



(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)



1-0028703

(51)⁷ C12P 1/04; C12R 1/07; C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2016-02551

(22) 28/01/2015

(86) PCT/KR2015/000900 28/01/2015

(87) WO2015/115790 06/08/2015

(30) 10-2014-0010729 28/01/2014 KR

(45) 25/06/2021 399

(43) 25/11/2016 344A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) KIM, Taek Beom (KR); GWON, Song Hui (KR); KIM, Bi Na (KR); CHO, Seong Jun (KR); KANG, Kyung Il (KR); PARK, Seung Won (KR); HONG, Young Ho (KR); PARK, Min Ju (KR).

(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) CHŨNG BACILLUS SP. LÊN MEN ĐƯỢC CẢI THIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SỬ DỤNG CHŨNG VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G, có khả năng loại bỏ các yếu tố phân dinh dưỡng và về hoạt tính proteaza, và thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt, giảm tốc độ tiết chất nhầy, phương pháp sản xuất bã đậu nành lên men bằng cách sử dụng chủng này, bã đậu nành lên men được sản xuất từ phương pháp này, và thành phần thức ăn gia súc chứa bã đậu nành lên men này. Bã đậu nành lên men được sản xuất bởi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế có ít yếu tố phân dinh dưỡng như chất ức chế trypsin, oligosacarit đậu nành, và polysacarit, hàm lượng protein thô cao, và độ hòa tan protein cao, và còn bao gồm các peptit kích thích nhỏ có thể tiêu hóa bởi vật nuôi do tạo thành các phân tử thấp, do đó được sử dụng hiệu quả làm nguồn thức ăn protein thực vật chất lượng cao có tỉ lệ tiêu hóa và hấp thụ tốt và có hiệu quả cao làm thức ăn chăn nuôi.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến Chủng *Bacillus* sp. lên men được cải thiện, phương pháp sản xuất sử dụng chủng vi khuẩn này, bã đậu nành lên men từ phương pháp và hỗn hợp thức ăn chứa chúng. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với khả năng lên men bã đậu nành được cải thiện, là chủng có khả năng loại bỏ các yếu tố phản dinh dưỡng tốt và hoạt tính proteaza cao, và thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao kháng lại tác nhân gây bệnh cũng như làm giảm thiểu tiết chất nhầy trong suốt quá trình lên men, phương pháp sản xuất bã đậu nành lên men bằng cách sử dụng chủng vi khuẩn này, bã đậu nành lên men được sản xuất từ phương pháp này, và hỗn hợp thức ăn chứa bã đậu nành lên men này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khi một số bệnh gây tử vong ở người như bệnh bò điên, được chứng minh là do thành phần protein động vật được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, thì xu hướng thay thế protein động vật bổ sung vào thức ăn chăn nuôi bằng protein thực vật nhanh chóng được chú ý tới trên toàn cầu.

Bột đậu nành đã khử béo (sau đây được gọi là “bã đậu nành”) là nguồn protein thực vật phổ biến nhất được sử dụng trên thị trường thức ăn chăn nuôi làm nguồn thay thế cho protein động vật như bột cá, bột thịt, bột thịt xương hoặc nguyên sinh chất. Bã đậu nành còn được gọi là bánh dầu đậu nành, là sản phẩm phụ dạng rắn có nguồn gốc từ quá trình sản xuất dầu đậu nành. Ở Hàn Quốc, bã đậu nành được sử dụng làm nguồn protein thực vật, chiếm 60% tổng nguồn cung protein thức ăn gia súc, đạt đến 2 triệu tấn mỗi năm (theo Hiệp hội thành phần thức ăn gia súc Hàn Quốc, 2004).

Tính theo khối lượng khô, bã đậu nành chứa 55-56% khối lượng protein, 13-14% khối lượng cacbohydrat hòa tan, và 21-22% khối lượng cacbohydrat không tan. Ngoài ra, bã đậu nành còn chứa khoảng 1% khối lượng chất béo thô và khoảng 4-6% khối lượng vôi khoáng (lime) (Theo In-Kyu Han, Vegetable protein feed, Food Processing, Sun-Jin Publishing Co., 67-107, 1998).

Trong khi đó, bã đậu nành còn chứa nhiều yếu tố phản dinh dưỡng (ANF), là những yếu tố có thể làm giảm khả năng tiêu hóa khi được sử dụng làm thức ăn (Theo Li et al J. Anim Sci., 68: 1790, 1990). Trong số đó, chất ức chế trypsin (TI) là đại diện điển hình, và ở động vật trên cạn, chế độ ăn chứa TI được dùng để can thiệp vào chức năng enzym của trypsin và chymotrypsin, dẫn đến sự suy giảm độ sử dụng của protein tổng số. Cụ thể là, vì các yếu tố phản dinh dưỡng ảnh hưởng lớn đến vật nuôi non, nên việc sử dụng bã đậu nành trong thức ăn cho vật nuôi non bị hạn chế. Ngoài ra, chất làm dính tế bào hồng cầu, chất làm ngưng kết tế bào hồng cầu, oligosacarit gây tiêu chảy và đau bụng ở vật nuôi, cụ thể như raffinosa, stachyosa, v.v..., hoặc polysacarit ức chế quá trình hấp thụ dinh dưỡng cũng được tìm thấy trong bã đậu nành. Một số trong đó bị phá hủy bởi xử lý nhiệt. Tuy nhiên, trong suốt quá trình xử lý, protein đậu nành bị biến tính và khả năng hòa tan của chúng bị làm giảm, axit amin thiết yếu như lyzin, v.v..., có thể bị phá hủy. Gần đây, để sử dụng protein đậu nành hiệu quả hơn, phương pháp xử lý để làm tăng hiệu quả bằng cách loại bỏ các yếu tố phản dinh dưỡng đã được phát triển.

Các sản phẩm đậu nành đã xử lý hiện nay, cụ thể như protein đậu nành cô đặc, protein đậu nành đã tách ra, hoặc proein đậu nành thủy phân, thường được sản xuất bằng xử lý hóa học hoặc xử lý enzym. Tuy nhiên, phương pháp xử lý hóa học tốn kém, và dẫn đến vấn đề làm giảm mức độ hòa tan của protein, bởi vì sự biến tính của protein hoặc thất thoát các axit amin hòa tan xảy ra do xử lý nhiệt, xử lý hóa chất, hoặc sấy bằng nhiệt trong quá trình sản xuất. Vì lý do này, việc xử lý nhiệt nhưng không gây biến tính protein trong phương pháp xử lý hóa học đã được thực hiện, theo đó, yếu tố phản dinh dưỡng như chất ức chế trypsin với hàm lượng đáng kể vẫn còn tồn đọng trong bã đậu nành.

Để khắc phục hạn chế của phương pháp xử lý hóa học, sản phẩm bã đậu nành lên men được sản xuất bằng phương pháp xử lý sinh học sử dụng vi khuẩn *Bacillus* hoặc nấm đã được phát triển (sáng chế Hàn Quốc số 10-0645284, 10-0459240 và 10-0925173). Phương pháp xử lý lên men được sử dụng để loại bỏ nhiều yếu tố phản dinh dưỡng, đồng thời phân giải protein hoặc cacbohydrat thành dạng phân tử thấp dễ tiêu hóa trong quá trình lên men, do đó tạo ra nguyên liệu protein chất lượng cao làm thức ăn gia súc, là nguyên liệu có tỉ lệ tiêu hóa và hấp thụ tốt.

Tuy nhiên, lên men rắn thường được sử dụng trong phương pháp lên men, và lên men rắn có nhược điểm là cần được cung cấp không khí liên tục để duy trì điều kiện hiếu

khí để loại bỏ nhiệt lượng được tạo ra trong suốt quá trình lên men. Ngoài ra, phương pháp lên men này cần thời gian lên men dài lên đến 48 giờ hoặc lâu hơn để loại bỏ các yếu tố phản dinh dưỡng nói trên đến mức tối ưu. Thời gian lên men dài làm giảm tốc độ quay vòng của hệ thống lên men và làm tăng chi phí sản xuất chung.

Theo đó, các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp sản xuất bã đậu nành lên men bằng lên men rắn sử dụng chủng *Bacillus subtilis* TP (KFCC11343P, số đăng ký KCCM11438P) có những ưu điểm tốt cần thiết trong sản xuất bã đậu nành lên men, để rút ngắn đáng kể thời gian lên men trong quá trình sản xuất bã đậu nành lên men (bằng sáng chế có số công bố tại Hàn Quốc 10-2011-0027535). Bằng phương pháp này, bã đậu nành lên men có chất lượng tương đương hoặc cao hơn bã đậu nành lên men theo phương pháp thông thường có thể được sản xuất với thời gian thậm chí ngắn hơn bằng cách sử dụng chủng *Bacillus subtilis* TP6, là chủng tốt có khả năng loại bỏ các yếu tố phản dinh dưỡng và về hoạt tính proteaza tốt nhất.

Tuy nhiên, phương pháp này có nhược điểm là chủng *Bacillus subtilis* TP6 có hoạt tính ức chế sự phát triển của mầm bệnh thấp, do đó các tác nhân gây bệnh cũng tăng lên nhanh chóng khi bã đậu nành bị nhiễm *E. Coli* hoặc *Salmonella* trong quá trình lên men.

Theo đó, các tác giả sáng chế đã nỗ lực tuyển chọn chủng lên men với khả năng lên men rắn bã đậu nành được cải thiện. Kết quả là, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G đã được phát triển, là chủng tốt có ưu điểm trong khả năng loại bỏ các yếu tố phản dinh dưỡng, hoạt tính proteaza, và hoạt tính kháng khuẩn kháng lại tác nhân gây bệnh, và làm giảm tiết chất nhầy trong quá trình lên men. Hơn nữa, tác giả sáng chế phát hiện ra rằng khi chủng này được sử dụng để lên men rắn bã đậu nành, thì có thể sản xuất được bã đậu nành lên men có chất lượng cao với tỉ lệ tiêu hóa và khả năng được hấp thụ được nâng cao, cũng như cải thiện hiệu quả làm thức ăn, nhờ quá trình chuyển hóa thành phân tử thấp thông qua thủy phân protein đậu nành và làm tăng hàm lượng protein thô, bất hoạt chất ức chế trypsin, hoặc làm giảm hàm lượng các yếu tố phản dinh dưỡng như polysacarit không thể tiêu hóa, thậm chí trong thời gian lên men ngắn hơn so với phương pháp thông thường. Đơn patent có số công bố WO 2011/031020 A2 đề cập đến "phương pháp sản xuất bột đậu nành lên men", trong đó "hàm lượng protein cao, và tỷ lệ tiêu hóa và hấp thụ cũng được cải thiện nhờ phân tử lượng thấp của protein".

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục tiêu của sáng chế là đề xuất chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với khả năng sản xuất bã đậu nành lên men được cải thiện.

Mục tiêu tiếp theo của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất bã đậu nành lên men bằng phương pháp lên men rắn sử dụng chủng *Bacillus amyloliquefaciens*.

Mục tiêu tiếp theo của sáng chế là đề xuất bã đậu nành lên men được sản xuất bởi phương pháp trên.

