



(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)



1-0028837

(51)<sup>7</sup> C12N 1/20; A23K 1/16; C02F 3/34

(13) B

(21) 1-2014-03686

(22) 04/04/2013

(86) PCT/KR2013/002829 04/04/2013

(87) WO/2013/151364 10/10/2013

(30) 10-2012-0035434 05/04/2012 KR

(45) 25/07/2021 400

(43) 27/04/2015 325A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

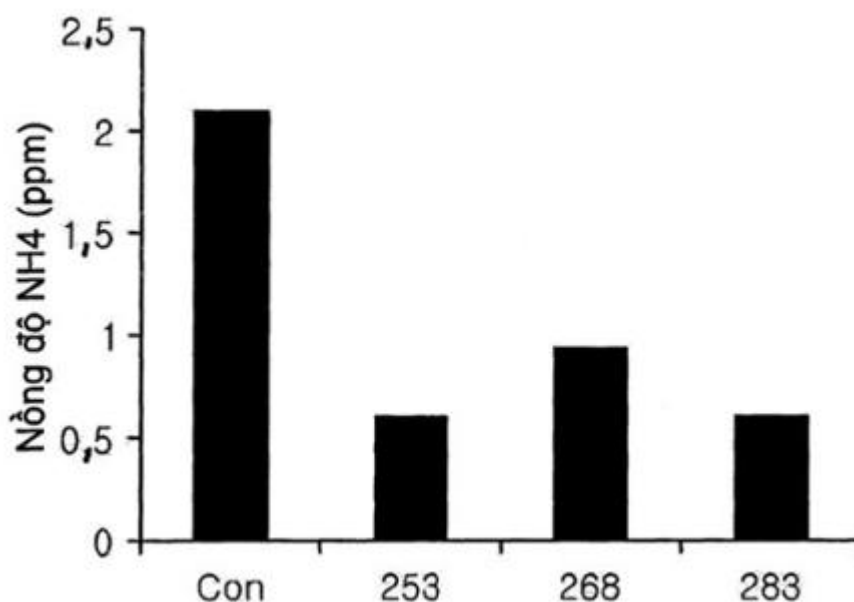
500, Namdaemunro 5-ga, Jung-gu, Seoul 100-749, Republic of Korea

(72) BACK, Seung Hee (KR); YANG, Si Yong (KR); WOO, Seo Hyung (KR); SEO, Hyo Seel (KR).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) CHỦNG *BACILLUS LICHENIFORMIS* CJMPB283 VÀ CHẾ PHẨM PROBIOTIC CHỨA CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề xuất chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 mới (số truy cập là KCCM11270P) tạo ra các enzym tiêu hóa và có khả năng oxy hóa amoniac và axit nitơ, sản phẩm nuôi cấy chủng này và chế phẩm probiotic chứa nó. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm probiotic nêu trên, chất lọc sạch nước chứa chủng *Bacillus licheniformis* nêu trên và phương pháp cải thiện chất lượng nước của trang trại cá.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề xuất chủng *Bacillus licheniformis* mới và chế phẩm probiotic chứa nó.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản đã trở thành một công cụ kinh tế quan trọng ở nhiều nước, và do đó, việc phát sinh các bệnh ở cá được nuôi có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển kinh tế (Joza Luis Balcazar *et al.*, *Veter.Microbio.*, 114(2006):173-186).

Nói chung, để điều trị bệnh sinh ra ở cá được nuôi và cải thiện chất lượng nước, thì đã sử dụng kháng sinh, chất chống vi trùng, hóa chất. Tuy nhiên, do việc sử dụng nó quá mức, nên đã tạo ra các vấn đề như tăng lượng vi khuẩn kháng thuốc, dư lượng trong cá được nuôi, ô nhiễm nước ở môi trường xung quanh, và tương tự, do đó việc sử dụng chúng bị hạn chế. Ngoài ra, mối quan tâm của mọi người là liệu có hay không sử dụng kháng sinh trong việc nuôi trồng thủy sản đã tăng lên, thì vật liệu thay thế như axit hữu cơ, các probiotic, chất kích thích miễn dịch không đặc hiệu, vật liệu tự nhiên, hoặc tương tự, đã được phát triển cấp bách để về cơ bản ngăn chặn kháng sinh (Fish Disease Diagnosis and Treatment Countermeasures, Bộ đại dương và thủy sản, 2001).

Các probiotic được thêm vào thức ăn chăn nuôi hoặc nguồn nước đầu vào của ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản. Gần đây, nghiên cứu về hiệu quả của việc kích thích miễn dịch chống lại tác nhân gây bệnh và cải thiện chất lượng nước để làm giảm bớt bệnh bằng cách cung cấp các probiotic cho cá được nuôi và tôm đã được tiến hành tích cực (Jiqiu Li *et al.*, *Aquaculture* 291(2009) 35-40).

Thuật ngữ “probiotic”, mà có ý nghĩa từ nguyên trái với kháng sinh, được định nghĩa là vật liệu vi sinh vật hoặc thành phần vi sinh vật hỗ trợ sự cân bằng của hệ vi sinh đường ruột. Vi khuẩn axit lactic như *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, và tương tự, là điển hình.

*Bacillus* được sử dụng như các probiotic, mà là *Bacillus* gram âm, tạo thành các nội bào tử và có hình dạng đơn nhất trong số vi khuẩn được dùng như các probiotic. *Bacillus* có khả năng chịu nhiệt tuyệt vời so với *Lactobacillus* mà không tạo thành các nội bào tử. Ngoài ra, do *Bacillus* có thể sống ở độ pH thấp của thành dạ dày, nên hầu hết các *Bacillus* được sử dụng có thể đến ruột non (Barbosa, T.M, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2005)968-978; Spinosa, M, R, *et al.*, *Res. Microbiol.*, 151(2000) 361-368).

Tài liệu kỹ thuật ưu tiên đề cập đến nguyên liệu và vi khuẩn được sử dụng để cải thiện chất lượng nước, phương pháp ngăn chặn hoặc làm giảm bớt sự tích lũy nitrit trong môi trường nước bằng cách sử dụng vi khuẩn oxy hóa nitrit đã được bộc lộ trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent đang xét nghiệm Hàn quốc số 2007-0036016. Vi khuẩn oxy hóa nitrit nghĩa là *Nitrococcus* và *Nitrospira*. Ngoài ra, phương pháp loại bỏ cacbon và vật liệu ô nhiễm nito từ nước thải bằng cách sử dụng vi khuẩn oxy hóa amoniac dị dưỡng - đã được bộc lộ trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent đang xét nghiệm Hàn quốc số 2010-0040960, và vi khuẩn oxy hóa amoniac dị dưỡng nghĩa là *Bacillus pseudofimus* NH-2 và *Arthrobacter globiformis* WR-2. Tuy nhiên, do *Nitrococcus* và *Nitrospira* đã được bộc lộ trong các tài liệu không phải là chủng được cấp giấy phép GRAS (nói chung được công nhận là an toàn), không thể sử dụng *Nitrococcus* và *Nitrospira* như các probiotic. Hơn nữa, do *Nitrococcus* và *Nitrospira* thuộc nhóm vi khuẩn *archaebacteria*, nên việc sản xuất nó là rất khó khăn, vì thế không thể sử dụng *Nitrococcus* và *Nitrospira* trong công nghiệp. Ngoài ra, *Bacillus pseudofimus* NH-2 đã được biết đến như một chủng được cấp GRAS mà không được

đăng ký như probiotic.

Các tác giả của sáng chế đã phân lập chủng có hoạt tính enzym tiêu hóa và oxy hóa amoniac và axit nitơ từ bột nhão đậu tương, mà là thực phẩm Hàn quốc truyền thống được lên men, và xác định các tính chất hình thái, sinh hóa, và di truyền của chủng này, qua đó hoàn thành sáng chế.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 mới tạo ra enzym tiêu hóa và có khả năng oxy hóa amoniac và axit nitơ.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất sản phẩm nuôi cấy chứa dung dịch nuôi cấy chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ đó.

Hơn nữa, theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm probiotic chứa *Bacillus licheniformis* CJMPB283 hoặc sản phẩm nuôi cấy nó.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm probiotic này.

Ngoài ra, theo một phương án, sáng chế đề xuất chất lọc sạch nước cho ngành nuôi trồng thủy sản, chứa *Bacillus licheniformis* CJMPB283, dung dịch nuôi cấy nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ đó.

