sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao dưới điều kiện của nồng độ cao của muối kim loại có hóa trị hai hoặc hóa trị một.

Ví dụ 8: Đánh giá năng suất PGA dưới điều kiện mà không bổ sung axit glutamic

Năng suất PGA được đánh giá bằng cách sử dụng các giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế (giống KSM-FFA610, giống KSM-FFA631, giống KSM-FFB406, giống KSM-FFB425, giống KSM-FFB540 và giống KSM-FFB553) dưới các điều kiện của nồng độ muối cao và mà không bổ sung axit glutamic.

Môi trường nuôi giống được điều chế theo cách giống với ví dụ thử nghiệm 5, và 1% (thể tích/thể tích) của chúng được cấy đến 30 mL của môi trường đánh giá năng suất PGA [thành phần môi trường: 8,0% glyxerol, 0,5% chất chiết nấm men, 1,0% amôni sulfat, 0,2% ma-giê sulfat heptahydrat, 0,003% mangan sulfat tetrahydrat đến pentahydrat, 0,7% of dikali hydro phosphat, 0,35% kali dihydro

phosphat, 7,3% (tương đương với 1,25 M) của natri clorua]. Môi trường này được cung cấp để cấy lắc ở 37°C trong 72 giờ.

Sau khi hoàn thành việc cấy, trọng lượng phân tử PGA được bao gồm trong dịch huyền phù nuôi cấy được xác định theo phương pháp được thể hiện trong ví dụ đo 1 được biểu hiện dưới đây. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 21.

Bảng 21

Giống	Năng suất PGA (g/L)	Trọng lượng phân tử PGA
KSM-FFA610	1,02	4.600.000
KSM-FFA631	0,55	5.200.000
KSM-FFB406	0,37	1.200.000
KSM-FFB425	0,90	4.500.000
KSM-FFB540	0,78	4.600.000
KSM-FFB553	0,65	3.200.000

Như được thể hiện ở Bảng 21, được xác nhận rằng giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* của sáng chế có thể sản xuất PGA có trọng lượng phân tử cao ngay cả dưới điều kiện mà không bổ sung axit glutamic.

Ví dụ đo 1: Phương pháp để định lượng và phương pháp để đo trọng lượng phân tử PGA

Thiết bị sắc ký lỏng hiệu suất cao được sử dụng để định lượng và đo trọng lượng phân tử PGA.

Thành phần thiết bị HPLC

Bơm cung cấp chất lỏng: loại L-6200, được sản xuất bởi Hitachi, Ltd.

Ống góp tự động: loại AS-4000, được sản xuất bởi Hitachi, Ltd.

Lò dạng cột: loại L-5020, được sản xuất bởi Hitachi, Ltd.

Máy dò UV: loại L-4250, được sản xuất bởi Hitachi, Ltd.

Thiết bị phân tích dữ liệu sắc ký: loại D-2500, được sản xuất bởi Hitachi, Ltd.

Như các cột phân tích, các cột lọc chất keo đối với polyme ưa nước, TSKgel G6000PWXL (7,8 mm I.D. $\times$ 30 cm, được sản xuất bởi Tosoh Corporation) và TSKgel G4000PWXL (7,8 mm I.D. $\times$ 30 cm, được sản xuất bởi Tosoh Corporation), trong đó các giới hạn ngăn chặn là khác nhau, được sử dụng. Các cột này được liên kết nối tiếp, và một cột ngăn TSK cột ngăn PWXL (6,0 mm I.D. $\times$ 4,0 cm, Tosoh Corporation) được sử dụng và được nối ngay tức thì trước khi phân tích các cột.

Trong sự phân tích, 0,1 M natri sulfat được sử dụng như một chất tách, và tốc độ dòng được điều chỉnh đến 1,0 mL/phút và nhiệt độ cột được đặt đến 50°C. Định tách rửa được đo ở bước sóng dò là 210 nm. Hơn nữa, như việc xử lý trước mẫu, mẫu dịch huyền phù nuôi cấy được pha loãng thích hợp với 0,1 M natri sulfat được lọc sử dụng máy lọc với màng Durapore 0,45 μ m (số kiểu: MULTI SCREEN MNHV45, được sản xuất bởi MILLIPORE).

