



(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)



1-0029578

(51)⁷ C12N 1/20; C12R 1/125; A23K 1/16

(13) B

(21) 1-2014-03688

(22) 04/04/2013

(86) PCT/KR2013/002826 04/04/2013

(87) WO/2013/151361 10/10/2013

(30) 10-2012-0035288 05/04/2012 KR

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/03/2015 324A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

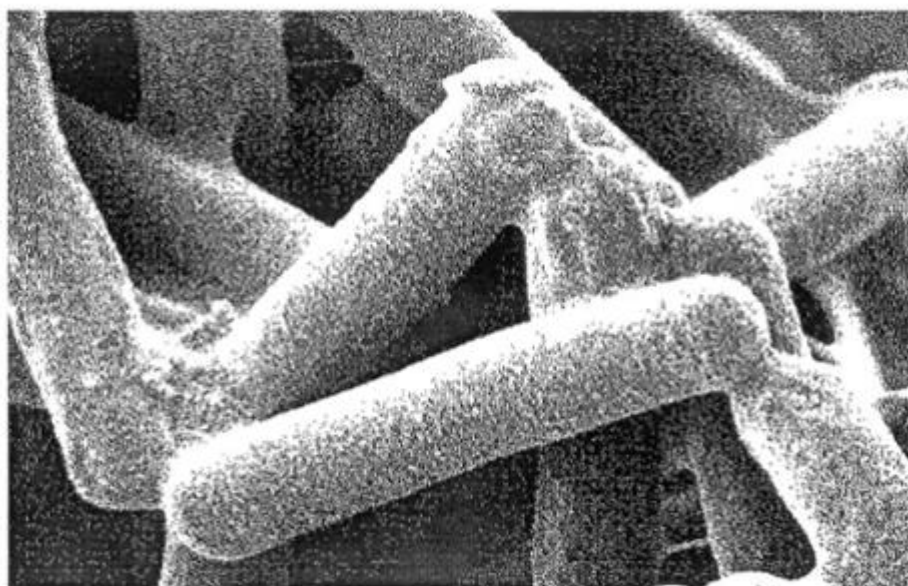
500, Namdaemunro 5-ga, Jung-gu, Seoul 100-749, Republic of Korea

(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 SUBTILIS* CJMPB150, SẢN PHẨM NUÔI CẤY CỦA CHỦNG NÀY, CHẾ PHẨM LỢI KHUẨN, PHỤ GIA THỨC ĂN CHĂN NUÔI VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI CHỨA CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) mới và chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng này. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) có khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức tạp rất tốt để tiết xelulaza, xylanaza, mananaza, amylaza, proteaza, và lipaza, có khả năng chịu nhiệt tốt do tỷ lệ tạo thành nội bào tử cao ở điều kiện nhiệt độ cao, và có tỷ lệ sống sót cao trong hệ tiêu hóa của vật nuôi do khả năng chịu axit và kháng mật tốt, và chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng vi khuẩn này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) mới, và chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gần đây, giá hạt quốc tế tăng do nhu cầu về hạt tăng bởi quá trình sản xuất nhiên liệu sinh học và sự phát triển kinh tế của các quốc gia mới nổi, đất nông nghiệp giảm, giá dầu thô tăng, và lý do tương tự. Tăng giá hạt quốc tế dẫn đến làm tăng giá thức ăn chăn nuôi hỗn hợp nội địa, do đó gây thiệt hại cho việc kinh doanh trang trại vật nuôi. Vì lý do này, để thúc đẩy sự phát triển của vật nuôi và sử dụng hạt thức ăn chăn nuôi hiệu quả, các nghiên cứu về lợi khuẩn, nguồn thức ăn cho lợi khuẩn, sản phẩm enzym, và nghiên cứu tương tự đã được tích cực tiến hành.

Nói chung, một lượng lớn hydrat cacbon khó tiêu, tức là, xenluloza, hemixenluloza, và lignin được chứa trong các hạt thức ăn chăn nuôi. Hydrat cacbon khó tiêu làm gián đoạn các chức năng của hệ tiêu hóa, ví dụ, ngăn cản tiêu hóa, và gây ỉa chảy hoặc bệnh lý ở vật nuôi. Để giải quyết vấn đề này, nhiều sản phẩm enzym dùng trong thức ăn chăn nuôi để phân hủy hydrat cacbon khó tiêu đã được sử dụng rộng rãi.

Xenulaza có khả năng thủy phân xenluloza và xylanaza phân hủy lignin và xylan, là thành phần chính của hemixenluloza, đã được sử dụng rộng rãi làm enzym phụ gia thức ăn chăn nuôi. Ngoài việc làm tăng độ khả dụng của hạt thức ăn chăn nuôi trong đường ruột ở vật nuôi để cải thiện hiệu quả của thức ăn chăn

nuôi (Beguin and Aubert, FEMS Microbiol., Rev. 13:25-58, 1994) các enzym này được biết đến là góp phần thúc đẩy quá trình ủ phân của vật nuôi (Taeil Kim et al, Korean Journal of Microbiology, 35(4):277-282, 1999).

Mananaza là một enzym phân giải nguyên liệu chứa manan, mà là thành phần chính tạo nên hemixenluloza. Protein đậu tương được dùng làm thức ăn chăn nuôi cho lợn, gà, và vật nuôi tương tự, và mananaza cho phép động vật không phải loài nhai lại dễ dàng chuyển hóa thức ăn đậu tương bằng cách phân hủy galactan trong số các hydrat cacbon, thành nguồn năng lượng.