Mục tiêu tiếp theo của sáng chế là đề xuất thành phần thức ăn gia súc bao gồm bã đậu nành lên men.

Sáng chế đề xuất chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G (KCCM1147P) mới hữu ích trong sản xuất bã đậu nành lên men bằng phương pháp lên men rắn.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế được đặc trưng bởi tốt hoạt tính loại bỏ các yếu tố phản dinh dưỡng, hoạt tính proteaza, và hoạt tính kháng khuẩn kháng lại các yếu tố gây bệnh được cải thiện, và làm giảm tiết chất nhầy trong quá trình lên men, do đó tạo ra bã đậu nành lên men chất lượng cao nhờ quá trình lên men rắn.

Phạm vi bảo hộ của sáng chế được xác định bởi các điểm, cụ thể là phương pháp sản xuất bột đậu nành lên men bằng cách lên men rắn, phương pháp này bao gồm việc cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có số đăng ký KCCM11471P vào bột đậu nành.

Sáng chế cũng đề xuất chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với số đăng ký KCCM11471P.

Sáng chế cũng đề cập tới các vấn đề liên quan như được trình bày bên dưới. Trong chừng mực bất kỳ vấn đề nằm ngoài phạm vi yêu cầu bảo hộ, nó mang tính minh họa và là một phần của sáng chế nhằm mục đích tham khảo.

Cụ thể, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế tổng hợp proteaza có hoạt tính mạnh để bất hoạt các yếu tố phản dinh dưỡng polysacarit khác nhau như TI ức chế khả năng tiêu hóa bã đậu nành và thủy phân protein đậu nành khối lượng phân tử

cao thành protein khối lượng phân tử thấp, qua đó nâng cao đáng kể tỷ lệ tiêu hóa và hấp thụ bã đậu nành lên men.

Hơn nữa, trong khi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế sinh trưởng bằng cách sử dụng cacbohydrat trong các thành phần của bã đậu nành, nó chuyển hóa cacbohydrat thành protein cấu thành tế bào. Do đó, hàm lượng tương đối của protein thô trong bã đậu nành lên men tăng lên, góp phần quan trọng trong sản xuất thức ăn gia súc chất lượng cao.

Theo phương án thực hiện ưu tiên, tác giả sáng chế đã phân lập 14 chủng với khả năng tổng hợp proteaza tốt cao từ các loại thức ăn truyền thống khác nhau, qua đó tuyển chọn chủng lên men có thể được sử dụng để sản xuất bã đậu nành lên men bằng phương pháp lên men rắn (xem bảng 1).

Từ 14 chủng đã phân lập, chủng CJ823 đã được tuyển chọn, trong đó chủng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất, cho phép kháng lại *E. coli* và *Salmonella* là tác nhân điển hình gây ngộ độc thức ăn cho vật nuôi.

Chủng CJ823 được chọn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn kháng lại *E. coli* và *Salmonella* tốt hơn đáng kể so với chủng *Bacillus subtilis* TP6 (KFCC 11343P; sáng chế có số công bố tại Hàn Quốc 10-2011-0027535) vốn đã được sử dụng làm chủng lên men trong phương pháp thông thường để sản xuất bã đậu nành lên men bằng phương pháp lên men rắn (xem bảng 2).

Hơn nữa, kết quả thí nghiệm khẳng định rằng chủng CJ823 ức chế hiệu quả sự sinh trưởng của *Salmonella* trong suốt quá trình lên men thực tế, do đó phù hợp để sản xuất bã đậu nành lên men chất lượng cao (xem bảng 3).

Như vậy, chủng CJ823 tổng hợp proteaza nồng độ cao và thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt kháng lại tác nhân gây bệnh, nhưng tiết ra chất nhầy dính do quá trình polyme hóa levan tạo thành fructan và polyglutamat vốn có nguồn gốc từ đường và protein của đậu nành nguyên liệu bởi enzym được tạo ra trong quá trình lên men. Việc tiết chất nhầy có thể gây ra vấn đề về kiểm soát quá trình lên men và vận chuyển sản phẩm lên men khi sản xuất bã đậu nành lên men trên quy mô lớn.

Theo đó, tác giả sáng chế đã gây đột biến bằng tia cực tím (UV) đối với chủng CJ823 để phát triển chủng đột biến với tốc độ tiết chất nhầy được làm giảm trong khi vẫn duy trì ưu điểm về đặc tính enzym/sinh lý (xem Fig.3).

Trước tiên, chủng CJ823 được chiếu tia UV 254 nm, tiếp đó 16 chủng đột biến được tuyển chọn dựa vào hình dạng khuẩn lạc và việc tạo thành vùng sáng do tiết chất nhầy trong môi trường chọn lọc chứa sữa gầy. 16 chủng đột biến đã tuyển chọn được đưa vào môi trường rắn, tiếp đó hoạt tính proteaza và hàm lượng Poly- γ -axit glutamic (γ -PGA) được phân tích để tuyển chọn chủng đột biến U304 cuối cùng thể hiện hoạt tính proteaza cao nhất và hàm lượng γ -PGA thấp (xem bảng 4).

Để định danh chủng đột biến U304 được tuyển chọn cuối cùng, khả năng đồng hóa đường đã được ưu tiên phân tích. Kết quả là, chủng đột biến U304 tương đồng 98% với *Bacillus subtilis* và *Bacillus amyloliquefaciens* về đặc tính sinh hóa (xem bảng 5).

Hơn nữa, kết quả phân tích trình tự rARN 16S chỉ ra rằng chủng đột biến U304 có trình tự rARN 16S của trình tự định danh (SEQ ID) số 1. Căn cứ vào trình tự này, sự tương đồng về trình tự và mối quan hệ phát sinh loài giữa chủng đột biến U304 và các chủng đã biết được phân tích. Kết quả là, chủng đột biến U304 tương đồng 99,92% với *Bacillus amyloliquefaciens* và có mối quan hệ gần gũi nhất trên cây phát sinh loài (xem bảng 5).

Khi các đặc tính sinh hóa, tương đồng trình tự, và mối quan hệ phát sinh loài được phân tích cùng nhau, chủng đột biến U304 theo sáng chế được chỉ định là *Bacillus amyloliquefaciens* K2G.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế là chủng được cải tạo có tốc độ tiết chất nhầy được làm giảm bởi sự giảm đáng kể tổng hợp polyme như γ -PGA, trong khi duy trì đặc tính của chủng bố mẹ, bao gồm năng lực tổng hợp proteaza cao và hoạt tính kháng khuẩn tốt kháng lại các tác nhân gây bệnh như *E.coli* hoặc *Salmonella*. Do đó, chủng U304 có thể được sử dụng hiệu quả trong sản xuất bã đậu nành lên men bằng phương pháp lên men rắn.

Để khẳng định các đặc tính tốt, những thay đổi về hàm lượng protein thô sau khi lên men rắn bằng chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế đã được kiểm tra.

Kết quả cho thấy rằng, khi lên men 24 giờ, bã đậu nành được lên men bởi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế, hàm lượng protein thô tương đương hoặc cao hơn bã đậu nành được lên men bởi chủng *Bacillus subtilis* TP6 vốn được biết đến là chủng lên men bã đậu nành phổ biến (xem bảng 6).

Hơn nữa, sự thay đổi về hàm lượng TI trong bã đậu nành được lên men bởi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế cũng được kiểm tra. Kết quả cho thấy, hàm lượng TI trong bã đậu nành được lên men 16 giờ bởi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế tương đương với hàm lượng TI trong bã đậu nành được lên men 24 giờ bởi chủng *Bacillus subtilis* TP6, kết quả gợi ý rằng có thể làm giảm các yếu tố phản dinh dưỡng tới mức tương đương nhờ quá trình lên men chỉ trong 16 giờ (xem bảng 7).

Các kết quả phân tích chỉ ra rằng khi sản xuất bã đậu nành lên men bằng phương pháp lên men rắn, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế có thể sản xuất bã đậu nành lên men có hàm lượng protein thô cao và hàm lượng các yếu tố phản dinh dưỡng thấp làm thức ăn protein chất lượng cao trong thời gian lên men ngắn, so với chủng thông thường. Sáng chế đã đạt được kết quả tốt trong việc làm giảm thời gian lên men, từ đó làm tăng tốc độ quay vòng hệ thống lên men để làm tăng số mẻ sản xuất được hàng năm, và do đó, khách hàng có thể được cung cấp bã đậu nành lên men chất lượng cao với giá thành thấp.

Theo đó, tác giả sáng chế đã đăng ký chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G, là chủng có khả năng loại bỏ các yếu tố phản dinh dưỡng, về hoạt tính proteaza và hoạt tính kháng khuẩn kháng lại tác nhân gây bệnh, cũng như tốc độ tiết chất nhầy được làm giảm, theo đó tạo điều kiện tốt hơn trong sản xuất bã đậu nành lên men chất lượng cao bằng phương pháp lên men rắn, theo Hiệp ước Budapest tại trung tâm giống vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào 7/11/2013 với mã đăng ký KCCM11471P.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất bã đậu nành lên men bằng phương pháp lên men rắn sử dụng chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G.

Cụ thể, phương pháp sản xuất theo sáng chế được đặc trưng bởi các bước:

a) bổ sung nước vào bã đậu nành để thực hiện xử lý nhiệt;

b) làm mát bã đậu nành đã xử lý nhiệt, sau đó cấy truyền chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G vào; và

c) thu nhận bã đậu nành lên men bằng cách nuôi cấy rắn chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G được cấy truyền trong bã đậu nành.

Bước a) là bước bổ sung nước vào bã đậu nành dưới dạng nguyên liệu thô để thực hiện xử lý nhiệt. Trước khi lên men rắn, một lượng thích hợp nước được phun trực tiếp vào bã đậu nành thô, và chúng được đảo trộn để kiểm soát hàm lượng ẩm, tiếp đó được xử lý nhiệt trong thời gian xác định trước.

Theo phương án thực hiện ưu tiên của sáng chế, nước trong bước a) được bổ sung sao cho hàm lượng nước trong bã đậu nành bằng 30-80% (thể tích/khối lượng v/w), tốt hơn là 30-70% (v/w), và tốt nhất là 40-60% (v/w). Bã đậu nành có hàm lượng nước trong phạm vi tối ưu nêu trên ngăn chặn sự chậm trễ của quá trình lên men do độ ẩm thấp, cải thiện chi phí cao cần thiết để vận chuyển bã đậu nành và quá trình sấy khô sau khi lên men, và hiệu suất nhiệt.

Tiếp đó, bã đậu nành đã bổ sung nước được đưa vào xử lý nhiệt. Xử lý nhiệt được thực hiện nhằm mục đích giết chết các loại mầm bệnh trong bã đậu nành nguyên liệu, phá hủy thành tế bào đậu nành, và biến tính protein, qua đó cung cấp môi trường thuận lợi cho sự sinh trưởng của vi sinh vật mong muốn. Quá trình xử lý nhiệt có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực, nhưng phương pháp hấp hoặc hấp quá nhiệt được ưu tiên sử dụng.