Theo sự xác minh nồng độ, một đường cong định cỡ được điều chế bằng cách sử dụng PGA có trọng lượng phân tử là 880,000 (Meiji Food Materia Co., Ltd.). Hơn nữa, theo sự xác minh trọng lượng phân tử, các polyaxit glutamic khác nhau có các trọng lượng phân tử khác nhau (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 162-21411 và 162-21401; SIGMA-ALDRICH P-4886 và P-4761; Meiji Food Materia Co., Ltd. (trọng lượng phân tử là 880,000) trong đó trọng lượng phân tử trung bình khối được xác định trước bằng cách sử dụng Pullulan Shodex STANDARD P-82 (Showa Denko K.K.).

Ví dụ đo 2: Phương pháp để nhận dạng nguyên liệu polyme trong mẫu dịch huyền phù nuôi cấy

Mẫu dịch môi trường nuôi cấy sau khi hoàn thành việc cấy như đã thu được trong ví dụ 4 được cung cấp cho sự ly tâm (loại himac CR21GIII, được sản xuất

bởi Hitachi Koki Co., Ltd.) ở 14,800 vòng/phút trong 30 phút, và dịch huyền phù, là dịch mà các tế bào vi khuẩn đã được loại bỏ từ mẫu, được thu lại. Tiếp theo, từng 1 đến 10 mL của các dịch huyền phù này được chuyển vào ống ly tâm 50 mL được làm bằng polypropylen (số kiểu: 227 261, được sản xuất bởi Greiner Bio-One), và gấp đôi thể tích của EtOH so với mẫu dịch huyền phù này được bổ sung, và sau đó hỗn hợp tạo thành được trộn bằng cách nghịch chuyển, và sau đó hỗn hợp tạo thành được cho giữ nguyên ở nhiệt độ ổn định là -30°C qua đêm. Sau đó, hỗn hợp tạo thành được cung cấp cho sự ly tâm (loại himac CF7D2, được sản xuất bởi Hitachi Koki Co., Ltd.) ở 3.000 vòng/phút trong 30 phút, và phần nhỏ kết tủa được gom. Sau đó, phần nhỏ kết tủa đã thu được được hòa tan trong 2 mL nước chung cất lần nữa, phần nhỏ kết tủa bằng cách bổ sung etanol như được biểu hiện ở trên được điều chế lần nữa, và nguyên liệu tạo thành được gom. Sau đó, mẫu được gom được hòa tan trong 2 mL nước chung cất, và 0,5 mL của chúng được chuyển vào ống thử nghiệm có nắp gắn (số kiểu: ST-13M, được sản xuất bởi NICHIDEN-RIKA GLASS CO., LTD.), và sau đó 0,5 mL axit hydrochloric cô đặc được bổ sung thêm vào và hỗn hợp tạo thành được khuấy, và sau đó ống thử nghiệm được bịt kín bằng nitơ, và xử lý nhiệt được áp dụng thêm vào ở 105 đến 110°C trong 16 giờ. Sau khi xử lý nhiệt, axit hydrochloric và hơi ẩm được chung cất toàn bộ dưới dòng khí nitơ (trong khoảng 6 giờ), và do đó đã thu được nguyên liệu khô và hóa cứng được lấy làm mẫu được thủy phân.

Ngoài ra, PGA có sẵn trên thị trường (trọng lượng phân tử: 880,000, Meiji Food Material Co., Ltd.) được sử dụng như chất pha chế chuẩn PGA, và mỗi L-axit glutamic và D-axit glutamic (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) như đối chứng của mẫu được thủy phân.

Sau đó, mẫu được thủy phân đã thu được này được pha loãng thích hợp, và các axit amin khác nhau trong mẫu được phân tích và axit glutamic trong đó được xác định số lượng bằng máy phân tích axit amin hoàn toàn tự động (loại L-

8900, được sản xuất bởi Hitachi High-Technologies Corporation). Hơn nữa, lượng L-axit glutamic được đo bằng cách sử dụng bộ dụng cụ đo L-axit glutamic (YAMASA CORPORATION) theo phương pháp được biểu hiện trong giao thức được kèm theo bộ dụng cụ. Khi đo bằng máy phân tích axit amin hoàn toàn tự động, tổng lượng các isome hoạt tính quang học (D/L) đã thu được như các kết quả định lượng, và vi sai đã thu được bằng cách trừ các kết quả định lượng đã thu được bằng bộ dụng cụ đo L-axit glutamic từ đó được lấy làm lượng D-axit glutamic.