Hơn nữa, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện chất lượng nước của trang trại cá bằng cách phun chất lọc sạch nước vào trang trại cá trước hoặc trong quá trình xử lý trang trại.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

FIG. 1 là biểu đồ thể hiện các kết quả thu được bằng việc đánh giá số lượng lượng tiêu thụ amoniac của các chủng phân lập được đầu tiên theo sáng chế trong môi trường chứa amoniac.

FIG. 2 là biểu đồ thể hiện các kết quả thu được bằng việc đánh giá số lượng

lượng tiêu thụ axit nitơ của các chủng phân lập được đầu tiên theo sáng chế trong môi trường chứa axit nitơ.

FIG. 3 là biểu đồ thể hiện các kết quả thu được bằng việc đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng phân lập được lần hai theo sáng chế trong các điều kiện kỵ khí tùy ý và kỵ khí.

FIG. 4 là biểu đồ thể hiện các kết quả thu được bằng việc đánh giá tính kháng muối của các chủng phân lập được lần hai theo sáng chế,

FIG. 5 là biểu đồ thể hiện các kết quả thu được bằng việc đánh giá hiệu quả làm giảm amoniac của chủng phân lập lần hai theo sáng chế, phụ thuộc vào việc đánh giá sự cải thiện chất lượng nước trong bể nước của cá bẹt con.

FIG. 6 là ảnh hiển vi điện tử của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283, mà là chủng phân lập được cuối cùng theo sáng chế.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 mới tạo ra enzym tiêu hóa và có khả năng oxy hóa amoniac và axit nitơ.

Cụ thể, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 theo sáng chế được phân lập từ đậu tương lên men, mà là thực phẩm truyền thống của Hàn quốc. Các đặc tính hình thái của chủng theo sáng chế là, chủng là *Bacillus* Gram dương (FIG. 6) và có trình tự 16s rADN nucleotit được nêu bởi SEQ ID No: 1. Kết quả của việc phân tích trình tự nucleotit là, chủng có mức độ tương đồng 97% với *Bacillus licheniformis*. Do đó, các tác giả của sáng chế đã lưu giữ chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 mới ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc (Korea Culture Center of Microorganisms) (361-221, Hongje 1-dong, Seodamun-gu, Seoul), và được gán số truy cập KCCM11270P vào ngày 22 tháng 3 năm 2012.

Cụ thể, chủng được tạo thành từ đậu tương lên men trong quá trình đóng rắn trong 40 ngày, mà là thực phẩm truyền thống của Hàn quốc, và được phân lập trong

môi trường thạch truyền tim não (brain heart infusion - BHI). Chúng phân lập được có hoạt tính tuyệt vời của enzym tiêu hóa như amylaza, xenlulaza, và proteaza và có tính chất oxy hóa amoniac và axit nitơ. Ngoài ra, do chúng có thể sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí tùy ý và yếm khí và có tính đề kháng muối chống lại natri clorua 10%, nên chúng có thể sinh trưởng trong môi trường có chất lượng nước khác nhau. Ngoài ra, công suất lọc nước đã được đánh giá trên cá bet con, và kết quả là, hiệu quả kiểm soát amoniac trong bể nuôi cá bet là tuyệt vời, và tỷ lệ tử vong thấp.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất sản phẩm nuôi cấy chứa dung dịch nuôi cấy của chủng phân lập được mới theo sáng chế, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ đó.

Chủng phân lập được mới theo sáng chế có thể được nuôi cấy bằng phương pháp chung cho chủng *Bacillus*. Có thể sử dụng môi trường tự nhiên hoặc môi trường tổng hợp làm môi trường. Nguồn cacbon của môi trường, ví dụ, glucoza, sucroza, dextrin, glyxerol, tinh bột, hoặc tương tự, có thể được sử dụng, và nguồn nitơ, pepton, dịch chiết thịt, dịch chiết nấm men, men khô, đậu tương, muối amoni, nitrat, hợp chất chứa nitơ hữu cơ hoặc vô cơ khác có thể được sử dụng. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đó. Để làm muối vô cơ chứa trong môi trường, có thể sử dụng magie, mangan, canxi, sắt, phospho, hoặc tương tự, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ngoài nguồn cacbon, thì nguồn nitơ, và muối vô cơ, axit amin, vitamin, axit nucleic, và các hợp chất có liên quan với chúng, có thể được thêm vào môi trường. Chủng phân lập được mới theo sáng chế có thể được nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C trong từ 12 giờ đến 4 ngày.

Cụ thể, dung dịch nuôi cấy của chủng phân lập được mới có thể là dung dịch nuôi cấy chứa tế bào vi khuẩn, hoặc tế bào vi khuẩn thu được bằng cách loại bỏ chất nổi bề mặt trên dịch nuôi cấy hoặc cô đặc dung dịch nuôi cấy. Chế phẩm dung dịch nuôi cấy có thể chứa thêm các thành phần có tác dụng hiệp lực trên sự sinh trưởng

*Bacillus* cũng như các thành phần cần cho việc nuôi cấy chung *Bacillus*. Do đó, chế phẩm này có thể dễ được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Ngoài ra, chúng có thể ở trạng thái lỏng hoặc trạng thái khô. Phương pháp làm khô có thể sử dụng là phương pháp sấy khí, phương pháp làm khô tự nhiên, phương pháp sấy phun, và phương pháp sấy đông khô. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm probiotic chứa chủng phân lập được mới theo sáng chế hoặc sản phẩm nuôi cấy nó.

Các probiotic nằm ở thành đường tiêu hóa để ngăn cản vi khuẩn có hại định cư và ức chế vi khuẩn gây bệnh nhân lên. Ngoài ra, enzym tiêu hóa có lợi được tạo ra bởi các probiotic hỗ trợ hấp thụ và sử dụng chất dinh dưỡng, do đó cải thiện hiệu quả của thức ăn.

Chế phẩm probiotic theo sáng chế có thể chứa *Bacillus licheniformis* CJMPB283 với lượng nằm trong khoảng từ  $5 \times 10^4$  CFU/ml đến  $5 \times 10^{10}$  CFU/ml, cụ thể, nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^6$  CFU/ml đến  $1 \times 10^9$  CFU/ml.

Chế phẩm probiotic theo sáng chế có thể còn chứa chất mang được dụng và được bào chế cùng với chất mang, do đó được tạo ra như thức ăn và chất phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Thuật ngữ “chất mang được dụng” được sử dụng ở đây là chất mang hoặc chất pha loãng mà không kích thích sinh vật sống cũng không ức chế hoạt tính sinh học và tính chất của hợp chất được dùng. Chất mang được dụng, mà được tiết trùng hoặc thích hợp cho cơ thể sống, ở dạng chế phẩm lỏng của các probiotic, dung dịch muối đẳng trương, nước vô trùng, nước muối đậm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, và hỗn hợp của ít nhất một trong số đó có thể được sử dụng. Hơn nữa, nếu cần, các chất phụ trợ nói chung khác như chất chống oxy hóa, dung dịch đậm, chất kháng khuẩn, hoặc tương tự, có thể được thêm vào.

Ngoài ra, chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính, và chất bôi trơn được bổ sung thêm vào đó, để chế phẩm probiotic có thể được bào chế thành dạng tiêm như dung dịch nước, hỗn dịch, nhũ tương, hoặc tương tự, viên tròn, viên nang, hạt, hoặc viên nén. Trong sáng chế, chất kết dính, chất nhũ hóa, chất bảo quản, và tương tự, có thể được thêm để vẫn giữ chất lượng của chế phẩm probiotic. Có thể thêm vào axit amin, vitamin, enzym, chất tạo mùi vị, hợp chất nitơ không phải protein, silicat, chất đệm, chất dùng để chiết, oligosacarit, và tương tự, để làm tăng hiệu quả của chế phẩm probiotic. Ngoài ra, chế phẩm probiotic có thể còn chứa hỗn hợp thức ăn chăn nuôi, hoặc tương tự, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ của dược phẩm dùng qua đường miệng chứa các probiotic làm hoạt chất, là viên nén, viên ngậm, viên hình thoi, hỗn dịch nước hoặc dầu, bột đã bào chế hoặc hạt, nhũ tương, và viên nang mềm. Để bào chế các probiotic thành viên nén, viên nang, hoặc tương tự, dược phẩm có thể còn chứa chất kết dính như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xeluloza, hoặc gelatin, tá dược như đicacxi phosphat, chất làm tan rã như tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang, chất bôi trơn như magiê stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, hoặc sáp polyetylen glycol. Trong trường hợp của dược phẩm dạng viên nang, dược phẩm có thể còn chứa chất mang lỏng như dầu béo.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm probiotic làm hoạt chất.