Gần đây, nỗ lực sử dụng các chủng tổng hợp enzym như được mô tả trên đây làm lợi khuẩn đã được thử nghiệm.

Lợi khuẩn là một khái niệm bao gồm các vi khuẩn giúp cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, vi khuẩn có hoạt tính kháng sinh và/hoặc hoạt tính enzym, và sản phẩm được tổng hợp bởi các vi khuẩn này (Fuller, R., J. Appl. Bacteriol., 66(5):365-378, 1989).

Các giải pháp đã biết đề cập đến lợi khuẩn như được mô tả trên đây là như sau.

Chủng *Bacillus* sp. 79-23 tổng hợp xenlulaza trung tính đã được bộc lộ trong patent Hàn Quốc số 10-0318554, và chủng *Bacillus licheniformis* DK42 (KACC 91410P) tiết xenlulaza và xylanaza đã được bộc lộ trong patent Hàn Quốc số 10-1062309. Ngoài ra, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* B4 (KCTC 18083P) có hoạt tính của các enzym amylaza, proteaza, xenlulaza, và lipaza đã được mô tả trong patent Hàn Quốc số 10-0426930.

Tuy nhiên, các chủng *Bacillus* tiết xenlulaza và/hoặc xylanaza đã được bộc lộ trong các giải pháp đã biết như nêu trên, nhưng chủng hoàn toàn tiết tất cả các enzym xenlulaza, xylanaza, và mananaza hoặc công nghệ sản xuất chế phẩm lợi khuẩn sử dụng chủng này vẫn chưa được bộc lộ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một phương án của sáng chế đề xuất chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) có khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức tạp rất tốt, có khả năng chịu axit, và kháng mật.

Một phương án của sáng chế đề xuất sản phẩm nuôi cấy của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P).

Ngoài ra, một phương án của sáng chế đề xuất chế phẩm lợi khuẩn, phụ gia thức ăn chăn nuôi, và thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) hoặc sản phẩm nuôi cấy của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) có khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức tạp rất tốt, có khả năng chịu axit, và kháng mật.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất sản phẩm nuôi cấy của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P), sản phẩm nuôi cấy của nó, hoặc chế phẩm lợi khuẩn như được mô tả trên đây.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P), sản phẩm nuôi cấy của nó, chế phẩm lợi khuẩn, hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi được mô tả trên đây.

Sáng chế đề xuất chế phẩm lợi khuẩn, phụ gia thức ăn chăn nuôi, và thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) mới có

khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức tạp rất tốt, khả năng chịu axit, và kháng mật hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó. Do đó, có thể cải thiện được hiệu quả của thức ăn chăn nuôi cho vật nuôi do cải thiện được khả năng tiêu hóa ở vật nuôi, sự cân bằng hệ vi khuẩn đường ruột có thể được duy trì, và/hoặc hoạt tính kháng sinh có thể được cải thiện, vì thế góp phần phát triển ngành chăn nuôi.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) theo sáng chế.

Fig.2 là đồ thị thể hiện khả năng phát triển của hai chủng dự tuyển phụ thuộc vào thời gian trong ví dụ 1.

Fig.3 là đồ thị thể hiện hoạt tính enzym tiêu hóa của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) theo sáng chế.

Fig.4 là đồ thị thể hiện tỷ lệ sống sót khi chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) theo sáng chế bị xử lý bằng dịch dạ dày nhân tạo hoặc dịch mật nhân tạo.

Fig.5 là đồ thị thể hiện khả năng tiêu hóa thức ăn chăn nuôi theo ví dụ 6.

Fig.6 là đồ thị thể hiện không có hiện tượng tiêu máu của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) theo sáng chế.

Fig.7 thể hiện trình tự nucleotit 16s rADN của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây. Vì các nội dung mà không được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế có thể được thừa nhận và được suy luận bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc lĩnh vực tương tự, nên phần mô tả của chúng sẽ được lược bỏ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chủng phân lập *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P, dưới đây được gọi là ‘CJMPB150’) mới.

CJMPB150 tương ứng với *Bacillus* gram dương về mặt hình thái học (xem Fig.1) và theo kết quả phân tích trình tự nucleotit 16s rADN (SEQ ID No: 1, Fig.7), thì CJMPB150 là chủng có mức tương đồng với *Bacillus subtilis* bằng 99%.

CJMPB150 được lưu giữ trong trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul) được lưu giữ dưới số KCCM11268P vào 22 tháng 3 năm 2012.

CJMPB150 có khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức tạp.

Ví dụ về enzym tiêu hóa có khả năng được tổng hợp bởi CJMPB150 có thể bao gồm một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm xenlulaza, xylanaza, và mananaza, proteaza, amylaza, và lipaza.

Cụ thể là, CJMPB150 có thể tổng hợp tất cả các enzym xenlulaza, xylanaza, mananaza, proteaza, amylaza, và lipaza.

CJMPB150 có khả năng chịu nhiệt tốt.

Cụ thể là, tỷ lệ tạo thành bào tử của CJMPB150, được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và ở tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ và sau đó được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ 95 °C trong 10 phút, có thể là 80% hoặc lớn hơn, và đặc biệt hơn là 85% hoặc lớn hơn.

Ngoài ra, tỷ lệ tạo thành bào tử của CJMPB150 được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ và sau đó được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ 95°C trong 10 phút có thể là 100%.

Vì bào tử có khả năng chịu được môi trường khắc nghiệt như tia cực tím, nhiệt độ thấp, điều kiện khô và/hoặc áp suất cao cũng như là điều kiện nhiệt

độ cao, tỷ lệ tạo thành nội bào tử càng cao, thì tỷ lệ sống sót của chủng này càng lớn.