Kết quả của việc đo là, tỷ lệ các chất đồng phân quang học (D/L) của axit glutamic trong các nguyên liệu polyme được thu hoạch từ các dịch môi trường nuôi cấy của giống KSM-FFA610, giống KSM-FFB425, giống KSM-FFB540 và giống KSM-FFB553 là 68/32, 67/33, 69/31 và 67/33, tương ứng.

Hơn nữa, axit amin khác ngoài axit glutamic không được tìm thấy trong khi đo bằng máy phân tích axit amin hoàn toàn tự động được biểu hiện ở trên, và do đó nguyên liệu polyme trong dịch huyền phù nuôi cấy được xác định để là PGA. Hơn thế nữa, tỷ lệ D/L trong PGA được sản xuất bởi giống vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được lựa chọn được biểu hiện ở trên có tính kháng với nồng độ muối cao của sáng chế được đánh giá là tương đương với tỷ lệ D/L trong PGA được sản xuất bởi giống chuẩn vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* var. natto đã biết công khai.

Ví dụ đo 3: Phương pháp đo tính nhót của dung dịch PGA

Từ mẫu dịch môi trường nuôi cấy được điều chế, ở 1% (thể tích/thể tích), bằng cách sử dụng giống KSM-FFB553 trong số các giống được biểu hiện ở trên trong môi trường để điều chế PGA [thành phần môi trường: 8,0% glucoza, 8,0% natri glutamat monohydrat, 0,5% chất chiết nấm men, 1,0% amôni sulfat, 0,2% ma-giê sulfat heptahydrat, 0,003% mangan sulfat tetrahydrat đến pentahydrat, 0,7% dikali hydro phosphat, 0,35% kali dihydro phosphat], bột khô

PGA được điều chế bằng cách gom bởi sự kết tủa axit, và sau đó tinh chế và gom bằng sự kết tủa etanol, và làm đông khô. Sau đó, mẫu PGA đã thu được này (Mw: 5.000 k) được hòa tan trong nước chưng cất và 1,25 M dung dịch natri clorua có nước để là 4% (khối lượng/khối lượng) và 8% (khối lượng/khối lượng), tương ứng. Từng mẫu nằm trong khoảng từ 40 mL của chúng được chuyển ống gắn thủy tinh (số kiểu: số 7 hoặc số 8, được sản xuất bởi Maruemu Corporation) hoặc 50 mL ống ly tâm được làm bằng polypropylen (số kiểu: 227 261, được sản xuất bởi Greiner Bio-One) với việc ngăn chặn sự sinh ra các bọt khí, và tính nhớt được đo bằng cách sử dụng máy đo độ nhớt Brookfield (loại TVB-15, được sản xuất bởi Toki Sangyo Co., Ltd.) và bằng cách sử dụng rô-to M2 ở nhiệt độ mẫu là 20 đến 25°C (nhiệt độ phòng), thời gian đo là 60 giây (kiểu dừng tự động) và tốc độ quay rô-to là 60 vòng/phút. Ngoài ra, đối với mẫu mà có giá trị được đo dưới điều kiện đo được biểu hiện ở trên vượt quá giới hạn trên thì tính nhớt sẽ được đo bằng sự thay đổi thích hợp tốc độ quay đến 30 vòng/phút hoặc rô-to được sử dụng đến M3 hoặc M4.

Kết quả của việc đo là, trong một mẫu của PGA 4% (khối lượng/khối lượng), trong khi tính nhớt của mẫu trong đó không có muối được bổ sung là 380 mPa·s, tính nhớt của mẫu để trong đó muối được bổ sung là 60 mPa·s. Hơn nữa, trong mẫu của PGA 8% (khối lượng/khối lượng), trong khi tính nhớt của mẫu để trong đó không có sự bổ sung muối là 1,480 mPa·s, tính nhớt của mẫu để trong đó muối được bổ sung là 450 mPa·s.