Thông thường, *Bacillus* tạo thành các nội bào tử, do đó bền đáng kể với nhiệt. Do đó, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 được phân lập mới có thể được bào chế ở dạng chất phụ gia thức ăn chăn nuôi và sau đó trộn với thức ăn chăn nuôi, hoặc thêm trực tiếp vào thức ăn chăn nuôi. Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 được chứa trong thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể ở trạng thái lỏng hoặc trạng thái khô, và cụ thể, ở dạng bột khô. Có thể sử dụng phương pháp làm khô, phương pháp

sấy khí, phương pháp làm khô tự nhiên, phương pháp sấy phun, và phương pháp sấy đông khô, nhưng không bị giới hạn ở đó. Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 theo sáng chế có thể được trộn vào dạng bột với tỷ lệ hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05% trọng lượng đến 10% trọng lượng, cụ thể nằm trong khoảng từ 0,1% trọng lượng đến 1% trọng lượng tính theo trọng lượng của thức ăn chăn nuôi. Ngoài ra, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi cho nuôi trồng thủy sản có thể còn chứa các chất phụ nói chung có khả năng cải thiện khả năng bảo quản của thức ăn chăn nuôi.

Trong sáng chế, ví dụ của thức ăn chăn nuôi có thể bao gồm thức ăn chăn nuôi thực vật như hạt, rễ và quả, sản phẩm phụ của quá trình chế biến thực phẩm, tảo, chất xơ, chất béo, tinh bột, họ bầu bí, sản phẩm phụ ngũ cốc, hoặc tương tự, và thức ăn chăn nuôi động vật như protein, vật liệu vô cơ, chất béo, chất khoáng, protein tế bào đơn, sinh vật phù du động vật, bột cá, hoặc tương tự, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi cho nuôi trồng thủy sản theo sáng chế có thể được ngâm, phun, hoặc trộn vào, nhờ đó được thêm vào thức ăn chăn nuôi để nuôi trồng thủy sản và sau đó được sử dụng. Các loài cá, được cho ăn thức ăn chăn nuôi chứa chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế, có thể bao gồm cá được nuôi hoặc động vật giáp xác, và cụ thể hơn, cá bẹ, cá tráp biển, tôm, cá rô phi, cá hồi, lươn, cá hồi, hoặc tương tự, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Trong chế phẩm thức ăn chăn nuôi để nuôi trồng thủy sản chứa chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế, thì chất phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được trộn vào với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05% trọng lượng đến 0,5% trọng lượng tính theo trọng lượng khô của thức ăn chăn nuôi động vật.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất lọc sạch nước để nuôi trồng thủy sản, chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 làm hoạt chất, và phương pháp cải thiện chất lượng nước của trang trại cá bằng cách phun chất lọc sạch nước trước hoặc trong khi nuôi ở trang trại cá.

Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 được phân lập mới theo sáng chế có thể được sử dụng để làm giảm hàm lượng amoniac và axit nitơ có trong môi trường nuôi trồng thủy sản.

Các loài cá, mà chất lọc sạch nước theo sáng chế có thể được sử dụng ở trang trại cá, có thể bao gồm cá hoặc động vật giáp xác, cụ thể, cá bết, cá tráp biển, tôm, tilapias, cá hồi, lươn, cá hồi, hoặc tương tự, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Để làm chất lọc sạch nước theo sáng chế, thì chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 được phân lập mới có thể được bào chế ở dạng chất lọc sạch nước, hoặc chủng và/hoặc chế phẩm probiotic có thể được phun trực tiếp. Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 trong chất lọc sạch nước theo sáng chế có thể ở dạng lỏng hoặc trạng thái khô, và cụ thể, ở dạng bột khô. Để làm phương pháp làm khô, có thể sử dụng phương pháp sấy khí, phương pháp làm khô tự nhiên, phương pháp sấy phun, và phương pháp sấy đông khô, nhưng không bị giới hạn ở đó. Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 theo sáng chế có thể được trộn vào dạng bột với tỷ lệ hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05% trọng lượng đến 10% trọng lượng, cụ thể nằm trong khoảng từ 0,1% trọng lượng đến 1% trọng lượng tính trên trọng lượng thức ăn chăn nuôi.

Để làm chất mang chấp nhận được, mà được tiết trùng hoặc thích hợp cho cơ thể sống, trong chất lọc sạch nước, có thể được sử dụng dung dịch muối đẳng trương, nước vô trùng, nước muối đậm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, và hỗn hợp của ít nhất một trong số đó. Ngoài ra, nếu cần, các chất phụ nói chung khác như chất chống oxy hóa, dung dịch đậm, chất kháng khuẩn, hoặc tương tự, có thể được thêm vào. Ngoài ra, chất pha loãng, chất làm phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính, và chất bôi trơn cũng được thêm vào đó, để chế phẩm probiotic có thể được bào chế thành dạng tiêm như dung dịch nước, hỗn dịch, nhũ tương, hoặc tương tự, viên tròn, viên nang, hạt, hoặc viên nén.

### Lợi ích của sáng chế

Theo sáng chế, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 được phân lập mới có thể có hoạt tính tuyệt vời của enzym tiêu hóa như amylaza, xenlulaza, và proteaza và khả năng oxy hóa tuyệt vời với amoniac và axit nitơ, để chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 được phân lập mới có thể cải thiện chất lượng nước trong khi nuôi cá và tôm.

Do đó, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 mới có thể được sử dụng làm chất lọc sạch nước cũng như các probiotic,

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể qua các Ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ minh họa sáng chế, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các Ví dụ này.

#### Ví dụ 1: Phân lập chủng oxy hóa amoniac và axit nitơ

##### (1) Bào chế mẫu và phân lập chủng

Các chủng có nguồn gốc từ các sản phẩm đậu tương lên men tốt như bột nhão đậu tương, đậu tương lên men, nước tương, hoặc tương tự, mà là thực phẩm truyền thống của Hàn quốc được phân lập làm mẫu. Các mẫu được lan truyền trên môi trường thạch BHI (Difco, Mỹ) với dung dịch NaCl 3% và sau đó nuôi cấy ở 37<sup>0</sup> trong 24 giờ. Các chủng phân lập được từ mỗi mẫu được nhóm tùy theo các kết quả thu được bằng cách quan sát các khuẩn lạc. Khuẩn lạc được phân lập được tái phân lập bằng phương pháp truyền và nuôi cấy khuẩn lạc chọn lọc trong môi trường mới ba lần, và các chủng nuôi cấy tinh khiết được đặt vào môi trường chứa 20% glyxerol và bảo quản ở -70<sup>0</sup> hoặc nhỏ hơn.

##### (2) Đánh giá sự oxy hóa amoniac và axit nitơ

Để phân lập chủ yếu các chủng oxy hóa amoniac và axit nitơ, mà là nguyên nhân chính gây ô nhiễm nguồn nước, sự oxy hóa amoniac và axit nitơ được đánh giá.

Để đánh giá sự oxy hóa amoniac, môi trường ion chứa amoniac  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4,95g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8,82g/L,  $\text{MgSO}_4$ (dung dịch 1M) 1,1ml/L,  $\text{CaCl}_2$ (dung dịch 1M) 0,3ml/L,  $\text{FeSO}_4$ (dung dịch 30mM) 0,5ml/L,  $\text{CuSO}_4$ (dung dịch 50mM) 0,04ml/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,7g/L, 5%(W/V)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  khan 12ml/L) và môi trường ion chứa axit nitơ ( $\text{CaCl}_2$  0,01g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1g/L, EDTA 1,4mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5mg/L,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5  $\mu\text{L}$ /L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05mg/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,1mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,001mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,01mg/L,  $\text{NaNO}_2$  0,21g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,3mg/L) được bào chế. Chúng phân lập được (0,01%) được tiêm vào 5ml hai môi trường được bào chế như nêu ở trên và sau đó nuôi cấy ở  $30^\circ$  trong 14 ngày. Sau khi các dung dịch nuôi cấy được ly tâm và 1ml mỗi chất nổi trên bề mặt của dịch nuôi cấy được chiết, một chất chỉ thị (axit sulanilic, N,N-đimetyl-1-naphylamin) cho phép màu được thay đổi khi axit nitơ tồn tại được bổ sung 100 $\mu\text{L}$ . Chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy mà chất chỉ thị được thêm vào đã được phản ứng ở  $25^\circ$  trong 10 phút, và được quan sát bằng thị giác là liệu có sự thay đổi màu hay không. Trong trường hợp axit nitơ tồn tại hoặc được tạo thành, thì màu của dung dịch nuôi cấy bị đổi thành màu tím đậm, và trong trường hợp axit nitơ không có hoặc được tiêu thụ, thì không quan sát thấy sự thay đổi màu.