CJMPB150 có khả năng chịu axit tốt.

Cụ thể là, tỷ lệ sống sót của CJMPB150 được nuôi cấy trong môi trường chứa dịch dạ dày nhân tạo trong 3 giờ có thể là 80% hoặc lớn hơn. Môi trường chứa dịch dạ dày nhân tạo được điều chế bằng cách bổ sung 1% (trọng lượng/thể tích) pepsin vào dung dịch và điều chỉnh pH đến 2,5.

CJMPB150 có khả năng kháng mật tốt.

Cụ thể là, tỷ lệ sống sót của CJMPB150 được nuôi cấy trong môi trường chứa dịch mật nhân tạo chứa 1% (trọng lượng/thể tích) pancreatin trong 3 giờ có thể là 80% hoặc lớn hơn.

Chủng CJMPB150 được phân lập mới theo sáng chế có thể được nuôi cấy bằng phương pháp thông thường đối với chủng *Bacillus*. Cụ thể là, CJMPB150 có thể được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy nằm trong khoảng từ 20 đến 40°C trong thời gian từ 12 giờ đến 4 ngày.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm nuôi cấy chứa CJMPB150.

Sản phẩm nuôi cấy là một khái niệm bao gồm môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch nuôi cấy trong đó chủng CJMPB150 được nuôi cấy và chủng nuôi cấy thu được trong môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch nuôi cấy. Ngoài ra, sản phẩm nuôi cấy có thể chứa hoặc không chứa chủng CJMPB150.

Loại sản phẩm nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là loại thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Ví dụ, sản phẩm nuôi cấy có thể là dạng lỏng hoặc dạng rắn, đặc biệt có thể ở trạng thái ban đầu của sản phẩm nuôi cấy, hoặc dạng được cô hoặc được sấy của nó.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường tự nhiên hoặc môi trường tổng hợp có thể được sử dụng làm môi trường để nuôi cấy CJMPB150 theo sáng chế.

Nguồn cacbon của môi trường này không bị giới hạn cụ thể, và có thể sử dụng nguồn cacbon đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ không giới hạn về nguồn cacbon có thể bao gồm glucoza, sucroza, dextrin, glyxerol, tinh bột, hoặc nguồn tương tự. Có thể sử dụng một nguồn cacbon hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai nguồn cacbon trong số chúng.

Nguồn nitơ của môi trường không bị giới hạn cụ thể, và có thể sử dụng các nguồn nitơ đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ không giới hạn về nguồn nitơ này có thể bao gồm pepton, dịch chiết thịt, dịch chiết nấm men, nấm men khô, đậu tương, muối amoni, nitrat, các hợp chất chứa nitơ hữu cơ hoặc vô cơ khác, hoặc nguồn tương tự. Có thể sử dụng một nguồn nitơ hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai nguồn trong số chúng.

Muối vô cơ chứa trong môi trường không bị giới hạn cụ thể, và các muối vô cơ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn về muối vô cơ có thể bao gồm magie, mangan, canxi, sắt, kali, và muối tương tự. Có thể sử dụng một muối hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai muối trong số chúng.

Axit amin, vitamin, axit nucleic, và/hoặc các thành phần khác thường được chứa trong môi trường nuôi cấy có thể được bổ sung thêm vào môi trường để nuôi cấy CJMPB150 theo sáng chế.

Dung dịch nuôi cấy

Dung dịch nuôi cấy chủng CJMPB150 theo sáng chế có thể là dung dịch nuôi cấy hoặc dung dịch thu được bằng cách loại bỏ dịch nổi nuôi cấy khỏi dung dịch nuôi cấy và/hoặc cô dung dịch nuôi cấy. Chủng CJMPB150 có thể được

chứa trong dung dịch nuôi cấy.

Thành phần của dung dịch nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể chứa thêm thành phần có tác dụng hiệp lực đến sự phát triển của *Bacillus* cũng như là các thành phần thường được biết đến là cần để nuôi cấy chủng *Bacillus*. Thành phần này có thể dễ dàng được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Dung dịch nuôi cấy có thể ở trạng thái lỏng hoặc sấy khô.

Phương pháp sấy dung dịch nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, và có thể sử dụng các phương pháp sấy thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Ví dụ không giới hạn về phương pháp sấy bao gồm phương pháp sấy bằng không khí, phương pháp sấy tự nhiên, phương pháp sấy phun, phương pháp đông khô hoặc phương pháp tương tự. Có thể sử dụng một phương pháp hoặc kết hợp hai hoặc nhiều hơn hai phương pháp với nhau.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng CJMPB150 (KCCM11268P) hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó.

Lợi khuẩn có nghĩa là vi khuẩn hoặc một thành phần của nó có tác dụng có lợi đến sức khỏe của vật chủ như người, động vật hoặc loài tương tự. Đã biết rằng lợi khuẩn cư trú ở thành đường tiêu hóa của vật chủ và có tác dụng ngăn cản sự cư trú của vi khuẩn có hại hoặc sự lan truyền vi khuẩn gây bệnh, và các enzym tiêu hóa có lợi được tổng hợp bởi lợi khuẩn hỗ trợ cho việc hấp thu và sử dụng các chất dinh dưỡng.

Chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế có thể chứa chủng CJMPB150 và/hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó.

Chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế có thể chứa chủng CJMPB150 với lượng nằm trong khoảng từ 5×10^4 đến 5×10^{10} CFU/ml, cụ thể hơn là nằm

trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^9 CFU/ml.

Chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế có thể còn chứa chất mang được dụng và được sản xuất cùng với chất mang này.

Thuật ngữ “chất mang được dụng” như được sử dụng ở đây có nghĩa là chất mang hoặc chất pha loãng mà không kích thích sinh vật sống cũng không ức chế hoạt tính sinh học và các đặc tính của hợp chất được sử dụng.

Chất mang có khả năng được sử dụng trong chế phẩm lợi khuẩn được bào chế thành dung dịch pha loãng, ví dụ về chất mang được vô trùng hoặc thích hợp cho cơ thể sống có thể bao gồm dung dịch nước muối thông thường, nước vô trùng, dung dịch nước muối được đậm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, hoặc chất mang tương tự. Có thể sử dụng một chất mang hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai chất mang, và nếu cần có thể bổ sung các tá dược thông thường khác như chất chống oxy hóa, dung dịch đậm, chất kim khuẩn, và/hoặc tá dược tương tự.

Ngoài ra, chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính, và/hoặc chất làm trơn được bổ sung thêm vào, miễn là sản phẩm lợi khuẩn có thể được sản xuất thành dung dịch tiêm như dung dịch nước, hỗn dịch, nhũ tương, hoặc dạng tương tự, viên tròn, viên nang, cốm hoặc viên nén.

Chế phẩm dùng qua đường miệng chứa chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế làm hoạt chất không bị giới hạn cụ thể, và các chế phẩm dùng qua đường miệng đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Viên nén, viên ngậm dẹp, viên ngậm, hỗn dịch chứa nước hoặc chứa dầu, bột hoặc cốm được bào chế, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, siro, cồn ngọt, hoặc dạng tương tự là ví dụ không giới hạn về chế phẩm dùng qua đường miệng.

Để bào chế chế phẩm lợi khuẩn thành viên nén, viên nang, hoặc dạng tương tự, chế phẩm này có thể còn chứa chất kết dính như lactoza, sacaroza,

sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza, hoặc gelatin, tá dược như dicanxi phosphat, chất phân tán như tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang, chất làm trơn như magie stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, hoặc sáp polyetylen glycol, hoặc dạng tương tự. Trong trường hợp chế phẩm ở dạng viên nang, thì chế phẩm này có thể chứa thêm chất mang dạng lỏng như dầu béo.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm lợi khuẩn.

Chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng CJMPB150 theo sáng chế và/hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó có thể được bào chế ở dạng phụ gia thức ăn chăn nuôi và sau đó được trộn với thức ăn chăn nuôi cho vật nuôi hoặc được bổ sung trực tiếp vào thức ăn chăn nuôi.

Loại phụ gia thức ăn chăn nuôi không bị giới hạn cụ thể, nhưng phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể ở trạng thái lỏng hoặc trạng thái sấy khô, và cụ thể hơn là ở dạng bột sấy khô.

Phương pháp sấy không bị giới hạn cụ thể, và phương pháp sấy đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn về phương pháp sấy bao gồm phương pháp sấy bằng không khí, phương pháp sấy tự nhiên, phương pháp sấy phun, phương pháp đông khô hoặc phương pháp tương tự. Có thể sử dụng một phương pháp hoặc kết hợp hai hoặc nhiều phương pháp sấy trong số các phương pháp sấy nêu trên.

Phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể chứa thêm các chất phụ gia khác có khả năng cải thiện khả năng bảo quản của thức ăn chăn nuôi.

Chất phụ gia được bổ sung thêm vào phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và các chất phụ gia đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn về chất phụ gia bao gồm chất kết dính, nhũ tương, chất bảo quản, và chất tương tự mà được bổ sung để ngăn ngừa sự

giảm chất lượng của phụ gia thức ăn chăn nuôi; axit amin, vitamin, enzym, chất điều vị, hợp chất nitơ không phải protein, silicat, dung dịch đậm, dịch chiết, oligosacarit, và hợp chất tương tự được bổ sung để làm tăng hiệu quả của phụ gia thức ăn chăn nuôi. Mặt khác, chất phụ gia này còn bao gồm chất trộn vào thức ăn chăn nuôi, hoặc chất tương tự. Có thể sử dụng một chất hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai chất trong số các chất nêu trên.

Chế phẩm lợi khuẩn hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được sử dụng riêng lẻ cho động vật hoặc có thể được kết hợp với các phụ gia thức ăn chăn nuôi khác trong chất mang ăn được. Ngoài việc phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được trộn trực tiếp với phân để bón trên mặt đất hoặc thức ăn chăn nuôi cho vật nuôi, thì nó còn có thể được sử dụng riêng rẽ với thức ăn chăn nuôi ở dạng chế phẩm dùng qua đường miệng, hoặc kết hợp với thành phần khác và sau đó sử dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thức ăn chăn nuôi chứa phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể chứa phụ gia thức ăn chăn nuôi với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10 phần trọng lượng, cụ thể hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 phần trọng lượng tính trên 100 phần trọng lượng của thức ăn chăn nuôi. Với khoảng nêu trên, thức ăn chăn nuôi có thể thúc đẩy khả năng tiêu hóa ở vật nuôi một cách hiệu quả, nhờ đó có thể làm tăng hiệu quả thức ăn chăn nuôi.