Theo phương án thực hiện ưu tiên của sáng chế, quá trình xử lý nhiệt của bước a) được thực hiện bằng cách sử dụng hơi nước nóng 70-130°C trong 10-60 phút hoặc hơi nước quá nhiệt 200-300°C trong thời gian ngắn một vài giây đến vài phút, tốt hơn là hơi nước nóng 70-130°C trong 10-30 phút, và tốt nhất là hơi nước nóng 80-121°C trong 10-30 phút.

Nếu nhiệt độ của quá trình xử lý nhiệt thấp hoặc thời gian xử lý ngắn, thì hiệu quả khử trùng đối với các loại mầm bệnh khác nhau không đạt được hoặc quá trình lên men sau đó không thuận lợi. Nếu nhiệt độ của quá trình xử lý nhiệt cao hoặc thời gian xử lý dài, thì sự biến tính protein xảy ra trong bã đậu nành làm giảm tỉ lệ tiêu hóa, dẫn đến làm

giảm chất lượng của sản phẩm cuối cùng. Do đó, tốt nhất là nhiệt độ và thời gian của quá trình xử lý nhiệt được áp dụng trong phạm vi chấp nhận được để tránh những vấn đề hạn chế nêu trên.

Thông qua xử lý nhiệt, có thể hy vọng rằng các yếu tố gây ô nhiễm trong bã đậu nành hầu như được loại bỏ hoàn toàn, môi trường hóa học thích hợp cho sự lên men rắn sau đó được tạo thành, và các yếu tố phản dinh dưỡng như TI ức chế tỉ lệ tiêu hóa được giảm nhẹ.

Bước b) là bước làm mát bã đậu nành đã xử lý nhiệt về nhiệt độ phù hợp cho lên men rắn, và tiếp đó cấy truyền chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G vào. Theo sáng chế, làm mát bã đậu nành thường được thực hiện sau khi xử lý nhiệt, trong đó quá trình làm mát có thể được thực hiện dễ dàng thông qua quá trình vận chuyển bằng cách sử dụng băng tải làm mát để tránh sự quá nhiệt và làm mát đồng nhất bằng cách tăng tốc độ làm mát.

Theo phương án thực hiện ưu tiên của sáng chế, bã đậu nành trong bước b) được làm mát về 30-50°C, tốt hơn là 35-45°C, và tốt nhất là 37°C.

Sau khi làm mát bã đậu nành đã xử lý nhiệt, tốt nhất là môi trường tiền nuôi cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế được cấy truyền một cách đồng nhất thẳng vào môi trường bã đậu nành đã chuẩn bị hoặc được pha loãng với nước khử trùng rồi cấy truyền vào bã đậu nành đã chuẩn bị.

Số lượng của chủng lên men được cấy truyền vào bã đậu nành đã xử lý nhiệt là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến lên men rắn bã đậu nành. Số lượng chủng lên men ngay sau khi cấy truyền vào bã đậu nành đã xử lý nhiệt tốt nhất là 1×10^5 - 1×10^9 CFU/g.

Nếu lượng cấy truyền ít hơn 1×10^5 CFU/g, thì chỉ cần một lượng nhỏ dịch lên men giống, nhưng có hạn chế là đòi hỏi nhiều thời gian cho lên men bã đậu nành để làm tăng thời gian lên men cần thiết cho sản xuất và có thể bị tạp nhiễm. Ngược lại, nếu lượng cấy truyền nhiều hơn 1×10^9 CFU/g, thì thời gian lên men có thể được làm giảm đáng kể, nhưng có nhược điểm là việc sản xuất vi sinh vật giống cho cấy truyền gặp rắc rối. Cụ thể là, vì hiệu suất lên men bị ảnh hưởng rất nhiều bởi đặc tính sinh trưởng của

chủng lên men và kiểu hệ thống lên men, nên tốt nhất là lượng cấy truyền được xác định phù hợp với đặc tính sinh trưởng của chủng trong bước sản xuất.

Bước c) là bước thu nhận bã đậu nành lên men bằng phương pháp lên men rắn bởi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G được cấy truyền trong bã đậu nành. Cụ thể, quá trình lên men được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống lên men cột nhồi.

Hệ thống lên men cột nhồi được chia thành nhiều kiểu như bồn lên men theo mẻ, bồn lên men kín, bồn lên men khuấy liên tục. Phương pháp theo sáng chế không bị giới hạn bởi kiểu lên men bất kỳ, miễn là nó có ích cho lên men rắn bã đậu nành. Tốt nhất là, kiểu lên men có thể được lựa chọn tùy thuộc vào quy mô sản xuất.

Theo phương án thực hiện ưu tiên của sáng chế, bã đậu nành đã cấy truyền chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G được đổ vào hệ thống lên men cột nhồi với độ dày 5-50 cm, và được lên men ở 20-50°C trong 12-72 giờ. Đồng thời, tốt hơn là cột nhồi bã đậu nành dày hơn, và lên men được thực hiện ở 30-45°C trong 12-48 giờ. Tốt nhất là, quá trình lên men được thực hiện ở 37°C trong 24 giờ.

Phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước sấy khô và nghiền bã đậu nành đã lên men ở nhiệt độ và độ ẩm thấp sau bước c).

Nước trong bã đậu nành bị bốc hơi một phần trong quá trình lên men, nhưng hàm lượng nước còn lại cao đáng kể, vào khoảng 20-50% (v/w) ngay sau khi lên men. Tuy nhiên, tốt nhất là hàm lượng nước cuối cùng của sản phẩm bã đậu nành lên men là 10-12% (v/w), và do đó quá trình sấy khô là cần thiết.

Khi quá trình lên men rắn được thực hiện bằng cách sử dụng chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế, bã đậu nành lên men ở trong điều kiện rất tốt, nhưng vẫn hình thành chút ít vón cục. Do đó, sau quá trình sấy khô, quá trình nghiền bã đậu nành lên men là cần thiết để tạo thành kích thước hạt đồng đều.

Quá trình sấy khô và quá trình nghiền có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Tuy nhiên, khi quá trình sấy khô được thực hiện quá mức ở nhiệt độ cao, thì một số vi khuẩn sống trong bã đậu nành lên men có thể bị giết chết, và do đó cần thực hiện quá trình sấy khô một cách thận trọng.

Tốt hơn là, quá trình sấy khô được thực hiện ở nhiệt độ thấp mà không giết chết vi khuẩn sống. Tốt nhất là, quá trình sấy khô được thực hiện với không khí nóng ở nhiệt độ và độ ẩm thấp. Trong quá trình nghiền, bã đậu nành lên men có thể được nghiền thành các kích thước khác nhau tùy thuộc vào mục đích sử dụng, và tốt nhất là được nghiền bằng máy nghiền búa.

Khi quá trình lên men rắn bã đậu nành được thực hiện bằng cách sử dụng chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo phương pháp được mô tả ở trên của sáng chế, các yếu tố phân dinh dưỡng khác nhau bao gồm TI trong bã đậu nành được làm giảm, tỉ lệ tiêu hóa và hấp thụ được cải nhờ sự thủy phân và quá trình chuyển hóa protein thành dạng phân tử thấp, và hàm lượng protein thô cũng được làm tăng, từ đó cải thiện giá trị tuyệt đối của thức ăn gia súc. Do đó, bã đậu nành lên men bởi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo phương pháp của sáng chế là thức ăn protein chất lượng cao, là nguồn thay thế có giá trị cho protein động vật trong chăn nuôi.

Theo mục tiêu tiếp theo, sáng chế đề xuất thành phần thức ăn gia súc có chứa bã đậu nành lên men được sản xuất bởi phương pháp trên.

Hàm lượng bã đậu nành lên men trong thành phần thức ăn theo sáng chế có thể được kiểm soát một cách thích đáng tùy thuộc vào loại và tuổi của vật nuôi được sử dụng, dạng sử dụng, hiệu quả mong muốn, v.v... Cụ thể là, hàm lượng có thể là 1-99% theo khối lượng, tốt hơn là 10-90% theo khối lượng, và tốt nhất là 20-80% theo khối lượng, nhưng hàm lượng theo sáng chế không bị giới hạn bởi các khoảng giá trị trên.

Để sử dụng, thành phần thức ăn gia súc của sáng chế có thể còn bao gồm hỗn hợp của một hay nhiều axit hữu cơ như axit xitric, axit fumaric, axit adipic, axit lactic, v.v...; photphat như kali photphat, natri photphat, polyphotphat, v.v...; chất chống oxy hóa tự nhiên như polypheno, catechin, tocopherol, vitamin C, chất chiết trà xanh, chitosan, axit tannic, v.v...; ngoài bã đậu nành lên men. Nếu cần thiết, các thành phần bổ sung điển hình khác như chất chống cúm, chất đệm, chất kháng khuẩn, v.v.. có thể được thêm vào. Hơn nữa, chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính hoặc bôi trơn có thể được bổ sung để công thức hóa hỗn hợp thành chế phẩm có thể tiêm dưới dạng dung dịch nước, dịch huyền phù, dịch nhũ tương, v.v..., viên nang, hạt nhỏ, hoặc viên nén.

Hơn nữa, thành phần thức ăn gia súc theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với nhiều thành phần phụ như axit amin, muối vô cơ, vitamin, chất chống oxy hóa, chất kháng nấm, chất kháng khuẩn, v.v..., thành phần bổ sung dinh dưỡng, chất kích thích sinh trưởng, chất kích thích tiêu hóa-hấp thụ, chất phòng bệnh, ngoài thành phần chính chứa thức ăn protein thực vật như bột nghiền hoặc tấm lúa mì, lúa mạch, ngô, v.v..., thức ăn protein thực vật như bột huyết, bột thịt, bột cá, v.v..., mỡ động vật và dầu thực vật.

Khi thành phần thức ăn gia súc theo sáng chế được sử dụng làm thành phần bổ sung vào thức ăn gia súc, thành phần thức ăn gia súc có thể được bổ sung chỉ riêng nó hoặc được sử dụng cùng với các thành phần khác theo phương pháp điển hình. Thành phần thức ăn gia súc có thể được bào chế thành dạng uống với công thức giải phóng ngay hoặc công thức giải phóng kéo dài, kết hợp với chất mang được dụng không độc. Chất mang ăn được có thể là tinh bột ngô, lactoza, sacaroza, hoặc propylen glycol. Chất mang rắn có thể ở dạng sử dụng như viên nén, bột, viên ngậm, v.v..., và chất mang lỏng có thể là dạng sử dụng như xi-rô, huyền phù lỏng, nhũ tương, dung dịch, v.v... Hơn nữa, thuốc uống có thể bao gồm chất bảo quản, chất bôi trơn, chất kích thích hòa tan, hoặc chất ổn định, các yếu tố khác để cải thiện bệnh viêm và hợp chất hữu ích để phòng ngừa virus.

Thành phần thức ăn theo sáng chế có thể được áp dụng cho chế độ ăn của động vật, tức là, thức ăn gia súc cho động vật bất kỳ bao gồm động vật có vú, gia cầm, cá và động vật giáp xác. Thành phần thức ăn theo sáng chế có thể được sử dụng cho các động vật có vú quan trọng trong thương mại như lợn, trâu, bò, dê, v.v..., động vật ở vườn thú như voi, lạc đà, v.v..., động vật nuôi như chó, mèo, v.v... Gia cầm quan trọng trong thương mại bao gồm gà, vịt, ngỗng, v.v..., cá và động vật giáp xác quan trọng trong thương mại như cá hồi và tôm cũng có thể được cho ăn bằng thức ăn theo sáng chế.