Khoảng 1000 chủng phân lập được được đánh giá, trong đó 7 chủng oxy hóa cả amoniac và axit nitơ, 2 chủng có hiệu quả phân hủy amoniac tuyệt vời, và 1 chủng có hiệu quả phân hủy axit nitơ được lựa chọn như được nêu trong Bảng 1.

[Bảng 1]

| Số chủng | sự oxy hóa amoniac | sự oxy hóa axit nitơ |
|----------|--------------------|----------------------|
| 102      | +                  | +                    |
| 109      | +                  | +                    |
| 251      | +++                | +                    |
| 253      | +                  | +                    |
| 268      | +++                | +                    |
| 283      | +                  | +                    |
| 296      | +                  | +                    |
| 303      | +++                | +                    |

|     |     |    |
|-----|-----|----|
| 396 | +++ | ++ |
| 462 | +++ | +  |

Ví dụ 2: Đánh giá *in vitro* về sự oxy hóa amoniac và axit nitơ

(1) Đánh giá định lượng amoniac cho chủng được lựa chọn ban đầu

Để đánh giá hiệu quả làm giảm amoniac phụ thuộc vào sự oxy hóa amoniac bởi chủng phân lập được ban đầu, lượng tiêu thụ amoniac được định lượng trong môi trường chứa amoniac.

10 chủng phân lập được đầu tiên (0,1%) được tiêm vào môi trường lỏng BHI mỗi chủng và sau đó nuôi cấy ở 37° và 200 vòng/phút trong 15 giờ, do đó kích hoạt các chủng. Chủng đã kích hoạt (1%) được tiêm vào môi trường chứa amoniac ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,5g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,1g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,18g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0,5g/L, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0,014g/L, glucoza 0,5g/L) và nuôi cấy ở 37° và 200 vòng/phút. Trong quá trình nuôi cấy, dung dịch nuôi cấy được nuôi cấy trong 6, 12, 24, và 36 giờ được chiết và ly tâm. Sau đó, chỉ các chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy được thu hồi. Lượng amoniac còn lại trong chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy được thu hồi được định lượng.

Kết quả là, đã khẳng định rằng hàm lượng amoniac trong chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy bị giảm trong tất cả 10 chủng phân lập được như được nêu trong FIG. 1. Cụ thể, trong trường hợp các chủng số 283, 296, 303, và 396, hàm lượng amoniac giảm nhanh sau 6 giờ, tương ứng với bước nuôi cấy đầu tiên. Để khẳng định rằng amoniac được oxy hóa và tạo thành axit nitơ, chất chỉ thị cho phép thay đổi màu khi axit nitơ tồn tại được thêm vào và phản ứng màu được quan sát. Kết quả là, không quan sát thấy sự thay đổi màu trong bước đầu tiên, nhưng trong mỗi mẫu được chiết khi việc nuôi cấy kết thúc, màu của tất cả chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy bị đổi thành màu tím đậm. Do đó, được đánh giá cao là tất cả chủng phân lập được đầu tiên oxy hóa amoniac thành axit nitơ.

(2) Đánh giá định lượng axit nitơ cho chủng phân lập được đầu tiên.

Để đánh giá hiệu quả làm giảm axit nitơ phụ thuộc vào sự oxy hóa axit nitơ bởi chủng phân lập được đầu tiên, lượng tiêu thụ axit nitơ được định lượng trong môi trường chứa axit nitơ.

10 chủng phân lập được đầu tiên (0,1%) được tiêm vào môi trường lỏng BHI và sau đó nuôi cấy ở 37<sup>0</sup> và 200 vòng/phút trong 15 giờ, do đó kích hoạt các chủng. Chủng kích hoạt (1%) được tiêm vào môi trường chứa axit nitơ (NaNO<sub>2</sub> 0,5g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,5g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,1g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,18g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0,5g/L, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0,014g/L, glucoza 0,5g/L) và nuôi cấy ở 37<sup>0</sup> và 200 vòng/phút. Trong quá trình nuôi cấy, các dung dịch nuôi cấy được nuôi cấy trong 6, 9, 12, 24, và 30 giờ được chiết và ly tâm. Sau đó, chỉ các chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy được thu hồi. Lượng axit nitơ còn lại trong chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy được thu hồi được định lượng,

Kết quả là, có thể khẳng định rằng hàm lượng axit nitơ trong chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy giảm đối với tất cả 10 chủng được lựa chọn như được nêu trong FIG. 2. Cụ thể, trong trường hợp các chủng số 102, 109, 251, 253, và 268, hàm lượng axit nitơ giảm nhanh sau 6 giờ, tương ứng với bước nuôi cấy đầu tiên. Để đánh giá liệu axit nitơ bị oxy hóa hay không, chất chỉ thị cho phép thay đổi màu khi axit nitơ tồn tại được thêm vào, và phản ứng màu được quan sát. Kết quả là, màu tím đậm được quan sát trong môi trường ban đầu, nhưng trong mỗi mẫu được chiết khi việc nuôi cấy kết thúc, thì màu của chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy không bị đổi. Do đó, được đánh giá cao rằng chủng phân lập được ban đầu oxy hóa axit nitơ, vì vậy không có axit nitơ.

(3) Đánh giá khả năng tăng trưởng

Làm môi trường chất lượng nước, các điều kiện hiếu khí, kỵ khí tùy ý, và kỵ khí cùng tồn tại, và cụ thể, khi quy trình anammox (quy trình trong đó amoniac bị oxy

hóa thành axit nitric dưới điều kiện kỵ khí) tiến hành trong điều kiện kỵ khí, thì quan trọng là các chủng phân lập được có thể tăng trưởng trong nhiều điều kiện khác nhau. Do đó, khả năng tăng trưởng của 10 chủng phân lập được ban đầu được đánh giá trong các điều kiện kỵ khí tùy ý và kỵ khí.

10 chủng phân lập được ban đầu (0,1%) được tiêm vào môi trường lỏng BHI, và sau đó nuôi cấy ở 37<sup>0</sup> trong các điều kiện kỵ khí tùy ý và kỵ khí trong 24 giờ. Phần lớn chủng phân lập được tăng trưởng trong cả hai điều kiện kỵ khí tùy ý và kỵ khí, và cụ thể, trong trường hợp các chủng số 253 và 268, khả năng tăng trưởng trong điều kiện kỵ khí là tuyệt vời, và trong trường hợp chủng số 283, khả năng tăng trưởng trong điều kiện kỵ khí tùy ý là tuyệt vời nhất (FIG. 3). Do đó, các chủng số 253, 268, và 283 có khả năng tăng trưởng tuyệt vời trong điều kiện kỵ khí tùy ý và kỵ khí được phân lập lần hai.

#### (4) Đánh giá tính kháng muối

Để đánh giá hoạt tính của chủng trong nước ngọt và nước biển, khả năng tăng trưởng của chủng phân lập lần hai được đánh giá trong môi trường chứa natri clorua.

Ba chủng ứng viên được phân lập (0,1%) được tiêm vào các môi trường lỏng BHI chứa 0%, 3%, 5%, và 10% natri clorua và nuôi cấy ở 37<sup>0</sup> và 200 vòng/phút. Trong quá trình nuôi cấy, mỗi mẫu được nuôi cấy trong 8, 10, và 22 giờ được chiết, và đo độ hấp thụ của chúng.

Kết quả là, đã khẳng định rằng như được nêu trong FIG. 4, tất cả ba chủng tăng trưởng trong môi trường chứa 3% natri clorua. Cụ thể, trong trường hợp chủng số 283, khả năng tăng trưởng trong môi trường chứa 5% natri clorua là tuyệt vời so với chủng khác. Do đó, được đánh giá đúng là ba chủng phân lập được lần hai, các chủng số 253, 268, và 283, có thể được dùng trong điều kiện nước biển cũng như điều kiện nước ngọt.