Thành phần của thức ăn chăn nuôi theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể và có thể là thành phần đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ không giới hạn về thành phần của thức ăn chăn nuôi bao gồm các thành phần có nguồn gốc thực vật như hạt, rễ và quả, các sản phẩm phụ của quá trình chế biến thực phẩm, tảo, chất xơ, chất béo, tinh bột, cây thuộc họ bầu bí, sản phẩm phụ từ hạt, và thành

phần tương tự, và thành phần có nguồn gốc động vật như protein, các nguyên liệu vô cơ, chất béo, chất khoáng, protein tế bào đơn, các thành phần phiêu sinh động vật, hoặc thức ăn cho cá, và thành phần tương tự. Một thành phần hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai thành phần trong số các thành phần nêu trên có thể được sử dụng.

Vật nuôi ví dụ trong đó chế phẩm lợi khuẩn, phụ gia thức ăn chăn nuôi, hoặc thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được sử dụng bao gồm vật nuôi như bò thịt, bò sữa, bê, lợn, lợn con, cừu, dê, ngựa, thỏ, chó, mèo, và vật nuôi tương tự, và gia cầm như gà, gà đang đẻ trứng, gia cầm nội địa, gà trống, vịt, ngỗng, gà tây, chim cú, hoặc vật nuôi tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở chúng.

Dưới đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn thông 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 thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phân lập chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150

(1) Chuẩn bị mẫu và phân lập chủng

Các mẫu thu được từ đậu tương và các sản phẩm đậu tương đã lên men khác nhau, mà là thực phẩm Hàn Quốc truyền thống, được chuẩn bị. Các mẫu đã chuẩn bị được pha loãng từng bước, được trải lên trên môi trường thạch canh thang não tim (brain heart infusion-BHI) (Difco, USA) chứa 3% natri clorua, và sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ.

Các chủng được phân lập từ mỗi trong số các mẫu này được phân loại tùy thuộc vào các kết quả thu được bằng cách quan sát khuẩn lạc. Khuẩn lạc được chọn được phân lập lại bằng phương pháp chuyển và cấy khuẩn lạc đã

chọn trong môi trường mới ba lần, và các chủng được nuôi cấy tinh khiết được đặt trong môi trường chứa 20% glyxerol và được bảo quản ở nhiệt độ -70°C hoặc nhiệt độ thấp hơn.

(2) Chọn lọc chủng có hoạt tính enzym tốt

Để chọn lọc chủng có hoạt tính enzym tiêu hóa phức tạp, đánh giá hoạt tính enzym của chủng phân lập thu được từ sản phẩm đậu tương đã lên men được tiến hành trên ba enzym, proteaza, xenlulaza, và amylaza. Cụ thể là, đánh giá hoạt tính enzym được tiến hành bằng cách đánh giá hoạt tính enzym dựa trên mức độ tạo thành vùng sạch bằng cách sử dụng môi trường chứa cơ chất tương ứng với mỗi enzym.

Trước hết khoảng 200 chủng được chọn lọc dựa trên các kết quả của hoạt tính enzym tiêu hóa ở trạng thái dung dịch nuôi cấy, và sau đó hoạt tính tiết enzym tiêu hóa thứ hai của dịch nổi nuôi cấy của dung dịch nuôi cấy được phân tích theo thời gian.

1) Chiết dung dịch enzym thô

Sau khi nuôi cấy các chủng đã chọn trong môi trường lỏng BHI trong 24 giờ và 48 giờ, các dịch nổi được chiết bằng cách ly tâm môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 4°C và ở tốc độ 13.000vòng/phút trong 5 phút. 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 với mỗi enzym.

2) Hoạt tính proteaza

Môi trường mạch nha nấm men (dịch chiết nấm men 3g/l, dịch chiết mạch nha 3g/l, pepton 5g/l, dextroza 10g/l, thạch 20g/l; Difco, USA, dưới đây được gọi là, ‘môi trường YM’) chứa 2% sữa tách béo (Sigma, USA) được điều chế. Sau khi đổ 1,5μl mỗi dung dịch enzym thô đã chiết lên đĩa môi trường chứa

cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 30°C trong 15 giờ, và sau đó đo hoạt tính enzym bằng mức độ tạo ra vùng sạch.

3) Hoạt tính xenlulaza

Môi trường YM chứa 1% cơ chất carboxyl metyl xenluloza (CMC) được điều chế. Sau khi đổ 1,5µl mỗi dung dịch enzym thô đã chiết lên đĩa môi trường chứa cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ. Sau đó, chất phản ứng được nhuộm bằng cách sử dụng 0,2% dung dịch nước đỏ Congo trong 30 phút, và sau đó loại màu bằng cách sử dụng dung dịch nước NaCl 1M. Hoạt tính enzym được đo bằng mức độ hình thành vùng sạch được tạo ra bởi sự phân hủy cơ chất quanh enzym thô.

4) Hoạt tính amylaza

Môi trường YM chứa 1% cơ chất tinh bột hòa tan được điều chế. Sau khi đổ 1,5µl mỗi dung dịch enzym thô đã chiết lên đĩa môi trường chứa cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ. Chất phản ứng được nhuộm bằng cách sử dụng dung dịch nước chứa 0,1% I₂ và 2% KI, và sau đó hoạt tính enzym được đo bằng mức độ hình thành vùng sạch được tạo ra bởi sự phân hủy cơ chất quanh enzym thô.

19 chủng có hoạt tính enzym tiêu hóa tốt được chọn như được thể hiện trong bảng 1 dưới đây dựa trên các kết quả của đánh giá thứ hai. Trong số các chủng này, chủng số 150 và 470 có hoạt tính enzym tiêu hóa phức tạp rất tốt trong dung dịch nuôi cấy và cuối cùng dịch nổi được chọn làm các chủng dự tuyển.

Bảng 1 dưới đây thể hiện khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa của các chủng được chọn thứ hai.