Thành phần thức ăn theo sáng chế có thể được trộn với lượng khoảng 10-500 g, tốt nhất là 10-100g/kg tùy thuộc vào khối lượng khô của thức ăn vật nuôi. Sau khi đảo trộn xong, thành phần thức ăn có thể được cung cấp dưới dạng cám hoặc có thể còn được nghiền, kéo giãn, hoặc tốt nhất là quá trình ép đùn.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G (KCCM11471P) theo sáng chế tốt về hoạt tính loại bỏ các yếu tố phản dinh dưỡng, về hoạt tính proteaza, và về hoạt tính kháng

kháng lại tác nhân gây bệnh, và được làm giảm tốc độ tiết chất nhầy trong quá trình lên men. Do đó, khi chủng được sử dụng làm vi khuẩn giống để thực hiện lên men rắn bã đậu nành, thì bã đậu nành lên men chất lượng cao với tỉ lệ tiêu hóa hấp thu được cải thiện và có hiệu quả làm thức ăn chăn nuôi có thể được sản xuất nhờ quá trình chuyển hóa thành phân tử thấp hóa thông qua thủy phân protein đậu nành và sự gia tăng hàm lượng protein thô, bất hoạt chất ức chế trypsin, hoặc làm giảm hàm lượng các yếu tố phân dinh dưỡng dưới dạng polysacarit không thể tiêu hóa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình minh họa kết quả thí nghiệm 1 tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính proteaza cao theo sáng chế;

Fig.2 minh họa kết quả đo hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng với hoạt tính proteaza cao được tuyển chọn trong thí nghiệm 1 kháng lại *E. Coli* và *Salmonella*;

Fig.3 là sơ đồ minh họa quy trình tuyển chọn chủng đột biến với tốc độ tiết chất nhầy được làm giảm từ chủng có hoạt tính proteaza cao theo sáng chế;

Fig.4 minh họa kết quả điện di gradien nồng độ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide) để phân tích hàm lượng γ -PGA trong quá trình lựa chọn các chủng đột biến theo sáng chế, trong đó:

Làn M: chỉ thị khối lượng phân tử

Làn 1: 1 g/l γ -PGA tiêu chuẩn

Làn 2: 0,5 g/l γ -PGA tiêu chuẩn

Làn 3: 0,25 g/l γ -PGA tiêu chuẩn

Làn 4: chủng CJ823

Làn 5: chủng đột biến U304

Làn 6: chủng đột biến U305

Làn 7: chủng đột biến U306

Làn 8: chủng đột biến U307;

Fig.5 là cây phát sinh loài minh họa mối quan hệ loài của chủng đột biến *Bacillus amyloliquefaciens* K2G được tuyển chọn theo quy trình nêu trên; và

Fig.6 minh họa kết quả điện di SDS-PAGE về mức độ thủy phân bã đậu nành lên men thu được từ quá trình lên men rắn nhờ chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế,

Làn M: chỉ thị khối lượng phân tử

Làn 1: nguyên liệu thô (bã đậu nành thô)

Làn 2: lên men bằng TP6 trong 20 giờ

Làn 3: lên men bằng K2G trong 16 giờ

Làn 4: lên men bằng K2G trong 20 giờ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thí nghiệm 1: Tuyển chọn chủng có hoạt tính proteaza cao

Để phân lập chủng có hoạt tính proteaza cao, tác giả sáng chế đã phân lập xấp xỉ 3000 loại vi sinh vật từ một loạt các món ăn truyền thống (kimchi, bột nhão đậu lên men, rượu dân gian truyền thống, nước mắm, v.v...), và trong số đó, khoảng 1300 chủng *Bacillus* được chấp nhận làm thức ăn chăn nuôi đã được phân lập (Hiệp hội thành phần thức ăn chăn nuôi Hàn Quốc, chế phẩm sinh học). Từ các chủng này, tác giả sáng chế định hướng tìm kiếm các chủng đa chức năng có mức độ biểu hiện hoạt tính proteaza cao, hoạt tính kháng khuẩn cao và tốc độ sinh trưởng nhanh.

Cụ thể hơn, việc tuyển chọn chủng có khả năng tổng hợp proteaza cao đã được thực hiện bằng cách so sánh kích thước vùng sáng được tạo thành do sự phân giải cơ chất sữa gầy (Difco, Mỹ) có nồng độ 2% (khối lượng/thể tích) trong môi trường thạch đĩa YM (cao nấm men 3,0 g, cao mạch nha 3,0 g, pepton 10,0 g, thạch agar 20,0 g) (Fig.1).

Chủng có hoạt tính proteaza cao đã tuyển chọn được cấy truyền vào môi trường TSB (cazein phân giải bằng enzym 17,0 g, bã đậu nành phân giải bằng enzym 3,0 g,

NaCl 5,0 g, K₂HPO₄ 2,5 g, dextroza 2,5 g, pH cuối cùng: $7,3 \pm 0,2$ ở 25°C) tương ứng, tiếp đó được nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 12 giờ. Mỗi 1,0 µl dịch nuôi cấy được nhỏ lên đĩa thạch YM chứa sữa gầy. Đĩa thạch được ủ ở 37°C trong 16 giờ và đường kính vòng sáng được tạo thành trên đĩa đã được đo.

Đồng thời, *Bacillus subtilis* TP6 (KFCC 11343P) vốn được sử dụng làm chủng lên men trong phương pháp thông thường để sản xuất bã đậu nành lên men bằng lên men rắn đã được sử dụng làm nhóm đối chứng (Bằng sáng chế có số công bố tại Hàn Quốc 10-2011-0027535).

Bảng 1

Tên chủng	Kí hiệu của chủng	Đường kính vùng sáng (mm)	Kí hiệu của chủng	Đường kính vùng sáng (mm)
<i>Bacillus</i> sp.	TP6	3,30	CJ823	6,23
	CJ361	5,46	CJ873	5,48
	CJ400	5,88	CJ924	5,69
	CJ434	5,34	CJ933	5,20
	CJ453	6,40	CJ957	4,98
	CJ457	6,10	CJ968	4,87
	CJ739	5,86	CJ974	5,00
	CJ759	5,43	-	-

Như được trình bày trên bảng 1, 14 chủng đã được tuyển chọn có khả năng tổng hợp proteaza cao, và tất cả các chủng này đều cho thấy hoạt tính proteaza cao hơn *Bacillus subtilis* TP6.

Thí nghiệm 2: Phân lập chủng có hoạt tính ức chế sự phát triển của tác nhân gây bệnh

Để phân lập chủng có khả năng ức chế sự sinh trưởng hoặc phát triển của *E. coli* và *Salmonella* - là các tác nhân gây bệnh tiêu biểu gây ngộ độc thức ăn trong chăn nuôi -

và phát triển sản phẩm không độc không chứa *Salmonella* bằng cách sử dụng chủng đã phân lập trong sản xuất bã đậu nành lên men, 14 chủng có năng lực tổng hợp proteaza cao đã phân lập trong thí nghiệm 1 đã được đưa vào để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn kháng lại tác nhân gây bệnh.

Hoạt tính kháng khuẩn kháng lại tác nhân gây bệnh được đánh giá bằng thử nghiệm khuếch tán bề mặt kháng lại *Salmonella typhimurium* (ATCC14028) và *E. coli* (KCCM11835).

Cụ thể hơn, 14 chủng vi khuẩn có năng lực tổng hợp proteaza cao đã được cấy truyền vào môi trường GYP (glucoza 10,0 g, cao nấm men 8,0 g, polypepton 2,0 g, pH 7,0) tương ứng, tiếp đó được nuôi cấy lỏng ở 37°C và lắc 180 vòng/phút trong 12 giờ. Mỗi 1,5 µl dịch nuôi cấy của chủng có khả năng tổng hợp proteaza cao được nhỏ lên đĩa thạch GYP (glucoza 10,0 g, cao nấm men 8,0 g, polypepton 2,0 g, thạch agar 15,0 g, pH 7,0) mà trong đó 1×10^5 CFU/ml *Salmonella typhimurium* ATCC14208 và *E. coli* ATCC11835 đã được bổ sung, tiếp đó nuôi cấy tĩnh ở 37°C trong 15 giờ. Kích thước vùng ức chế đã được tạo thành quanh khuẩn lạc của chủng có khả năng tổng hợp proteaza cao được nhỏ trên đĩa được đo để xác định hàm lượng hoạt tính. Kết quả được trình bày trên bảng 2 sau đây. Đồng thời, *Bacillus subtilis* TP6 đã được sử dụng làm nhóm đối chứng.

Bảng 2

Tên chủng	Kí hiệu của chủng	<i>E. coli</i> (KCCM11835)	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC14028)
<i>Bacillus</i> sp.	TP6	+	++
	CJ361	++	++
	CJ400	++	++
	CJ434	-	-
	CJ453	-	-
	CJ457	-	-

	CJ739	+++	++
	CJ759	-	-
	CJ823	++++	++++
	CJ873	-	-
	CJ924	+++	++
	CJ933	-	-
	CJ957	-	-
	CJ968	++	++
	CJ974	+++	+

Trên bảng 2, “-” hoặc “+” để xác định hàm lượng hoạt tính, dựa vào đường kính vùng ức chế của vi khuẩn sống, và “-” thể hiện không kháng khuẩn hoặc hoạt tính kháng khuẩn, “+” thể hiện đường kính vùng ức chế bằng 10,05 mm trở xuống, “++” thể hiện đường kính vùng ức chế bằng 10,05-14,05 mm, “+++” thể hiện đường kính vùng ức chế bằng 14,05-17,05 mm, “++++” thể hiện đường kính vùng ức chế bằng 17,05 mm trở lên.

Phổ kháng khuẩn của 14 chủng có khả năng tổng hợp proteaza cao kháng lại *Salmonella* và *E. coli* là tác nhân phổ biến nhất gây bệnh tiêu hóa trong chăn nuôi đã được kiểm tra. Kết quả là, CJ823 thể hiện khả năng kháng khuẩn tốt nhất. Chủng CJ823 đã tuyển chọn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao kháng lại *E. coli* (++++ so với +) và *Salmonella* (++++ so với +) khi so với nhóm đối chứng *Bacillus subtilis* TP6.

Thí nghiệm 3: Thử nghiệm ứng dụng bã đậu nành ức chế sự phát triển của *Salmonella*

Theo kết quả thí nghiệm 2, chủng CJ823 trên đĩa thạch đã cho thấy hoạt tính kháng khuẩn tốt kháng lại *Salmonella*. Tuy nhiên, thí nghiệm sau được thực hiện để xác nhận lại rằng chủng này có thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của *Salmonella* hay không trong thực tế quá trình lên men bã đậu nành.