Ví dụ 3: Đánh giá *in vivo* và phân lập chủng cuối cùng

Đánh giá khả năng cải thiện chất lượng nước của 3 chủng phân lập được lần hai được thực hiện ở trang trại cá bẹt con. Cá bẹt con được cho ăn với thức ăn chăn nuôi bán sẵn để thỏa mãn và phân phối ngẫu nhiên trong bể chứa nước thí nghiệm (64L). Sau khi phân phối các thí nghiệm, nước nông nghiệp trong tất cả các bể nước thử nghiệm đều được thu hồi. Sau đó, 50ml nước nông nghiệp được lấy mẫu trong mỗi thùng nước sau 0, 24, 48, 72, 92, và 102 giờ. Chủng được lựa chọn lần hai được pha loãng đến khoảng  $1 \times 10^5$  CFU/3ml và sau đó đặt vào bể nước mỗi 24 giờ trong 5 ngày. Trong các nhóm đối chứng, cùng một lượng nước biển được đưa vào đó. Sau khi chiết mẫu, nồng độ amoniac được phân tích, và mẫu nước biển còn lại sau khi phân tích được bảo quản ở  $-20^{\circ}$ . Sau đó, mẫu nước biển đã bảo quản được sử dụng để phân tích nitrit và nitrat. Để phân tích chất lượng nước, ba loại amoniac, nitrit, và nitrat được phân tích. Thực hiện phân tích bằng cách sử dụng máy phân tích chất lượng nước (RQflex 10, Merck, Đức) sau khi cho các mẫu nước biển phản ứng tương ứng với thuốc thử của kit.

Kết quả là, sau 72 giờ, hiệu quả của việc loại bỏ amoniac được trình bày (FIG. 5), và sau 120 giờ, hiệu quả còn tăng lên. Sau 140 giờ, cá bẹt bắt đầu chết do ngộ độc amoniac trong tất cả các bể nước. Trong số ba chủng được lựa chọn lần hai, thì các chủng số 253 và 283 có hiệu quả loại bỏ amoniac cao đáng kể và tử vong cũng giảm so với các nhóm đối chứng. Do đó, có thể đánh giá đúng rằng việc thêm chủng oxy hóa amoniac và axit nitơ vào nước nông nghiệp (nước được sử dụng nuôi cá (cá bẹt)) có thể tăng tỷ lệ sống sót cá. Cuối cùng, chủng số 283 có hiệu quả loại bỏ amoniac và khả năng tăng trưởng tuyệt vời trong các điều kiện kỵ khí tùy ý và kỵ khí được phân lập.

Ví dụ 4: Xác định chủng phân lập được và nghiên cứu đặc tính hình thái và hóa sinh của nó

(1) Nghiên cứu tính chất hình thái và sinh hóa

Thực hiện nghiên cứu hình thái và sinh hóa để xác định chủng phân lập được cuối cùng. Các đặc điểm hình thái như sau. Chủng là chủng Gram dương, và đã khẳng định rằng chủng là bacillus từ ảnh hiển vi điện tử (FIG. 6). Để phân tích tính chất sinh hóa, mẫu chủng lên men đường được phân tích bằng cách sử dụng hệ API 50 CHB (Biomerieux, Pháp).

[Bảng 2]

|                           |   |                      |   |
|---------------------------|---|----------------------|---|
| Nhóm đối chứng            | - | Esculin              | + |
| Glyxerol                  | + | Salixin              | + |
| Erythritol                | - | Xenlobioza           | + |
| D-Arabinoza               | - | Maltoza              | + |
| L-Arabinoza               | + | Lactoza              | - |
| Riboza                    | + | Melibioza            | - |
| D-Xyloza                  | + | Sacaroza             | + |
| L-Xyloza                  | - | Trehaloza            | + |
| Adonitol                  | - | Inulin               | + |
| $\beta$ -Metyl-Xylosit    | - | Melezitoza           | - |
| Galactoza                 | + | D-Rafinoza           | + |
| D-Glucoza                 | - | Amidon               | + |
| D-Fructoza                | - | Glycogen             | - |
| D-Manoza                  | + | Xylitol              | - |
| L-Sorboza                 | - | $\beta$ -Gentiobioza | + |
| Ramnoza                   | - | D-Turanoza           | - |
| Dulcitol                  | - | D-Lyxzoza            | - |
| Inositol                  | + | D-Tagatoza           | - |
| Manitol                   | + | D-Fucoza             | - |
| Sorbitol                  | + | L-Fucoza             | - |
| $\alpha$ -Metyl-d-manosit | - | D-Arabitól           | - |
| $\alpha$ -Metyl-glucosit  | - | L-Arabitól           | - |
| N-axetyl glucosamin       | - | Gluconat             | - |
| Amygdalin                 | - | 2-xeto-gluconat      | - |
| Arbutin                   | - | 5-xeto-gluconat      | - |

+: dương, -: âm

## (2) Xác định vi khuẩn

Để xác định chính xác chủng, thực hiện phương pháp phát sinh loài phân tử bằng cách sử dụng trình tự ADN nucleotit. Để phân tích trình tự nucleotit, gen 16s rADN được khuếch đại bằng cách sử dụng hỗn hợp sơ bộ phản ứng dây chuyền polymeraza (polymerase chain reaction - PCR) (Bioneer, Hàn quốc), toàn bộ đoạn môi

27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3': SEQ ID No: 2) và 1492R (5'GGYTACCTTGTTACGACTT3': SEQ ID No: 3). Tổng lượng dung dịch phản ứng được đặt ở 20 $\mu$ l, và thực hiện PCR trong 30 vòng ở 94 $^{\circ}$  trong 1 phút, 56 $^{\circ}$  trong 1 phút, và 72 $^{\circ}$  trong 1 phút. Sau đó, trình tự ADN nucleotit đã khuếch đại được phân tích. Trình tự 16s rADN nucleotit được phân tích của chủng phân lập được được biểu diễn bởi trình tự SEQ ID No: 1. Kết quả của việc phân tích, chủng có mức độ tương đồng 96% với *Bacillus licheniformis*. Do đó, chủng phân lập được gọi là *Bacillus licheniformis* CJMPB283 và chủng mới theo sáng chế được gửi vào trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc (Korea Culture Center of Microorganisms) (số truy cập KCCM11270P) vào ngày 22 tháng 3 năm 2012.

Ví dụ 5: Phân tích tính chất probiotic của *Bacillus licheniformis* CJMPB283

#### (1) Hoạt tính enzym tiêu hóa

##### 1) Chiết dung dịch enzym thô

Sau khi nuôi cấy chủng phân lập được trong môi trường lỏng BHI trong 24 giờ, mức độ phân hủy cơ chất được phân tích bằng cách sử dụng dung dịch nuôi cấy làm dung dịch enzym thô và môi trường chứa cơ chất tương ứng tương ứng với mỗi enzym.

##### 2) Hoạt tính proteaza

Điều chế môi trường men mốc (yeast mold - YM) (Difco, Mỹ) chứa 2% sữa đã tách bơ (Sigma, Mỹ). Sau khi xuất hiện đốm 2 $\mu$ l mỗi dung dịch enzym thô đã chiết trên môi trường cơ chất, thì phản ứng được thực hiện ở 37 $^{\circ}$  trong 15 giờ, và sau đó đo hoạt tính enzym bằng mức độ tạo thành vùng trống.

##### 3) Hoạt tính xenlulaza

Môi trường YM chứa 1% cơ chất carboxyl methyl xeluloza (carboxyl methyl tế bàooulase - CMC) được điều chế. Sau khi xuất hiện đốm 2 $\mu$ l mỗi dung dịch enzym thô đã chiết trên mỗi môi trường cơ chất, phản ứng được thực hiện ở 37 $^{\circ}$  trong 15 giờ,

Sau đó, chất phản ứng được nhuộm bằng cách sử dụng 0,2% dung dịch đỏ nước Congo trong 30 phút, và sau đó làm mất màu bằng cách sử dụng dung dịch nước NaCl 1M. Hoạt tính enzym được đo bằng mức độ hình thành vùng trống được tạo ra bởi sự phân hủy cơ chất xung quanh enzym thô.

#### 4) Hoạt tính amylaza

Môi trường YM chứa 1% cơ chất tinh bột hòa tan được được điều chế. Sau khi hiện đốm 3 $\mu$ l mỗi dung dịch enzym thô đã chiết trên môi trường cơ chất, thì phản ứng được thực hiện ở 37<sup>o</sup> trong 15 giờ. Chất phản ứng được nhuộm bằng cách sử dụng dung dịch nước chứa 0,1% I<sub>2</sub> và 2% KI, và sau đó hoạt tính enzym được đo bằng mức độ hình thành vùng trống được tạo ra bằng cách phân hủy cơ chất xung quanh enzym thô.

Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 được phân lập cuối cùng có các hoạt tính của enzym tiêu hóa (proteaza, amylaza, và xenlulaza) như được nêu trong Bảng 3. Cụ thể, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 có hoạt tính proteaza tuyệt vời.

[Bảng 3]

|          | Proteaza | Amylaza | Xenlulaza |
|----------|----------|---------|-----------|
| CJMPB283 | +++      | ++      | ++        |

-: không có hoạt tính, +: có hoạt tính, ++: hoạt tính tuyệt vời, +++: hoạt tính tuyệt vời đáng kể

#### (2) Khả năng hình thành nội bào tử

*Bacillus* tạo thành các nội bào tử để tồn tại dưới sự căng thẳng như cạn kiệt một hoặc nhiều chất dinh dưỡng cần thiết, hoặc tương tự. Do các nội bào tử có tính kháng lại các điều kiện khắc nghiệt như tia cực tím, sấy khô ở nhiệt độ cao, sấy khô ở nhiệt độ thấp và áp suất cao, hoặc tương tự, nên việc tạo thành các nội bào tử là quan trọng để duy trì tỷ lệ sống sót của bacillus. Do đó, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 được nuôi cấy trong một khoảng thời gian dài, và khả năng hình thành nội bào tử của nó được xác nhận.

Chủng (0,1%) được cấy vào môi trường lỏng BHI và nuôi cấy ở 37<sup>0</sup> và 200 vòng/phút trong 24 và 48 giờ. Dung dịch nuôi cấy ở mỗi thời điểm được lan tràn trên môi trường thạch BHI, và đếm tổng số tế bào. Ngoài ra, dung dịch nuôi cấy được xử lý bằng nhiệt ở 95<sup>0</sup> trong 10 phút được lan tràn trên môi trường thạch BHI, và đếm số lượng nội bào tử.

Như được nêu trong Bảng 4, có thể đánh giá đúng rằng khi *Bacillus licheniformis* CJMPB283 được nuôi cấy trong 24 giờ, tỷ lệ hình thành nội bào tử là khoảng 24,5%, và khi *Bacillus licheniformis* CJMPB283 được nuôi cấy trong 48 giờ, thì tỷ lệ hình thành nội bào tử là 100%. Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 theo sáng chế có khả năng tạo thành nội bào tử tuyệt vời khi được nuôi cấy trong 48 giờ hoặc nhiều hơn, để chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 làm các probiotic có thể vẫn giữ tỷ lệ sống sót cao.

[Bảng 4]

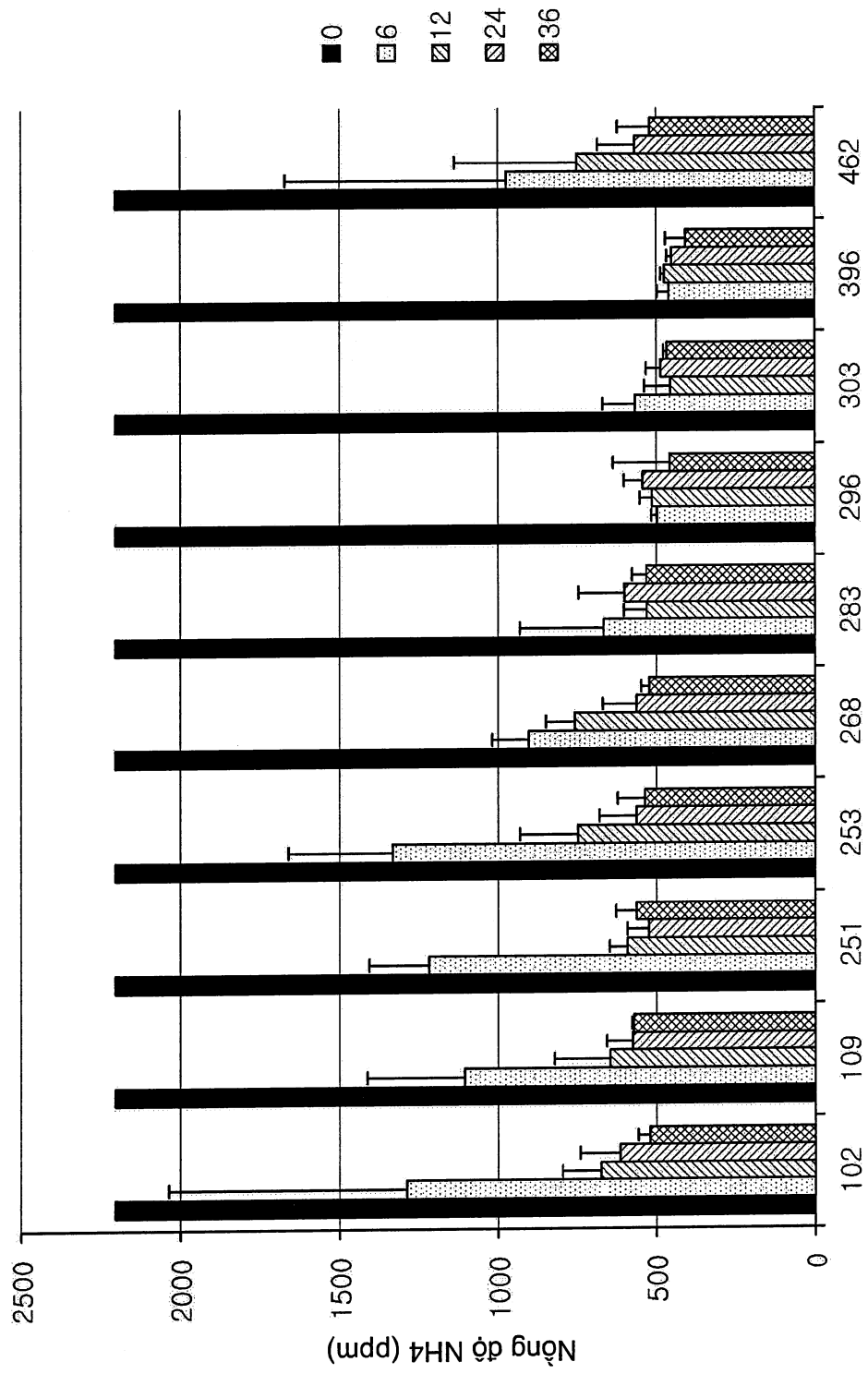
| Thời gian nuôi cấy | Tổng số tế bào (CFU/ml) | Số lượng nội bào tử (CFU/ml) | Tỷ lệ tạo thành nội bào tử (%) |
|--------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 24 giờ             | 1,1x10 <sup>9</sup>     | 2,7x10 <sup>8</sup>          | 24,5%                          |
| 48 giờ             | 1,5x10 <sup>9</sup>     | 1,5x10 <sup>9</sup>          | 100%                           |

Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 mới theo sáng chế có hiệu quả tuyệt vời tạo ra enzym tiêu hóa như amylaza, xenlulaza, và proteaza và khả năng oxy hóa tuyệt vời với amoniac và axit nitơ, để chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 mới có thể có hiệu quả probiotic và cải thiện chất lượng nước khi nuôi cá hoặc loài giáp xác. Do đó, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 mới có thể được sử dụng làm chất lọc sạch nước cũng như là các probiotic.