Từ các kết quả đo được biểu hiện ở trên, hiệu quả giảm tính nhớt của mẫu PGA bằng sự bổ sung muối được xác nhận.

Ví dụ đo 4: Phương pháp phân tích để nhận dạng các loài vi khuẩn dựa vào trình tự nucleotit là gen 16S rARN

Sự nhận dạng các loài vi khuẩn bằng trình tự nucleotit của gen 16S rARN được thực hiện theo các thủ tục thử nghiệm sau đây.

Theo cách giống với ví dụ thử nghiệm 2, mẫu lấy làm mẫu đối với PCR được điều chế từ vi khuẩn tế bào được bảo quản lạnh, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng môi 27f và môi 1525r được thể hiện ở Bảng 2 để khuếch đại mảnh ADN nằm trong khoảng từ 1,5 kb trong vùng gen 16S rARN. Đối với ADN polymeraza, TaKaRa LA Taq (được sản xuất bởi TaKaRa Bio) được sử dụng. Sau khi làm biến tính mẫu ADN ở 95°C trong 5 phút, 30 chu kì của 95°C trong 1 phút, 55°C trong 30 giây, và 72°C trong 2 phút được thực hiện, tiếp theo bằng cách nung nóng ở 72°C trong 2 phút.

Các trình tự nucleotit ADN được phân tích trên mảnh ADN đã thu được này trong vùng gen 16S rARN bằng cách sử dụng từng môi 27f, môi f2L(-), môi 926f, môi rE1L, môi r2L' hoặc môi 1525r như được thể hiện ở Bảng 2 như môi cho một trình tự. Sự phân tích mẫu để sắp xếp thứ tự để điều chế bằng bộ dụng cụ Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (được sản xuất bởi Applied Biosystems Inc.), theo giao thức gắn kèm. Đối với sự tinh chế mẫu trước sự phân tích, bộ dụng cụ Montage SEQ (được sản xuất bởi MILLIPORE) được sử dụng.

Do đó, đối với mẫu trình tự được điều chế, trình tự được phân tích bằng cách sử dụng bộ sắp xếp trình tự ADN (tên thương mại: ABI 3100 Genetic Analyzer, được sản xuất bởi Applied Biosystems Inc.) để xác định trình tự nucleotit.

Sau đó, mỗi trình tự nucleotit đã thu được được phân mảnh bằng cách sử dụng GENETYX ATSQ phiên bản 2.01 (được sản xuất bởi GENETYX CORPORATION). Đối với việc tìm kiếm độ tương đồng trình tự, “BLAST cơ bản” trong “BLAST” trong nhãn chọn “Nucleotit” của cơ sở dữ liệu công khai NCBI (Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia, <http://www.ncbi.nlm.gov/>) được sử dụng, và “nucleotit blast” được lựa chọn từ chương trình BLAST. Giống chuẩn có tỷ lệ tương đồng cao nhất được lựa chọn

bằng cách định rõ “Các trình tự bộ gen tham khảo (refseq_genomics)” như cơ sở dữ liệu đối tượng tìm kiếm và “Các trình tự tương đồng cao (megablast)” như một chương trình chọn lựa. Sau đó, liên quan đến trình tự của gen 16S rARN của giống chuẩn được lựa chọn và trình tự của gen 16S rARN của giống ứng cử vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được biểu hiện ở trên có tính kháng với nồng độ muối cao trong đó trình tự được xác định, độ tương đồng của trình tự nucleotit chống lại trình tự nucleotit được phân tích bằng một nhãn chọn “Nucleotit và tính tương đồng nucleotit” bằng cách sử dụng GENETYX Ver. 13 (được sản xuất bởi GENETYX CORPORATION), và độ tương đồng (%) được tính toán.