Cụ thể là, cả CJ823 và *Salmonella typhimurium* ATCC14028 đều được cấy truyền vào bã đậu nành (độ ẩm 45%) đã được hấp ở 100°C trong 30 phút, ở mật độ tương

ứng $4,5 \times 10^7$ CFU/g và $1,0 \times 10^3$ CFU/g, và sự thay đổi số lượng tế bào đã được kiểm tra ở 37°C và độ ẩm không đổi trong 24 giờ. Đồng thời, chỉ riêng *Salmonella typhymurium* được cấy truyền vào bã đậu nành được sử dụng làm nhóm đối chứng. Hỗn hợp *Salmonella typhymurium* và *Bacillus subtilis* TP6 cũng được cấy truyền vào bã đậu nành được sử dụng làm nhóm đối chứng.

Chủng được cấy truyền, và một lượng bã đậu nành xác định trước được lấy ra trước khi lên men và sau khi lên men 12, 16 và 20 giờ. Bã đậu nành được hòa vào dung dịch NaCl 0,8% vô trùng, rồi tiếp đó mỗi 100 μl dịch này được cấy gạt lên đĩa thạch XLD (cao nấm men 3 g, lactoza 7,5 g, sacaroza 7,5 g, xyloza 3,5 g, L-lyzin 5g, sắt amoni xitrat 0,8 g, đỏ phenol 0,08 g, NaCl 5 g, natri deoxycholat 2,5 g, natri thiosunfat 6,8 g, thạch agar 13,5 g, pH cuối cùng: $7,4 \pm$ ở 25°C) để đếm số lượng khuẩn lạc *Salmonella typhymurium*, và kết quả được trình bày trên bảng 3 dưới đây.

Tỉ lệ giữa hai chủng được xác định với giả định rằng tình trạng nhiễm *Salmonella typhymurium* xảy ra trong suốt quá trình phát triển của chủng lên men chính CJ823 trên bã đậu nành hấp. Tỉ lệ ô nhiễm thực tế có thể khác nhau tùy thuộc vào điều kiện môi trường trong sản xuất bã đậu nành lên men.

Bảng 3

Thời gian lên men (giờ)	Số lượng <i>Salmonella typhymurium</i> ($\times 10/\text{g}$)		
	Riêng <i>Salmonella typhymurium</i>	<i>Salmonella typhymurium</i> + TP6	<i>Salmonella typhymurium</i> + CJ823
0	2330	2330	2330
12	13900	2400	2000
16	1200000	2300	50
20	3100000	2200	35

Như được trình bày trên bảng 3, nhóm đối chứng được cấy truyền với chỉ riêng *Salmonella typhymurium* tăng nhanh theo thời gian nuôi cấy, số vi khuẩn nhanh chóng tăng lên mức $3,1 \times 10^7$ CFU/g sau 20 giờ lên men. Ngược lại, nhóm đối chứng được cấy

truyền với hỗn hợp cùng *Bacillus subtilis* TP6, số lượng *Salmonella typhimurium* bị ức chế ở mức $2,2 \times 10^4$ CFU/g. Trong nhóm thí nghiệm được cấy truyền với hỗn hợp cùng CJ823 theo sáng chế, số lượng *Salmonella typhimurium* được làm giảm xuống mức $3,5 \times 10^2$ CFU/g.

Kết quả chỉ ra rằng chủng CJ823 theo sáng chế ức chế có hiệu quả sự sinh trưởng của *Salmonella* trong quá trình lên men thực tế, và do đó phù hợp để sản xuất bã đậu nành lên men chất lượng cao.

Thí nghiệm 4: Tuyển chọn chủng đột biến

Chủng CJ823 được tuyển chọn trong các thí nghiệm 1-3 tổng hợp proteaza nồng độ cao và thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt kháng lại tác nhân gây bệnh, nhưng cũng tiết chất nhầy dính do phản ứng polyme hóa levan tạo thành fructan (dạng polyme của fructoza) và polyglutamat có nguồn gốc từ đường và protein của đậu nành nguyên liệu bởi enzym được sản xuất trong suốt quá trình lên men. Tình trạng tạo thành quá nhiều chất nhầy trong quá trình sản xuất trên quy mô công nghiệp gây cản trở cho việc khuấy đảo, từ đó gây khó khăn cho việc kiểm soát lượng oxy hòa tan trong sản phẩm lên men, kiểm soát nhiệt độ, và vận chuyển.

Theo đó, tác giả sáng chế đã gây đột biến bằng tia UV đối với chủng CJ823, nhằm mục đích phát triển chủng đột biến sản xuất ít chất nhầy hơn trong khi duy trì hoặc cải thiện hoạt tính enzym/đặc tính sinh lý của nó. Quá trình tuyển chọn chủng đột biến như được minh họa trên Fig.3.

Trước hết, chủng CJ823 được cấy lên đĩa thạch TSB (casein phân giải bằng enzym 17,0 g, bã đậu nành phân giải bằng enzym 3,0 g, NaCl 5,0 g, K_2HPO_4 2,5 g, dextroza 2,5 g, pH cuối cùng: $7,3 \pm 0,2$ ở $25^\circ C$), tiếp đó được nuôi cấy ở $37^\circ C$ trong 12 giờ để hoạt hóa chủng.

Trong quá trình nuôi cấy, 1% huyền phù chứa vi sinh vật giống được cấy truyền vào môi trường TSB (casein phân giải bằng enzym 17,0 g, bã đậu nành phân giải bằng enzym 3,0 g, NaCl 5,0 g, K_2HPO_4 2,5 g, dextroza 2,5 g, pH cuối cùng: $7,3 \pm 0,2$ ở $25^\circ C$) được chuẩn bị trước, và được nuôi cấy lắc 180 vòng/phút ở $37^\circ C$. Sau khi nuôi cấy, dịch nuôi cấy được ly tâm ở $25^\circ C$ và 8000 vòng/phút trong 10 phút để tách tế bào và dịch nổi.

Chỉ tế bào được lấy và được rửa bằng dung dịch NaCl 0,8% vô trùng. Sau khi rửa, đột biến nhân tạo được thực hiện bằng cách chiếu bức xạ UV (254 nm) lên tế bào được thu hồi bằng cách sử dụng đèn UV (VIBER LOURMAT, 115V, 60Hz).

Tế bào được cấy lên môi trường thạch đĩa chọn lọc TSA chứa 2% sữa gầy (cazein phân giải bằng enzym 15 g, bã đậu nành phân giải bằng enzym 5 g, NaCl 5 g, pH cuối cùng: $7,3 \pm 0,2$ ở 25°C), và được nuôi cấy ở 37°C trong 20 giờ. Sau khi nuôi cấy, kích thước (đường kính, mm) vùng sáng được tạo thành sẽ được xác định bằng cách sử dụng thước kẹp (CD-20CPX, Mitutoyo, Kanagawa, Nhật Bản), và 16 chủng đột biến có hoạt tính phân giải protein cao được ưu tiên lựa chọn.

Tiếp đó, từng chủng đột biến đã lựa chọn được cấy truyền vào bã đậu nành đã xử lý nhiệt, và được nuôi cấy trong 20 giờ, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 25°C và 8000 vòng/phút trong 10 phút để tách tế bào và dịch nổi. Hàm lượng γ -PGA trong dịch nổi được xác định bằng cách cân khối lượng γ -PGA thu hồi được sau khi tách, tinh chế và đông khô theo phương pháp của Goto (Goto et al. Biosci Biotechnol. Biochem., 56 : 1031-1035, 1992).

Hoạt tính proteaza được tính toán theo phương pháp được mô tả trong thí nghiệm 1, và hàm lượng γ -PGA được đo bằng hai phương pháp phân tích định tính và định lượng sau đây.

Trước hết, để phân tích định tính hoạt tính γ -PGA, 40 μl dịch nổi đã tách được trộn với 10 μl dung dịch đệm nhuộm màu 5 $\times$, và tiếp đó tra vào gel polyamide-SDS gradien nồng độ 5%-20% để thực hiện điện di gradien nồng độ SDS-PAGE. Sau khi điện di, protein chuẩn được nhuộm bằng thuốc thử nhuộm màu coomassie, sau đó được khử màu. Tiếp đó, poly- γ -axit glutamic được nhuộm bằng xanh metylen để thực hiện phân tích định tính.

Như được minh họa trên Fig.4, poly- γ -axit glutamic được phát hiện trong dịch nổi của CJ823 (chủng bố mẹ) của lần 4, nhưng hoạt tính sản xuất polyme giảm đáng kể và hoạt tính proteaza cao đã được nhận thấy trong dịch nổi của chủng đột biến U304 của lần 5.

Trong khi đó, để phân tích định lượng hàm lượng γ -PGA, dịch nổi của sản phẩm lên men rắn được pha loãng với một lượng tương đương nước cất, tiếp đó hỗn hợp được ly tâm ở $20.000 \times g$ trong 20 phút. pH của dịch nổi thu được được điều chỉnh về 3,0 bằng cách sử dụng dung dịch HCl 6M, và được để ở 4°C trong một ngày. Sau đó, dịch nổi được ly tâm ở $25.000 \times g$ trong 30 phút, rồi tiếp đó tủa được thu hồi. Tủa được hòa tan hoàn toàn trong nước cất với tỉ lệ nước gấp 100-200 lần khối lượng tủa, và tiếp tục được ly tâm ở $25.000 \times g$ trong 30 phút để loại bỏ tạp chất. Muối được loại bỏ bằng cách thẩm tách ở 4°C trong một ngày. Sản phẩm được sấy đông khô để thu hồi γ -PGA, và kết quả được minh họa trên bảng 4 sau đây.

Bảng 4

Chủng đột biến	γ -PGA (g/l)	Proteaza (U/g)	Chủng đột biến	γ -PGA (g/l)	Proteaza (U/g)
TP6	1,61	150	U609	6,13	15
CJ823	25,36	450	U610	11,09	450
U101	11,19	330	U611	21,77	260
U102	13,36	220	U612	12,05	400
U103	14,83	320	U813	10,12	180
U304	4,96	500	U814	23,13	370
U305	24,50	400	U815	1,06	260
U306	16,70	280	U816	5,26	100
U307	5,52	120	U1019	13,01	400

Như được trình bày trên bảng 4, hầu hết các chủng đột biến cho thấy hàm lượng γ -PGA thấp hơn so với CJ823. Trong số đó, chủng đột biến U304 biểu hiện hoạt tính proteaza cao nhất và hàm lượng γ -PGA tương đối thấp, là chủng được lựa chọn cuối cùng. Cụ thể là, chủng đột biến U304 cho thấy hàm lượng γ -PGA thấp hơn và hoạt tính proteaza cao hơn ba lần trở lên so với nhóm đối chứng là chủng *Bacillus subtilis* TP6.

Chủng đột biến U304 được tuyển chọn cuối cùng được đặc trưng bởi khả năng tiết chất nhầy giảm do giảm đáng kể sự tạo thành các polyme như poly- γ -axit glutamic, trong khi duy trì đặc điểm của chủng bố mẹ, bao gồm khả năng tổng hợp proteaza nồng độ cao và hoạt tính kháng khuẩn tốt kháng lại các tác nhân gây bệnh.