[Bảng 1]

enzym	Proteaza			Amylaza			Xenlulaza		
Thời gian nuôi cấy chủng	Dung dịch nuôi cấy	Dịch nổi		Dung dịch nuôi cấy	Dịch nổi		Dung dịch nuôi cấy	Dịch nổi	
	24 giờ	24 giờ	48 giờ	24 giờ	24 giờ	48 giờ	24 giờ	24 giờ	48 giờ
150	++++	++	+	++++	+++	+++	++++	+++	++
462	++++	++++	++	++++	+++	++	++++	+++	+++
464	++++	++++	++	++++	+++	+	++++	+++	+++
468	++++	++++	++	++++	+++	++	++++	+++	+++
470	++++	++++	++	++++	+++	++	++++	+++	+++
474	++++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
487	++++	+++	++	++++	+++	+++	++++	+++	+++
488	++++	+++	++	++++	+++	++	++++	+++	++
501	++++	+++	+++	++++	+++	+	+++	+++	+++
503	++++	++++	++	++++	+++	++	++++	+++	+++
505	++++	++++	+	+++	+++	+	+++	+++	++
529	++++	++	+++	++++	+	+++	+++	+++	+++
530	++++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++
537	++++	++	+++	++++	+++	+	+++	+++	+++
553	++++	++	+++	++++	+++	++	+++	+++	+++
554	++++	++	+++	++++	+++	+	+++	+++	+++
567	++++	++	+++	++++	+++	+	+++	+++	+++
573	++++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
601	++++	++	+++	++++	+++	+++	++++	+++	+++

(3) Đánh giá khả năng phát triển

Đánh giá khả năng phát triển được tiến hành trên hai chủng dự tuyển có khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức tạp rất tốt. Mỗi chủng được nuôi cấy trong môi trường lỏng BHI ở nhiệt độ 37°C và ở tốc độ 200 vòng/phút trong 15 giờ. Sau khi dung dịch nuôi cấy (0,1%) được cấy vào 100ml môi trường lỏng BHI và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 10 và 24 giờ, mỗi dung dịch nuôi cấy được trải lên môi trường thạch BHI, và đếm tế bào.

Kết quả được thể hiện trong Fig.2, và chủng số 150 được khẳng định là có khả năng phát triển tốt hơn trong số hai chủng dự tuyển khi nuôi cấy các chủng này trong 24 giờ.

Do đó, chủng số 150 có khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức tạp rất

tốt và cuối cùng khả năng phát triển được chọn lọc và được đặt tên là CJMPB150.

Ví dụ 2

Hoạt tính enzym tiêu hóa của chủng CJMPB150 đã chọn

Để khẳng định rằng CJMPB150 có hoạt tính tiết enzym tiêu hóa, thì hoạt tính enzym tiêu hóa của xylanaza, mananaza, và lipaza cũng như là proteaza, xenluloza, amylaza được đánh giá.

1) Chiết dung dịch enzym thô

Sau khi nuôi cấy chủng CJMPB150 đã chọn trong môi trường lỏng BHI trong 24 giờ và 48 giờ, dịch nổi được chiết bằng cách ly tâm môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 13.000vòng/phút trong 5 phút. Múc 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 với mỗi enzym.

2) Hoạt tính xylanaza

Môi trường YM chứa 1% xylan được điều chế. Sau khi đổ 1,5μl dung dịch enzym thô lên đĩa môi trường chứa cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ. Sau đó, chất phản ứng được nhuộm bằng cách sử dụng dung dịch nước Congo đỏ 0,2% trong 30 phút, và sau đó khử màu bằng cách sử dụng dung dịch nước NaCl 1M. Tiếp theo, hoạt tính enzym được đo bằng mức độ hình thành vùng sạch.

3) Hoạt tính lipaza

Môi trường YM chứa 1% tricaprylin được điều chế. Sau khi đổ 1,5μl dung dịch enzym thô đã chiết lên đĩa môi trường chứa cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ, và sau đó hoạt tính enzym được đo bằng mức độ hình thành vùng sạch.

4) Hoạt tính mananaza

Môi trường chứa cơ chất (dịch chiết nấm men 3g/l, pepton 5g/l, KH_2PO_4 1g/l, thạch 20g/l, pH 5) chứa 1% manan (gôm đậu locust, Sigma, USA) được điều chế. Sau khi đổ 1,5μl dung dịch enzyme thô đã chiết lên đĩa môi trường chứa cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ, và sau đó hoạt tính enzyme được đo bằng mức độ hình thành vùng sạch.

Hoạt tính enzyme tiêu hóa của CJMPB150 được thể hiện trong bảng 2 và Fig.3 dưới đây.

[Bảng 2]

	Proteaza	Xenulaza	Amylaza	Xylanaza	Mananaza	Lipaza
CJMPB150	+++	++++	++++	++	++++	+

Như được thể hiện trong bảng 2 và Fig.3, CJMPB150 tiết tất cả sáu enzyme tiêu hóa như xylanaza, mananaza, và lipaza cũng như là proteaza, xenulaza, và amylaza với lượng lớn.

Ví dụ 3

Nghiên cứu các đặc tính hình thái và sinh hóa của chủng CJMPB150 và xác định nó

(1) Nghiên cứu các đặc tính hình thái và sinh hóa

Cuối cùng để xác định chủng CJMPB150 được chọn làm chủng có hoạt tính tiêu hóa phức tạp rất tốt, tiến hành nghiên cứu hình thái và sinh hóa. Dựa vào đặc tính hình thái, chủng CJMPB150 được khẳng định là *Bacillus* gram dương (Fig.1). Ngoài ra, kiểu lên men đường của chủng CJMPB150 được phân tích bằng cách sử dụng hệ thống API 50 CHB (Biomerieux, Pháp) để phân tích các đặc tính hóa sinh.