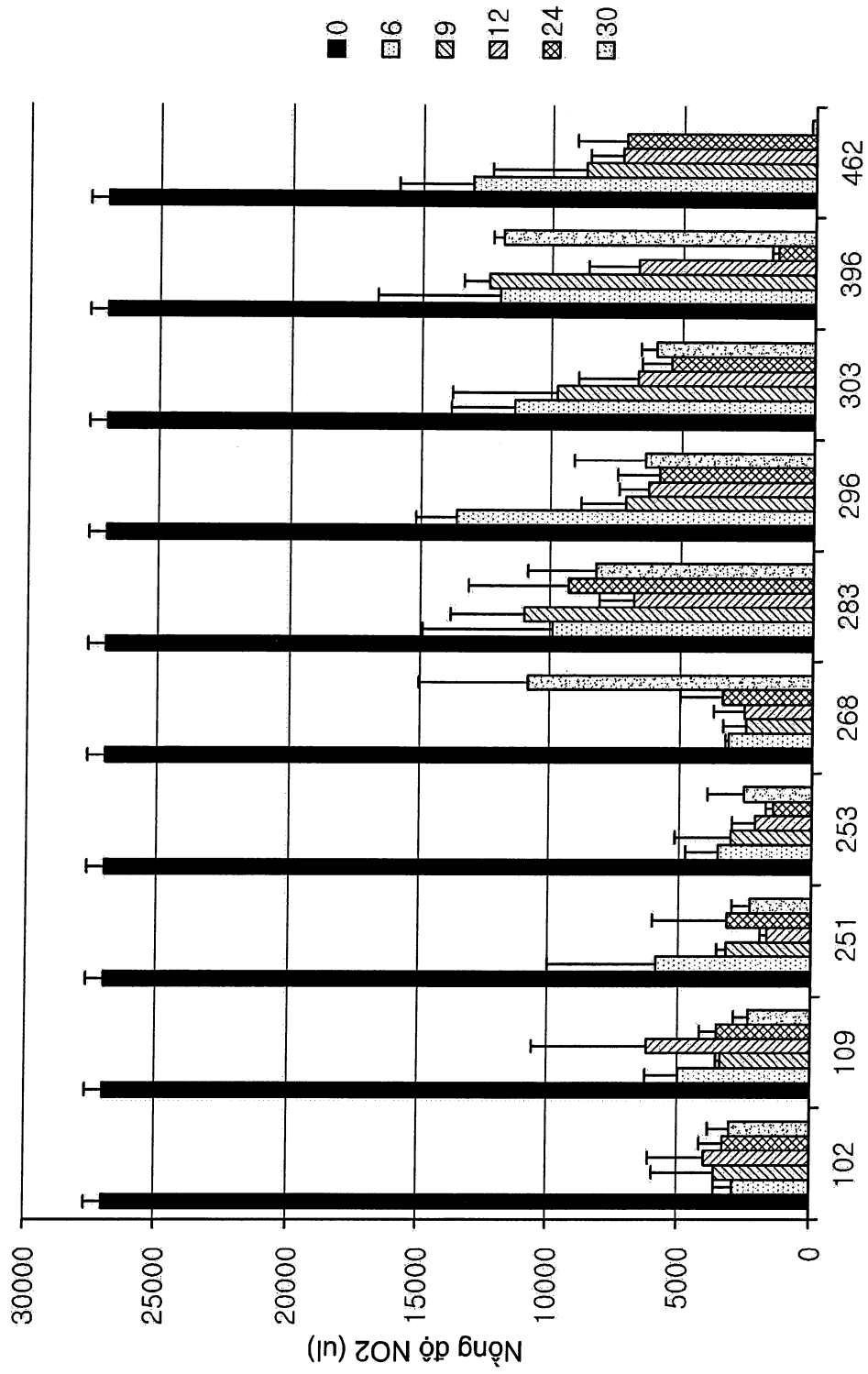
## YÊU CẦU BẢO HỘ

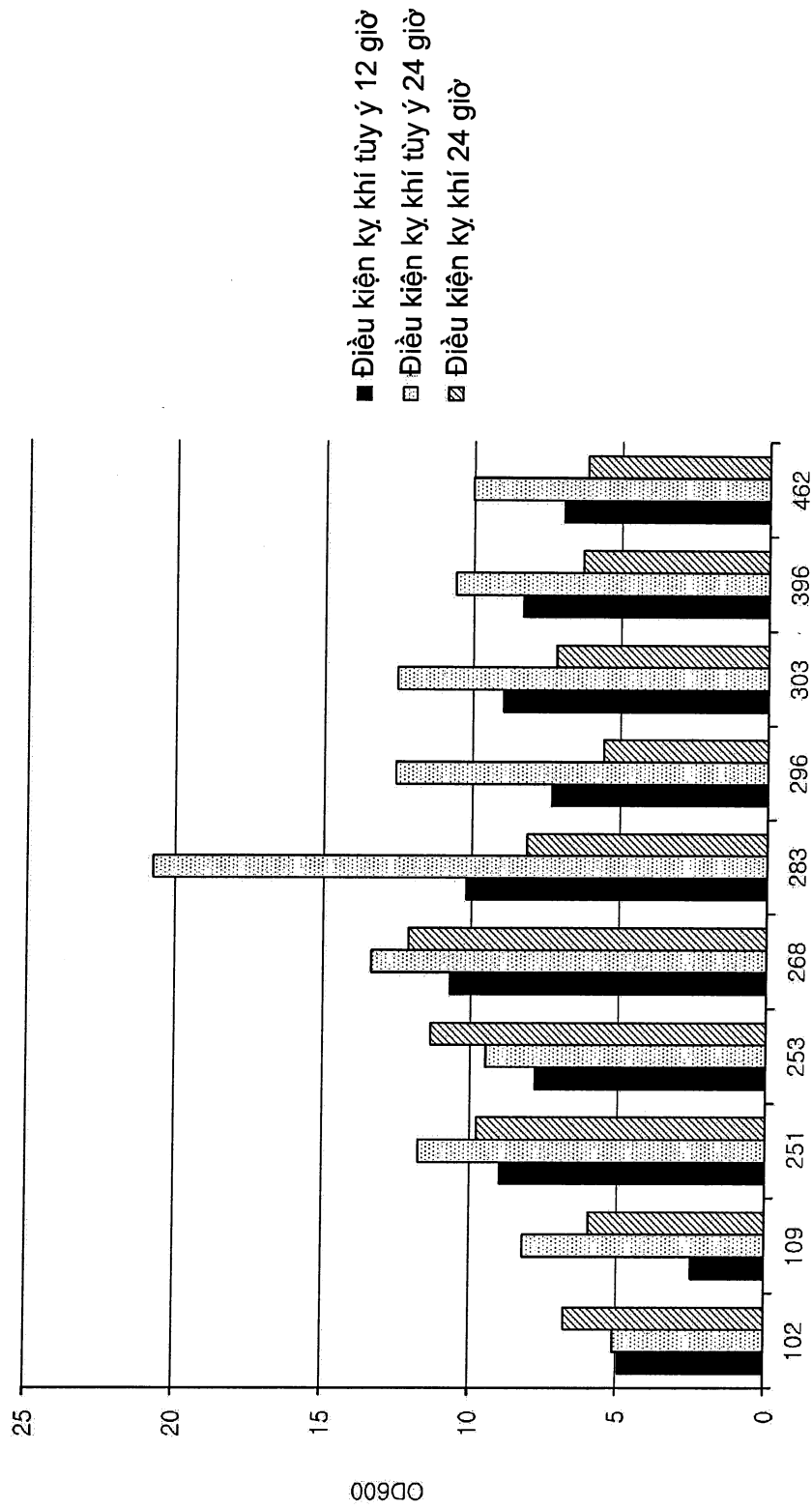
1. Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 (số truy cập KCCM11270P) tạo ra một hoặc nhiều enzym tiêu hóa là proteaza, xenluloza và amylaza và có khả năng oxy hóa amoniac và axit nitơ.
2. Sản phẩm nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 là một trong số các sản phẩm được chọn từ nhóm gồm dung dịch nuôi cấy chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283, (số truy cập KCCM11270P), dung dịch cô đặc của nó, và vật liệu khô từ nó.
3. Chế phẩm probiotic chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 (số truy cập KCCM11270P) theo điểm 1 hoặc sản phẩm nuôi cấy theo điểm 2.
4. Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi để nuôi trồng thủy sản chứa chế phẩm probiotic theo điểm 3.
5. Chất lọc sạch nước để nuôi trồng thủy sản chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB283 (số truy cập KCCM11270P), dung dịch nuôi cấy nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ nó.
6. Phương pháp cải thiện chất lượng nước của trại nuôi cá, trong đó phương pháp này bao gồm bước phun chất lọc sạch nước theo điểm 5 trước hoặc trong khi nuôi cá ở trang trại cá.