Thí nghiệm 5: Xác định trình tự rARN 16S của chủng đột biến U304 (K2G) và phân tích phát sinh loài

Để xác định chủng đột biến U304 có khả năng sản xuất chất nhầy được làm giảm, chủng được cấy truyền vào đĩa thạch NA (thạch dinh dưỡng - Nutrient Agar) mới và được nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ. Khuẩn lạc tạo thành được pha loãng trong dung dịch NaCl 0,8% vô trùng, và tiếp đó được bơm vào thẻ ID BLC (công ty bioMNItext, Hazewood, Mỹ) gồm 63 loại môi trường khô và chất phản ứng sinh hóa, và kết quả được lưu trữ toàn bộ trong phần mềm VITEK 2 Compact mỗi 15 phút, và quá trình xác định được hoàn thành sau 14 giờ.

Mỗi đa năng để định danh vi khuẩn nhờ phân tích trình tự rARN 16S, 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') và 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') của trình tự định danh (SEQ ID) số 2 và 3 đã được sử dụng, và sau khi khuếch đại trình tự rARN 16S bằng PCR, 1.333 cặp bazơ nitơ (bp) chứa trình tự bazơ nitơ của 50-900 bp quan trọng trong định danh đã được dịch mã bằng cách sử dụng BigDye Terminator cycle v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems Inc., USA). Kết quả phân tích trình tự rARN 16S cho thấy chủng đột biến U304 có trình tự rARN 16S của SEQ ID số 1.

Sự tương đồng trình tự đã được xác định bằng chương trình tìm kiếm tương đồng Blast (National Center for Biotechnology Information - Trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học Mỹ) và vị trí được xác định trong cây phát sinh loài sau khi so sánh trình tự (Fig.5).

Bảng 5

Đặc tính	Kết quả	Đặc tính	Kết quả
β -Xylosidaza	+	D-Mannitol	+

L-Lyzin-arylamidaza	-	D-Mannoza	+
L-Aspartat arylamidaza	-	D-Melezitoza	-
Loxin arylamidaza	(+)	N-Axetyl-D-glucosamin	-
Phenylalanin arylamidaza	+	Palatinoza	(+)
L-Prolin arylamidaza	-	L-Rhamnoza	-
β -Galactosidaza	-	β -Glucosidaza	(+)
L-Pyrrolydonyl-arylamidaza	+	β -Mannosidaza	-
α -Galactosidaza	+	Phosphoryl cholin	-
Alanin arylamidaza	+	Pyruvat	+
Tyrosin arylamidaza	+	α -Glucosidaza	-
β -N-Axetyl-glucosaminidaza	(-)	D-Tagatoza	-
Ala-Phe-Pro arylamidaza	+	D-Trehaloza	(+)
Xyclodextrin	-	Insulin	-
D-Galactoza	-	D-Glucoza	(+)
Glycogen	-	D-Riboza	-
Myo-Inositol	-	Đồng hóa putresxin	-
Axit hoá metyl-A-D-glucopyranozit	+	Kháng kanamycin	(-)
Ellman	-	Kháng oleandomycin	-
Metyl-D-xylozit	-	Thủy phân esculin	+
α -Mannosidaza	-	Tetrazolium đỏ	-

Maltotrioza	-	Kháng plomixin_B	-
Glyxin arylamidaza	(-)		

Kết quả của 63 loại xét nghiệm sinh hóa đã được phân tích bởi phần mềm Vitec 2 Compact. Kết quả là, chủng được phân loại là *Bacillus subtilis/Bacillus amyloliquefaciens* với độ chính xác 98%. Như được minh họa trên Fig.5, kết quả phân tích phát sinh loài chỉ ra rằng chủng đột biến U304 có quan hệ họ hàng gần gũi nhất với chủng tiêu chuẩn, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42T (CP000560), và độ tương đồng trình tự rARN 16S là 99,92% (1332 bp/1333 bp).

Do đó, căn cứ vào các đặc điểm sinh hóa và kết quả phân tích phát sinh loài, chủng đột biến U304 theo sáng chế được đặt tên là *Bacillus amyloliquefaciens* K2G, và được đăng ký theo Hiệp ước Budapest tại Trung tâm giống vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào 7/11/2013 với số đăng ký KCCM11471P.

Thí nghiệm 6: Sự thay đổi hàm lượng protein thô theo thời gian lên men khi lên men bã đậu nành bằng cách sử dụng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G

Để kiểm tra sự thay đổi hàm lượng protein thô theo thời gian lên men khi lên men bã đậu nành bằng cách sử dụng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế, thí nghiệm sau được thực hiện.

Trước hết, 400 g bã đậu nành được chuẩn bị để có hàm lượng nước 45%, và được hấp ở 100°C trong 30 phút, tiếp đó được làm mát đến 40°C trở xuống. Tiếp theo, *Bacillus amyloliquefaciens* K2G được cấy lên đĩa thạch TSB (cazein phân giải bằng enzym 17,0 g, bã đậu nành phân giải bằng enzym 3,0 g, NaCl 5,0 g, K₂HPO₄ 2,5 g, dextroza 2,5 g, pH cuối cùng: 7,3 ± 0,2 ở 25°C), và được nuôi cấy ở 37°C trong 12 giờ để hoạt hóa chủng. Khoảng 2 vòng que cấy chủng đã hoạt hóa được hòa tạo huyền phù trong 9 ml dung dịch NaCl 0,8% vô trùng (pha loãng đến độ hấp thụ 0,2 ở bước sóng A_{660 nm}), và dịch huyền phù, và dịch huyền phù được sử dụng làm vi khuẩn giống. Trong nuôi cấy, dịch huyền phù chứa vi khuẩn giống được cấy truyền với tỉ lệ 1% vào 40 ml môi trường TSB (cazein phân giải bằng enzym 17,0 g, bã đậu nành phân giải bằng enzym 3,0 g, NaCl 5,0 g, K₂HPO₄ 2,5 g, dextroza 2,5 g, pH cuối cùng: 7,3 ± 0,2 ở 25°C) được chuẩn bị trước, và được nuôi cấy lắc 180 vòng/phút ở 37°C.

40 ml dịch nuôi cấy *Bacillus amyloliquefaciens* K2G được chuẩn bị để có hàm lượng nước 45%, được bổ sung vào bã đậu nành hấp, và được trộn đều, tiếp đó được nuôi cấy tĩnh ở 37°C và độ ẩm không đổi trong 20 giờ. Mẫu nuôi cấy được sấy trong máy sấy ở 60°C cho đến khi hàm lượng nước đạt đến 10% trở xuống, và sau đó hàm lượng protein thô trong từng mẫu được xác định bằng cách sử dụng hệ thống Kjeldahl (Kjtec 2100). Đồng thời, hàm lượng protein thô được xác định trước khi lên men và sau khi lên men 12 giờ, 16 giờ, và 20 giờ, và *Bacillus subtilis* TP6 được sử dụng làm nhóm đối chứng. Hàm lượng protein thô (% , điều chỉnh độ ẩm về 10%) xác định được trình bày trên bảng 6 dưới đây. Đồng thời, *Bacillus subtilis* TP6 được sử dụng làm nhóm đối chứng.

Bảng 6

Phân đoạn	TP6 (%, hiệu chỉnh về độ ẩm 10%)	K2G (%, hiệu chỉnh về độ ẩm 10%)
Bã đậu nành thô	50,86 ± 0,15	50,86 ± 0,15
Bột đậu nành hấp	50,91 ± 0,12	50,91 ± 0,12
0 giờ lên men	51,19 ± 0,38	51,19 ± 0,38
12 giờ lên men	54,21 ± 1,18	55,59 ± 0,66
16 giờ lên men	55,07 ± 0,79	56,46 ± 0,19
20 giờ lên men	55,86 ± 0,75	57,32 ± 0,28
24 giờ lên men	56,36 ± 0,80	58,02 ± 0,45

Như được minh họa trên bảng 6, nhờ quá trình lên men 24 giờ, bã đậu nành được lên men bởi *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế đã cho thấy hàm lượng protein thô tương đương hoặc cao hơn so với bã đậu nành được lên men bởi *Bacillus subtilis* TP6 vốn được biết đến là chủng lên men bã đậu nành thông thường.

Kết quả chỉ ra rằng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả trong sản xuất bã đậu nành lên men làm nguồn thức ăn protein chất lượng cao.

Thí nghiệm 7: Sự thay đổi hàm lượng TI theo thời gian lên men khi lên men bã đậu nành bằng cách sử dụng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G

Để xác định sự thay đổi hàm lượng TI theo thời gian lên men khi lên men bã đậu nành bằng cách sử dụng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế, thí nghiệm sau đã được thực hiện.

Cụ thể, như trong thí nghiệm 6, 400 g bã đậu nành đã được chuẩn bị để có hàm lượng nước 45%, và được hấp ở 100°C trong 30 phút, tiếp đó *Bacillus amyloliquefaciens* K2G được cấy truyền vào bã đậu nành hấp với mật độ $4,5 \times 10^7$ CFU/ml, tiếp đó được nuôi cấy ở 37°C và độ ẩm không đổi trong 24 giờ. Hàm lượng TI được xác định theo AACC-71-10 (Hiệp hội Mỹ của các nhà hóa học ngũ cốc, 1995) trước khi lên men và sau khi lên men 16 giờ, 20 giờ và 24 giờ, và hàm lượng TI (mg/g) đã xác định được trình bày trên bảng 7. Đồng thời, *Bacillus subtilis* TP6 được sử dụng làm nhóm đối chứng.

Bảng 7

Phân đoạn	TP6 (TI, mg/g)	K2G (TI, mg/g)
Bã đậu nành thô	4~5	4~5
Bột đậu nành hấp	2~2,5	2~2,5
16 giờ lên men	1,26	0,39
20 giờ lên men	0,53	0,00
24 giờ lên men	0,38	0,00

Như được trình bày trên bảng 7, bã đậu nành được lên men bởi *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế cho thấy hàm lượng TI là 0,39 mg/g sau 16 giờ lên men, tương ứng với hàm lượng TI trong bã đậu nành được lên men 24 giờ bởi *Bacillus*

subtilis TP6 vốn được biết đến là chủng lên men bã đậu nành thông thường, kết quả gợi ý rằng việc làm giảm các yếu tố phản dinh dưỡng có thể đạt được ở mức tương đương chỉ sau 16 giờ lên men sử dụng chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G.

Sáng chế đạt được kết quả tốt khi làm giảm thời gian lên men, từ đó làm tăng tốc độ sản xuất của hệ thống lên men để làm tăng số mẻ được sản xuất hàng năm, và do đó, khách hàng có thể được cung cấp bã đậu nành lên men chất lượng cao với giá rẻ hơn.

Thí nghiệm 8: Xác định độ thủy phân của protein đậu nành và khả năng hòa tan của nó trong KOH khi lên men bã đậu nành bằng cách sử dụng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G

Bã đậu nành là nguyên liệu thô nguồn gốc thực vật cho thức ăn chăn nuôi có hàm lượng protein cao, nhưng còn có hạn chế, cụ thể là đối với vật nuôi non, do các yếu tố phản dinh dưỡng và protein có tỉ lệ tiêu hóa và hấp thụ thấp. Phương pháp nhằm khắc phục hạn chế trên là chế biến protein thành dạng peptit thủy phân hoặc phân giải protein thành dạng phân tử thấp có thể tiêu hóa dễ dàng bằng cách lên men sử dụng vi sinh vật. *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế là chủng có khả năng tổng hợp proteaza cao, và do đó được mong đợi rằng protein đậu nành trong bã đậu nành lên men được sản xuất bằng cách sử dụng chủng này có thể được phân giải bởi proteaza mà nó tiết ra.