Sáng chế bộc lộ các phương án thực hiện được mô tả trong phần mô tả, nhưng các phương án thực hiện này không nhằm giới hạn bởi bất kỳ chi tiết nào của phần mô tả, trừ khi được quy định cụ thể khác, mà tốt hơn là được hiểu rộng hơn phạm vi như được trình bày trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Đơn sáng chế này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên theo đơn sáng chế JP 2016-165099 nộp tại Nhật Bản ngày 25/8/2016, được kết hợp vào trong sáng chế bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất axit poly-gama-glutamic, trong đó phương pháp này bao gồm bước cấy vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được xác định theo số truy cập: NITE BP-02276, số truy cập: NITE BP-02277, số truy cập: NITE BP-02278, số truy cập: NITE BP-02279, số truy cập: NITE BP-02280, hoặc số truy cập: NITE BP-02281.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có tính kháng với nồng độ muối cao và có thể tăng trưởng trong môi trường LB trong đó nồng độ của natri clorua được điều chỉnh đến 12% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 2,05 M, nhiệt độ phòng) hoặc cao hơn, và; trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* có khả năng sản xuất axit poly-gama-glutamic có trọng lượng phân tử là 300.000 hoặc lớn hơn, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy dưới điều kiện là 10% (khối lượng/thể tích) (tương đương với 1,71 M, nhiệt độ phòng) theo nồng độ của natri clorua.
3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2, trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* biểu hiện các đặc tính vi sinh vật học được nêu trong Bảng 1 sau:

Bảng 1

Dạng	Dạng roi
Đặc tính nhuộm vi khuẩn gram	+
Sự hình thành bào tử	+
Di động	+
Dạng khuẩn lạc (môi trường thạch LB)	Dạng tròn, màu kem, nhớt
Thử nghiệm nhiệt độ tăng trưởng	37°C, tốt 45°C, tốt
Phản ứng Catalaza	+
Phản ứng Oxidaza	+
Sản xuất axit/khí từ Glucoza	-/-
Thử nghiệm O/F (sự oxy hóa/sự lên men)	-/-.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được cấy trong môi trường chứa ít nhất một loại muối được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, kali clorua, canxi clorua, và magiê clorua.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó nồng độ của muối trong môi trường nằm trong khoảng từ 0,01 M đến 2,5 M.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó trọng lượng phân tử của axit poly-gama-glutamic được sản xuất nằm trong khoảng từ 300.000 đến 50.000.000.
7. Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*, trong đó vi khuẩn này được xác định theo số truy cập: NITE BP-02276, số truy cập: NITE BP-02277, số truy cập: NITE BP-02278, số truy cập: NITE BP-02279, số truy cập: NITE BP-02280, hoặc số truy cập: NITE BP-02281.
8. Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* theo điểm 7, trong đó vi khuẩn này có thể tăng trưởng trong môi trường LB trong đó nồng độ của natri clorua được điều chỉnh đến 12% (khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn, và;
có khả năng sản xuất axit poly-gama-glutamic có trọng lượng phân tử lớn hơn hoặc bằng 300.000, khi vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* được nuôi cấy trong điều kiện là 10% (khối lượng/thể tích) theo nồng độ của natri clorua.
9. Vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis* theo điểm bất kỳ trong số các điểm 7 hoặc 8, trong đó vi khuẩn này biểu hiện các đặc tính vi sinh vật học được nêu trong Bảng 1 sau.

Bảng 1

Dạng	Dạng roi
Đặc tính nhuộm vi khuẩn gram	+
Sự hình thành bào tử	+
Di động	+
Dạng khuẩn lạc (môi trường thạch LB)	Dạng tròn, màu kem, nhớt
Thử nghiệm nhiệt độ tăng trưởng	37°C, tốt 45°C, tốt
Phản ứng Catalaza	+
Phản ứng Oxidaza	+
Sản xuất axit/khí từ Glucoza	-/-
Thử nghiệm O/F (sự oxy hóa/sự lên men)	-/-.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Kao Corporation

<120> Phương pháp sản xuất axit poly-gamma-glutamic và vi khuẩn hình que
Bacillus subtilis

<130> P16-0793W000

<150> JP 2016-165099

<151> 2016-08-25

<160> 8

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit để khuếch đại vùng 16S rADN, mỗi 27f

<400> 1

agagtttgat cctggctcag

20

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit để khuếch đại vùng 16S rADN, mỗi 1525r

<400> 2

aaaggaggtg atccagcc

18

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit để sắp xếp thứ tự trình tự nucleotit của vùng 16S
rADN, mỗi rE1L