[FIG. 1]

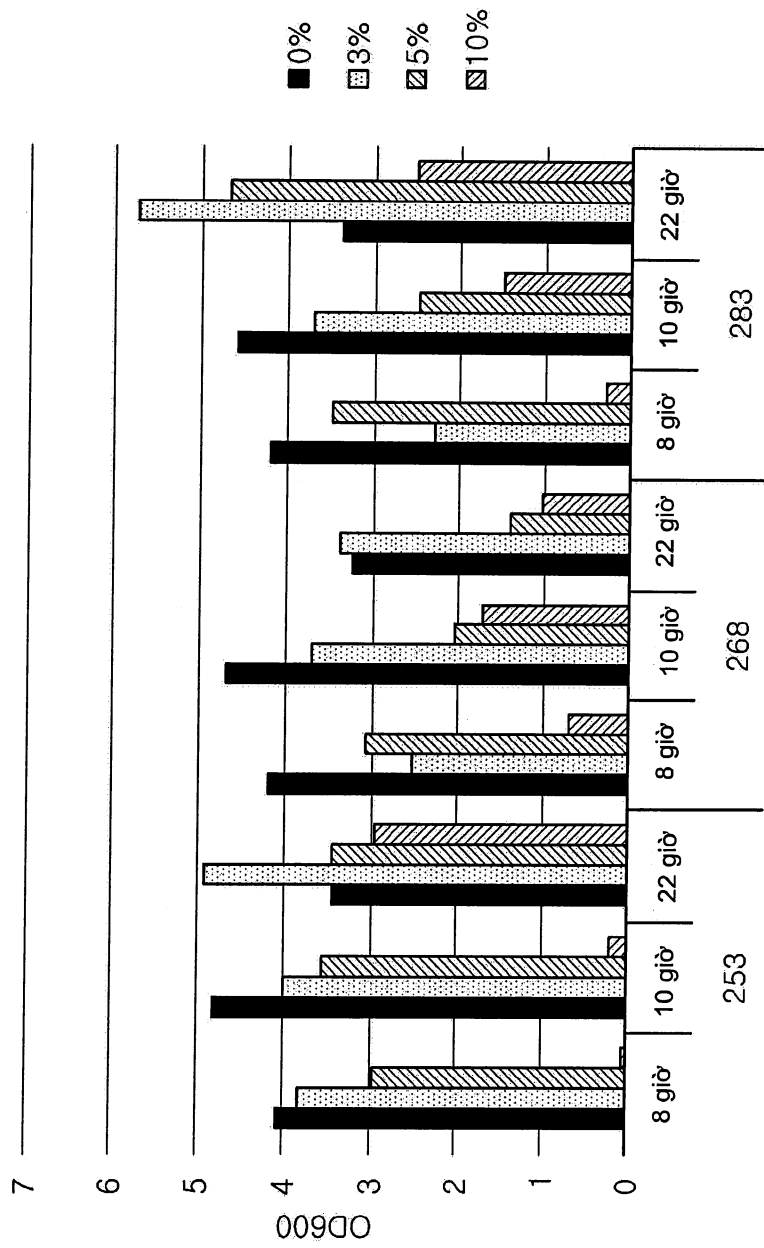


[FIG. 2]



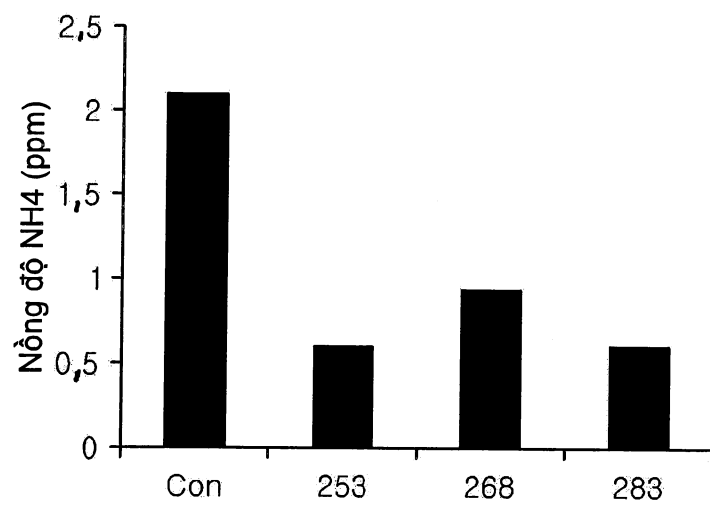


[FIG. 3]

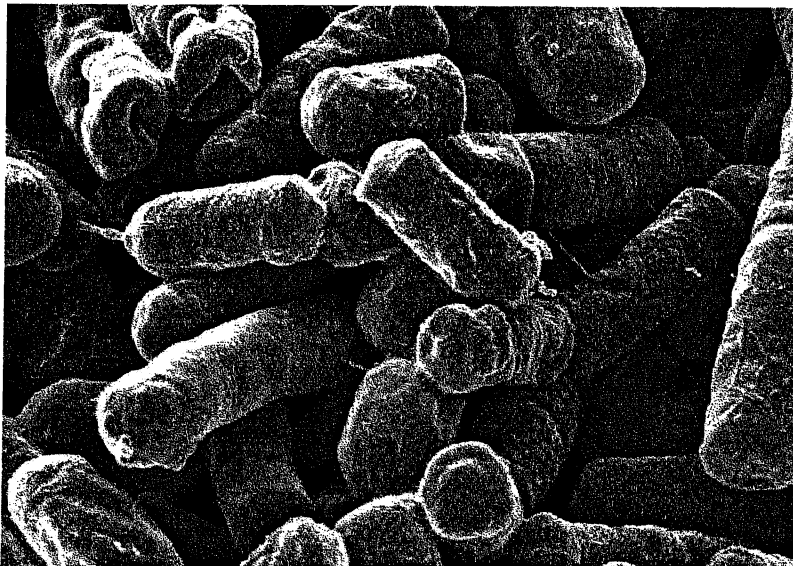


[FIG.4]

[FIG.5]



[FIG. 6]



## DANH MỤC TRÌNH TỰ

|       |                                                                            |     |
|-------|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| <110> | Tập đoàn CJ CHEILJEDANG                                                    |     |
| <120> | CHỦNG BACILLUS LICHENIFORMIS CJMPB283 VÀ CHẾ PHẨM PROBIOTIC CHỨA CHỦNG NÀY |     |
| <130> | P13-5035                                                                   |     |
| <150> | KR 10-2012-0035434                                                         |     |
| <151> | 2012-04-05                                                                 |     |
| <160> | 3                                                                          |     |
| <170> | Thông tin patent Hàn quốc 2.0                                              |     |
| <210> | 1                                                                          |     |
| <211> | 1068                                                                       |     |
| <212> | ADN                                                                        |     |
| <213> | Bacillus licheniformis                                                     |     |
| <400> | 1                                                                          |     |
|       | cttcggcggc tggctcctaa aggttacctc accgacttcg ggtgttaca actctcgtgg           | 60  |
|       | tgtgacgggc ggtgtgtaca agggccggga acgtattcac cgcggcatgc tgatccgcga          | 120 |
|       | ttactagcga ttccagcttc acgcagtcga gttgcagact gcgatccgaa ctgagaacag          | 180 |
|       | atttgtggga ttggcttaac ctcgcggttt cgctgccctt tgtctgtcc attgtagcac           | 240 |
|       | gtgtgtagcc caggtcataa ggggcatgat gatttgacgt catccccacc ttctccggt           | 300 |
|       | ttgtaccgg cagtcacctt agagtgccca actgaatgct ggcaactaag atcaagggtt           | 360 |
|       | gcgctcgttg cgggacttaa cccaacatct cagcacaga gctgacgaca accatgcacc           | 420 |
|       | acctgtcact ctgccccga aggggacgtc ctatctctag gattgtcaga ggatgtcaag           | 480 |
|       | acctggttaag gttcttcgcg ttgcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg         | 540 |
|       | ccccgtcaa ttctttgag ttctagtctt gcgaccgtac tcccaggcg gagtgcctaa             | 600 |
|       | tgcgttagct gcagcactaa ggggcggaaa ccccctaaca cttagcactc atcgtttacg          | 660 |
|       | gcgtggacta ccagggtatc taatctgtt cgctccccac gcttcgctc ctcagcgta             | 720 |

gttacagacc agagagtcgc cttcgccact ggtgttcctc cacatctcta cgcatttcac 780  
 cgctacacgt ggaattccac tctctcttc tgcactcaag ttcccagtt tccaatgacc 840  
 ctccccggtt gagccggggg ctttcacatc agacttaaga aaccgcctgc gagcccttta 900  
 cgcccaataa ttccggacaa cgcttgccac ctacgtatta ccgcggctgc tggcacgtag 960  
 ttagccgtgg ctttctggtt aggtaccgtc aaggtaccgc cctattcgaa cggctactnt 1020  
 cttccctaac anagagcttt acgatccgaa aaccttcac actcacgc 1068

<210> 2  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> đoạn mồi

<400> 2  
 Ala Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly Ala Thr Cys Met Thr Gly Gly Cys  
 1 5 10 15

Thr Cys Ala Gly  
 20

<210> 3  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> đoạn mồi

<400> 3  
 Gly Gly Tyr Thr Ala Cys Cys Thr Thr Gly Thr Thr Ala Cys Gly Ala  
 1 5 10 15

Cys Thr Thr