Bảng 3 dưới đây thể hiện kết quả phân tích kiểu lên men đường của

chủng CJMPB150.

[Bảng 3]

Đối chứng	-	Bsculin	+
Glycerol	+	Salixin	-
Erythritol	-	Xenlobioza	+
D-Arabinosa	-	Maltoza	+
L-Arabinosa	+	Lactoza	-
Riboza	-	Melibioza	+
D-Xyloza	-	Sacaroza	+
L-Xyloza	-	Trehaloza	+
Adonitol	-	Inulin	-
B-Metyl-xylozit	-	Melezitoza	-
Galactoza	-	D-Rafinoza	-
D-Glucoza	+	Amidon	-
D-Fructoza	+	Glycogen	-
D-Manosa	-	Xylitol	-
L-Sorboza	-	B-Gentiobioza	-
Rhamnoza	-	D-Turanoza	-
Dulxitol	-	D-Lyxosa	-
Inositol	+	D-Tagatoza	-
Manitol	+	D-Fucoza	-
Sorbitol	+	L-Fucoza	-
α -Metyl-Dmanozit	-	D-Arabitol	-
α -Metyl-glucozit	-	L-Arabitol	-
N-Axetylglucosamin	-	Gluconat	-
Amygdalin	-	2-xeto-gluconat	-
Arbutin	-	5-xeto-gluconat	-

Ở bảng 3, ký hiệu ‘+’ có nghĩa là dương tính, ký hiệu ‘-’ có nghĩa là âm

tính, và nhóm đối chứng là nhóm thử nghiệm mà không có cơ chất.

(2) Xác định chủng CJMPB150

Để xác định chính xác hơn chủng CJMPB150, phương pháp nghiên cứu quan hệ di truyền tiến hóa phân tử sử dụng trình tự nucleotit ADN được tiến hành.

Để phân tích trình tự nucleotit, gen 16s rADN được khuếch đại bằng cách sử dụng hỗn hợp trộn sẵn dùng cho phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction-PCR) (Bioneer, Hàn Quốc) và các đoạn mồi thông thường 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3': SEQ ID No: 2) và 1492R (5'TACGGYTACCTTGTACGACTT 3': SEQ ID No: 3). Tổng lượng dung dịch phản ứng được thiết lập là 20 μ l, và phản ứng PCR được tiến hành ở nhiệt độ 94°C trong 1 phút, 56°C trong 1 phút, và 72°C trong 1 phút. Sau đó, trình tự nucleotit của ADN đã khuếch đại được phân tích. Trình tự nucleotit 16s rADN được phân tích của chủng CJMPB150 được thể hiện bằng trình tự SEQ ID No: 1 (Fig.7).

Kết quả phân tích là, chủng này được xác định là có mức tương đồng với *Bacillus subtilis* bằng 99,9%.

Bacillus subtilis CJMPB150, một chủng vi khuẩn mới theo sáng chế được xác định như trên, được lưu giữ ở trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul) dưới số đăng ký KCCM11268P vào ngày 22/3/2012.

Ví dụ 4

Khả năng tạo thành nội bào tử của chủng CJMPB150

Bacillus tạo nội bào tử để sống sót trong điều kiện khắc nghiệt như sự cạn kiệt một hoặc nhiều hơn một chất dinh dưỡng cần thiết, hoặc điều kiện khắc

nghiệt tương tự. Vì nội bào tử có khả năng chống chịu được với các điều kiện khắc nghiệt như tia cực tím, nhiệt độ cao, sấy ở nhiệt độ thấp và áp suất cao, hoặc điều kiện tương tự, nên sự tạo thành nội bào tử là quan trọng để duy trì tỷ lệ sống sót của bacillus. Do đó, *Bacillus subtilis* CJMPB150 được nuôi cấy trong một khoảng thời gian dài và khả năng tạo thành nội bào tử của nó được xác nhận.

Chủng này (0,1%) được nuôi cấy trong môi trường lỏng BHI và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 24 và 48 giờ. Dung dịch nuôi cấy ở mỗi thời điểm được trải lên môi trường thạch BHI, và tổng số tế bào được đếm. Ngoài ra, dung dịch nuôi cấy đã được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 95 °C trong 10 phút được trải lên môi trường thạch BHI, và số nội bào tử được đếm.

Bảng 4 dưới đây thể hiện các kết quả đếm số nội bào tử.

[Bảng 4]

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Tổng số tế bào đếm được (CFU/ μ l)	Số nội bào tử (CFU/ μ l)	Tỷ lệ tạo thành nội bào tử (%)
24	$1,6 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	87,8
48	$1,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	100

Như được thể hiện trong bảng 4, có thể khẳng định được rằng nếu CJMPB150 được nuôi cấy trong 24 giờ, thì tỷ lệ tạo thành nội bào tử là khoảng 88%, và nếu CJMPB150 được nuôi cấy trong 48 giờ, thì tỷ lệ tạo thành nội bào tử là 100%.

Do đó, vì *Bacillus subtilis* CJMPB150 theo sáng chế có khả năng tạo thành nội bào tử tốt khi được nuôi cấy trong khoảng thời gian 24 giờ hoặc lâu hơn, nên *Bacillus subtilis* CJMPB150 giống như lợi khuẩn có thể duy trì tỷ lệ sống sót cao trong đường tiêu hóa của động vật.