<400> 3

gtaggagtct ggaccgtgt

19

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit để sắp xếp thứ tự trình tự nucleotit của vùng 16S
rADN, mỗi f2L(-)

<400> 4

ccagcagccg cggtaata

18

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit để sắp xếp thứ tự trình tự nucleotit của vùng 16S
rADN, mỗi 926f

<400> 5

aaactcaaag gaattgacgg

20

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit để sắp xếp thứ tự trình tự nucleotit của vùng 16S
rADN, mỗi r2L'

<400> 6

gactaccagg gtatctaatac

20

<210> 7

<211> 1475

<212> ADN

<213> vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*

<400> 7

gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc ggacagatgg gagcttgctc	60
cctgatgtta gcggcgagc ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat	120
aactccggga aaccggggct aataccggat ggttggttga accgcatggg tcaaacataa	180
aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg acccgcggcg cattagctag ttggtgaggt	240
aacggctcac caaggcaacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga	300
ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg caatggacga	360
aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtttt cggatcgtaa agctctgttg	420
ttagggaaga acaagtaccg ttcgaatagg gcggtacctt gacggtacct aaccagaaa	480
ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcg taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa	540
ttattgggag taaagggctc gcaggcgggt tcttaagtct gatgtgaaag ccccggtc	600
aaccggggag ggtcattgga aactggggaa cttgagtga gaagaggaga gtggaattcc	660
acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct	720
ggtctgtaac tgacgtgag gagcgaaaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg	780
tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgtagggggg tttccgcccc ttagtgctgc	840
agctaacgca ttaagcactc cgctgggga gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa	900
ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttta ttcgaagcaa cgcaagaac	960
cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc ctagagatag gacgtcccct tcgggggcag	1020
agtgacaggt ggtgcatggg tgctgctcgc tcgtgctgtg agatgttggg ttaagtcccc	1080
caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc agcattcagt tgggcaactct aaggtgactg	1140
ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaata atcatgcccc ttatgacctg	1200
ggctacacac gtgctacaat ggacagaaca aagggcagcg aaaccgaggt gtaagccaa	1260
tcccacaaat ctgttctcag ttcggatcgc agtctgcaac tcgactgcgt gaagctggaa	1320
tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc	1380
gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt gaggtaacct ttaggagcc	1440

agccgccgaa ggtgggacag atgattgggg tgaag

1475

<210> 8

<211> 1475

<212> ADN

<213> vi khuẩn hình que *Bacillus subtilis*

<400> 8

gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc ggacagatgg gagcttgctc	60
cctgatgtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat	120
aactccggga aaccggggct aataccggat ggttgtttga accgcatggt tcaaacataa	180
aaggtggctt cggtaccac ttacagatgg accgcggcg cattagctag ttggtgaggt	240
aayggctcac caaggcaacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga	300
ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcg caatggacga	360
aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtttt cggatcgtaa agctctgttg	420
ttaggaaga acaagtaccg ttcgaatagg gcggtacct gacggtacct aaccagaaag	480
ccacggctaa ctacgtgcc gcagccggc taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa	540
ttattgggcg taaagggtc gcaggcgggt tottaagtct gatgtgaaag ccccggtc	600
aaccggggag ggtcattgga aactggggaa cttgagtgc gaagaggaga gtggaattcc	660
acgtgtagcg gtgaaatgc tagagatgtg gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct	720
ggtctgtaac tgacgtgag gagcgaaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg	780
tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttaggggg tttccgcccc ttagtgctgc	840
agctaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa	900
ttgacggggg ccgcacaag cgggtggagca tgtggtttta ttcgaagcaa cgcgaagaac	960
cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc ctagagatag gacgtcccct tcgggggcag	1020
agtgacaggt ggtgcatggt tgcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg	1080
caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc agcattcagt tgggcaactct aaggtgactg	1140
ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc ttatgacctg	1200
ggctacacac gtgctacaat ggacagaaca aagggcagcg aaaccgcgag gttaagccaa	1260
tcccacaaat ctgttctcag ttcggatcgc agtctgcaac tcgactgcgt gaagctggaa	1320
tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc	1380
gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt gaggtaacct tttaggagcc	1440
agccgccgaa ggtgggacag atgattgggg tgaag	1475