Để khẳng định điều này, trước tiên, độ thủy phân của bã đậu nành lên men theo sáng chế được xác định. Như trong thí nghiệm 6, 400 g bã đậu nành đã được chuẩn bị để có hàm lượng nước 45%, và được hấp ở 100°C trong 30 phút, rồi tiếp đó *Bacillus amyloliquefaciens* K2G được cấy truyền vào bã đậu nành hấp ở mật độ $4,5 \times 10^7$ CFU/ml, sau đó chủng được nuôi cấy ở 37°C và độ ẩm không đổi trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy thu được tiếp đó được ly tâm 8000 vòng/phút ở 25°C trong 10 phút để phân tách tế bào và dịch nổi. 40 µl dịch nổi đã tách được trộn với 10 µl dung dịch đệm nhuộm màu 5×, tiếp đó điện di SDS-PAGE (10%) được thực hiện để xác định độ di chuyển của các protein theo khối lượng phân tử. Sau khi điện di, gel polyamit được nhuộm bằng Coomassie Brilliant R250 để xác định vị trí và khối lượng phân tử của protein, và kết quả được minh họa trên Fig.6. Đồng thời, bã đậu nành thô và bã đậu nành lên men được chế biến bởi *Bacillus subtilis* TP6 được sử dụng làm nhóm đối chứng.

Như được minh họa trên Fig.6, kết quả cho thấy rằng bã đậu nành lên men được chế biến bởi *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế cho thấy mật độ protein cao ở khu vực khối lượng phân tử thấp, so với bã đậu nành thô và bã đậu nành lên men bởi chủng khác. Trên gel SDS-poliamit, băng cao hơn chỉ thị protein khối lượng phân tử cao, và băng thấp hơn chỉ thị protein khối lượng phân tử thấp. Kết quả cho thấy rằng trong trường hợp bã đậu nành có khối lượng phân tử như nhau, thì protein khối lượng phân tử cao trong bã đậu nành được lên men bởi *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế được thủy phân thành protein khối lượng phân tử thấp.

Theo các báo cáo trước đây, việc bổ sung vào chế độ ăn của gà thịt đã được thực hiện tăng gấp bốn lần bằng cách sử dụng bã đậu nành cho thấy độ hòa tan KOH là 80%, và bã đậu nành cho thấy độ hòa tan thấp hơn (55-68%). Kết quả là, khối lượng, sự hấp thụ thức ăn, và hiệu quả thức ăn của gà thịt được cho ăn bã đậu nành cho thấy độ hòa tan KOH thấp là thấp hơn đáng kể hoặc bị làm giảm so với thức ăn của gà thịt với bã đậu nành cho thấy độ hòa tan KOH là 80% (Theo Abulto et al. J. Appl. Poult. Res. 7:189-195, 1998b).

Do đó, độ hòa tan KOH của bã đậu nành lên men theo sáng chế đã được xác định theo phương pháp được trình bày trong tài liệu chuyên ngành (Parsons et al. J Anim Sci., 69: 2918-24, 1991). Tóm lại, 1,0 g bã đậu nành lên men chế biến được bổ sung dung dịch KOH 0,2% trong 20 phút, tiếp đó được lọc. Hàm lượng nitơ trong dịch lọc được xác định bằng cách sử dụng hệ thống Kjeldahl và được chuyển sang độ hòa tan. Kết quả được trình bày trên bảng 8.

Bảng 8

Phân đoạn	TP6 (KOH, %)	K2G (KOH, %)
Bã đậu nành thô	80,17 ± 2,38	80,17 ± 2,38
Bột đậu nành hấp	73,35 ± 3,32	73,35 ± 3,32
16 giờ lên men	78,38 ± 2,85	85,03 ± 3,07
24 giờ lên men	78,99 ± 3,01	85,20 ± 3,60

Như được trình bày trên bảng 8, độ hòa tan KOH của bã đậu nành hấp giảm từ 80% đến 70%, nhưng độ hòa tan KOH tăng đến 85% trong suốt quá trình lên men rắn bởi *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế. Kết quả gợi ý rằng KOH tăng do sự phân giải của protein đậu nành bởi proteaza được tiết ra từ *Bacillus amyloliquefaciens* K2G theo sáng chế.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G (KCCM11471P) theo sáng chế tốt về hoạt tính loại bỏ các yếu tố phản dinh dưỡng, hoạt tính proteaza, và hoạt tính kháng khuẩn kháng lại tác nhân gây bệnh, và làm giảm tiết chất nhầy trong quá trình lên men. Do đó, khi chủng theo sáng chế được sử dụng làm vi khuẩn giống để thực hiện lên men rắn bã đậu nành, thì bã đậu nành lên men có chất lượng cao với tỉ lệ tiêu hóa, hấp thụ được cải thiện và hiệu quả thức ăn có thể được sản xuất do quá trình chuyển hóa thành phân tử thấp hóa thông qua thủy phân protein đậu nành và bất hoạt chất ức chế trypsin, hoặc làm giảm hàm lượng các yếu tố phản dinh dưỡng như polysacarit không tiêu hóa được.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất bã đậu nành lên men bằng phương pháp lên men rắn, bao gồm bước cấy truyền chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với số đăng ký KCCM11471P vào bã đậu nành.

2. Phương pháp theo điểm 1, bao gồm các bước:

a) bổ sung nước vào bã đậu nành để thực hiện xử lý nhiệt;

b) làm mát bã đậu nành đã xử lý nhiệt, rồi cấy truyền chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với số đăng ký KCCM11471P vào; và

c) thu nhận bã đậu nành lên men bằng cách nuôi cấy rắn chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với số đăng ký KCCM11471P được cấy truyền trong bã đậu nành.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bã đậu nành bổ sung nước trong bước a) có hàm lượng nước bằng 30-80% (thể tích/khối lượng v/w).

4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bước xử lý nhiệt trong bước a) được thực hiện bằng cách làm nóng bã đậu nành đến nhiệt độ 70-130°C trong 10-30 phút.

5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bã đậu nành trong bước b) được làm mát về 30-50°C.

6. Phương pháp theo điểm 2, trong đó số lượng chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với số đăng ký KCCM11471P ngay sau khi cấy truyền ở bước b) là 1×10^5 - 1×10^9 CFU/g.

7. Phương pháp theo điểm 2, trong đó nuôi cấy rắn trong bước c) được thực hiện ở điều kiện 30-45°C trong 12-48 giờ.

8. Phương pháp theo điểm 2, còn bao gồm thêm bước sấy khô và nghiền bã đậu nành đã lên men thu được ở bước c).

9. Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với số đăng ký KCCM11471P.

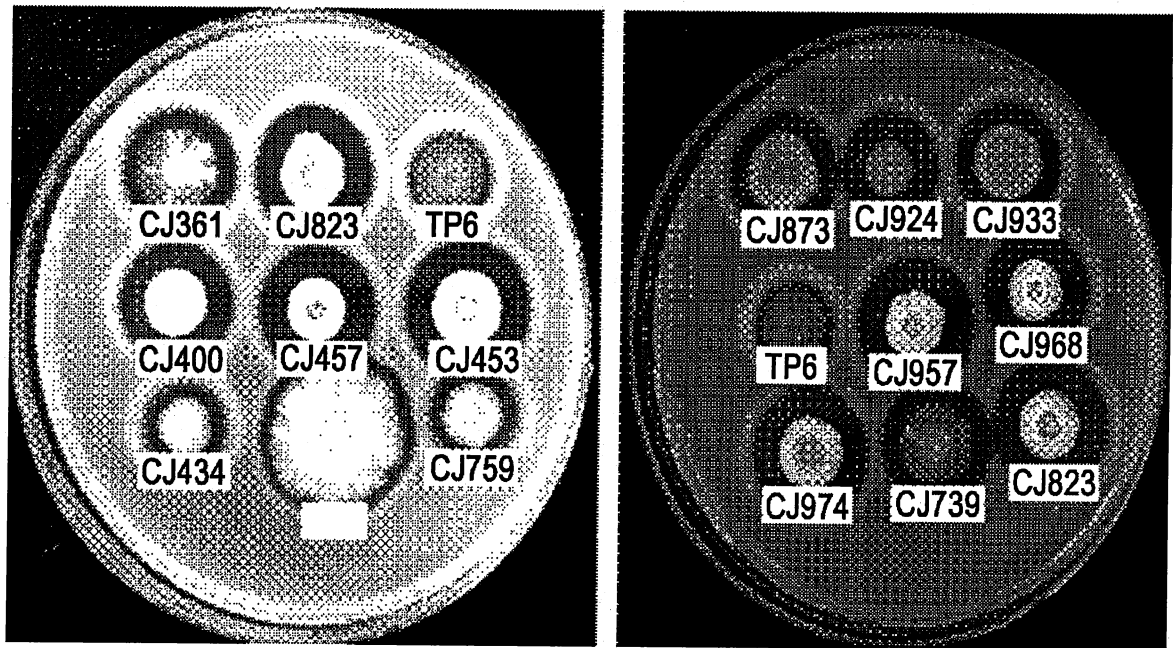
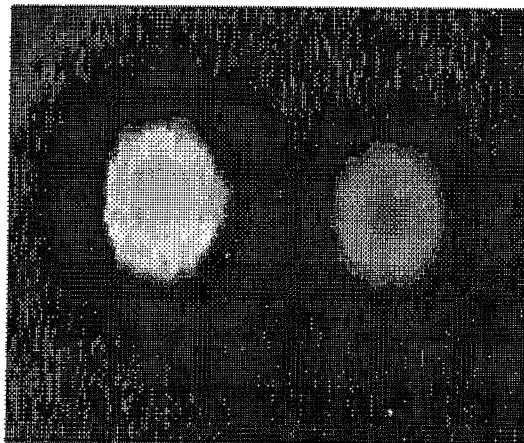


Fig.1

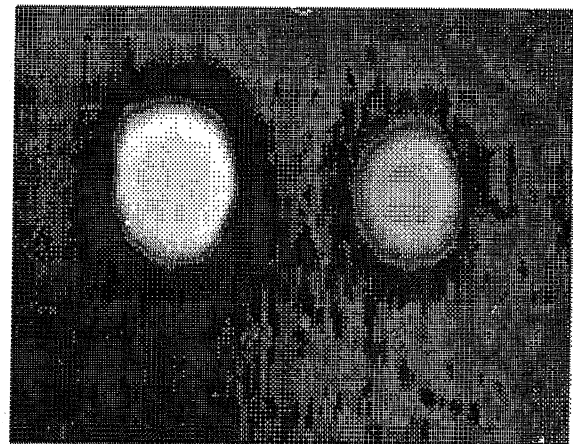
S. typhimurium (ATCC14028)



K2G

TP6

E. coli (KCCM11835)



K2G

TP6

Fig.2

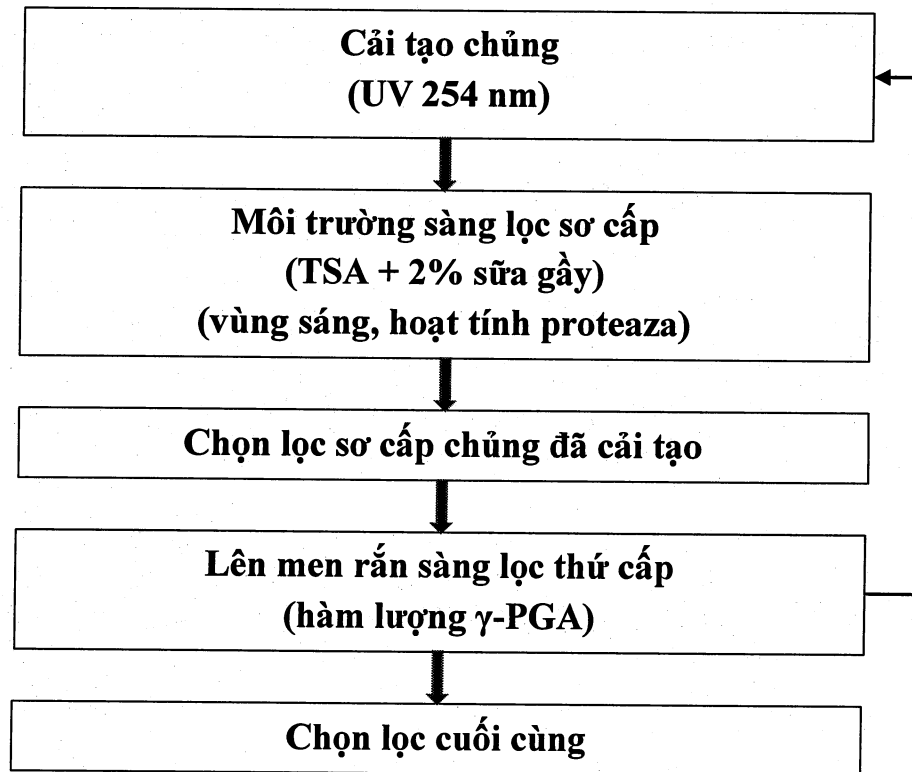


Fig.3

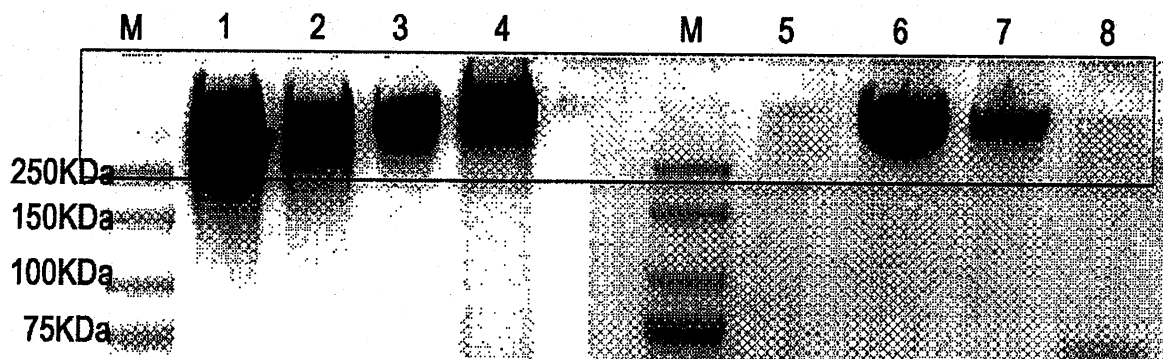


Fig.4

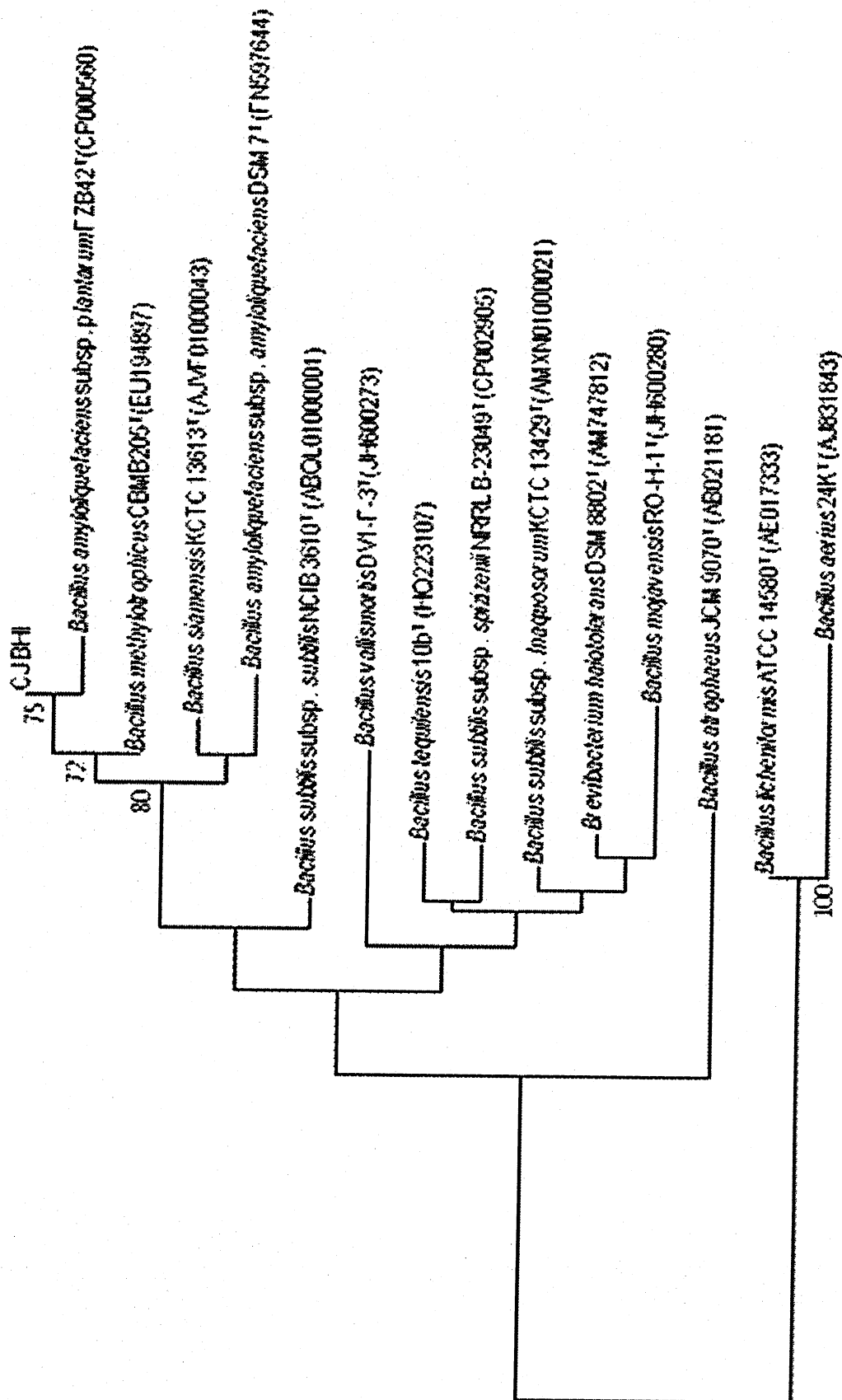


Fig.5

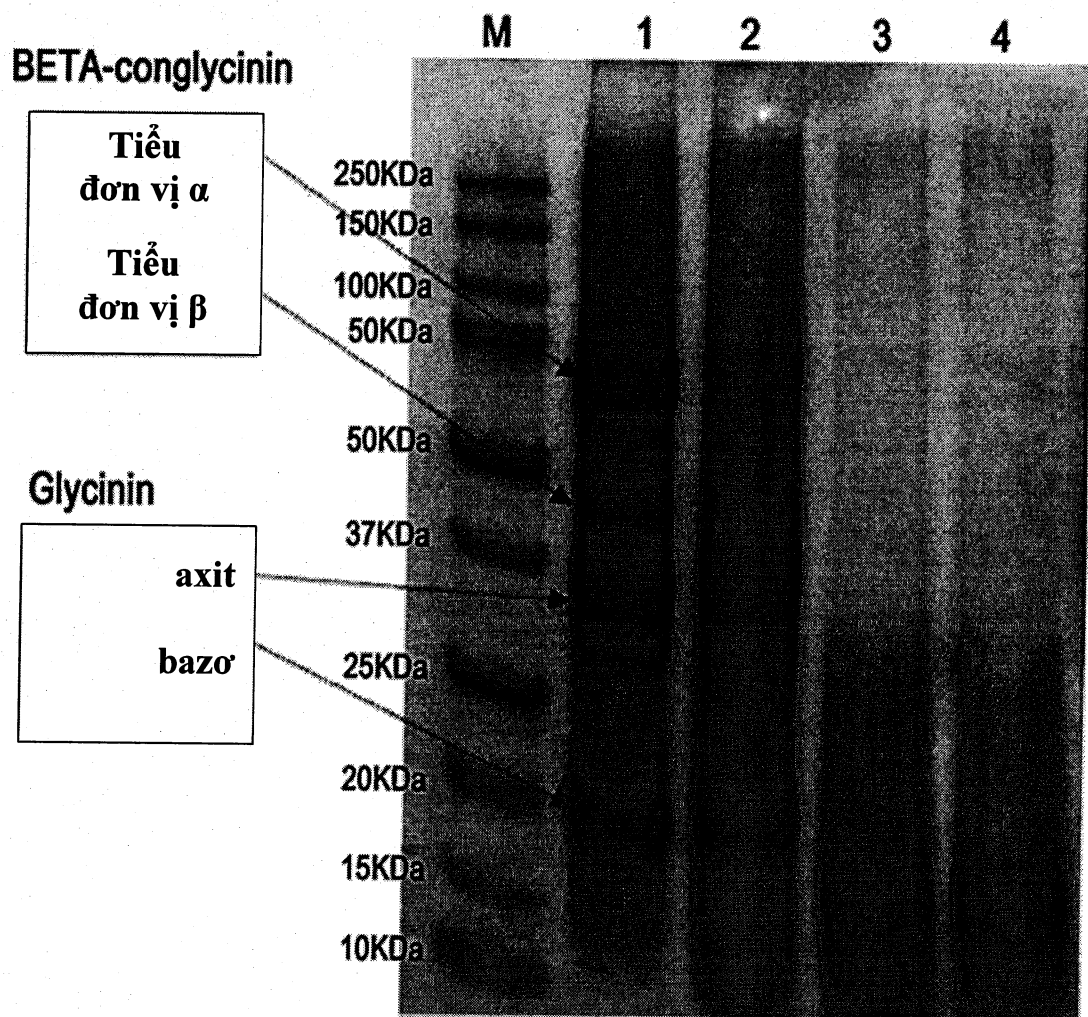


Fig.6