Ví dụ 5

Khả năng chịu axit và kháng mật của chủng CJMPB150

Chủng lợi khuẩn cần phải có khả năng chống chịu được dịch vị và dịch mật mà có độ axit mạnh để tới được ruột sau khi dùng qua đường miệng. Vì lý do này, để khẳng định liệu chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 có thể được dùng làm chủng lợi khuẩn hay không, thì khả năng chịu axit và kháng mật được đánh giá.

(1) Khả năng chịu axit và khả năng kháng dịch vị nhân tạo

Dịch vị nhân tạo được điều chế bằng cách bổ sung 1% (trọng lượng/thể tích) pepsin (Sigma, USA) vào dung dịch natri phosphat 0,05M được điều chỉnh đến độ pH=2,5 bằng cách sử dụng HCl.

Sau khi chủng CJMPB150 được nuôi cấy trong môi trường lỏng BHI ở nhiệt độ 37 °C và tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ, tiến hành ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Tiếp đó, dịch nổi được lấy ra và thành phần vi khuẩn được thu gom. Sau đó, dịch vị nhân tạo được bổ sung vào với lượng bằng lượng dịch nổi và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ. Sau khi nuôi cấy, dung dịch thu được được trải lên môi trường BHI và số tế bào được đếm, sau đó khả năng chịu axit và dịch vị nhân tạo được đánh giá.

(2) Khả năng kháng dịch mật nhân tạo

Dịch mật nhân tạo được điều chế bằng cách bổ sung 1% (trọng lượng/thể tích) pancreatin (Sigma, USA) vào dung dịch natri phosphat 0,05M và vô trùng. Sau đó, dung dịch oxagall 10% (trọng lượng/thể tích) vô trùng (Difco Co.) được bổ sung vào để đạt được hàm lượng bằng 1% (thể tích/thể tích) so với hàm lượng của môi trường, và dịch mật nhân tạo được điều chỉnh đến pH bằng 6,8.

Sau khi nuôi cấy trong dịch vị nhân tạo nêu trong mục (1) trong 3 giờ,

chủng CJMPB150 được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Dịch nổi được lấy ra, và thành phần vi khuẩn được thu gom. Sau đó, dịch mật nhân tạo được bổ sung vào với lượng bằng lượng dịch nổi và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37 °C trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy, dung dịch thu được được trải lên môi trường BHI và tế bào được đếm, để khả năng chịu axit và khả năng kháng dịch mật nhân tạo được đánh giá.

Các kết quả đánh giá khả năng chịu axit, khả năng kháng dịch vị nhân tạo, và khả năng kháng dịch mật nhân tạo được thể hiện trong Fig. 4.

Như được thể hiện trong Fig.4, nếu CJMPB150 được xử lý bằng dịch vị nhân tạo (pH=2,5) trong 2 giờ, thì tỷ lệ sống sót là khoảng 83%, và nếu CJMPB150 được xử lý bằng dịch vị nhân tạo và sau đó xử lý dịch mật nhân tạo trong 24 giờ, thì tỷ lệ sống sót bằng 83% cũng được duy trì.

Do đó, chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 theo sáng chế được khẳng định là có tỷ lệ sống sót cao ngay cả khi nó được xử lý bằng một loạt dịch vị nhân tạo và dịch mật nhân tạo, để chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 có thể hữu dụng làm chủng lợi khuẩn.

Ví dụ 6

Khả năng tiêu hóa in vitro của thức ăn chăn nuôi chứa CJMPB150

Để khẳng định liệu chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 có thể làm tăng khả năng tiêu hóa ở điều kiện giống điều kiện trong ruột hay không, cần nghiên cứu khả năng tiêu hóa của thức ăn chăn nuôi.

Chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (0,1%) được trộn với 10g thức ăn chăn nuôi chuẩn (thức ăn chăn nuôi được điều chế bằng cách trộn bột ngô (50%), bột đậu tương (30%), lúa mì (10%), cám (5%), và bã rượu sấy từ sản xuất rượu (5%) với nhau), và 125ml dung dịch đệm phosphat (pH=6,0) được bổ

sung vào và được chuẩn độ đến pH=2 bằng cách sử dụng HCl 3M. Sau đó, 2ml dung dịch pepsin (20mg/ml) được bổ sung vào và được phản ứng ở nhiệt độ 38°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 2 giờ.

Sau khi phản ứng trong 2 giờ, 50ml dung dịch đệm phosphat (pH=6,8) được bổ sung vào và được chuẩn độ đến pH=6,8 bằng cách sử dụng NaOH 3M. Sau đó, 2ml dung dịch pancreatin (50mg/ml) được bổ sung vào và được nuôi cấy ở nhiệt độ 38°C và 200 vòng/phút trong 18 giờ.

Sau khi nuôi cấy, thức ăn chăn nuôi còn lại sau khi tiêu hóa được lọc bằng cách sử dụng giấy lọc (Whatman số 541) và sấy trong lò ở nhiệt độ 135°C. Trọng lượng khô của nó được đo và khả năng tiêu hóa của thức ăn chăn nuôi được tính toán theo công thức 1 dưới đây.

[Phương trình 1]

Khả năng tiêu hóa của thức ăn chăn nuôi (%) = $\{(\text{trọng lượng khô trước phản ứng} - \text{trọng lượng khô sau phản ứng}) / (\text{trọng lượng khô trước phản ứng})\} \times 100$

Khả năng tiêu hóa đo được của thức ăn chăn nuôi được thể hiện trong bảng 5 và Fig.5.

[Bảng 5]

Mẫu	Khả năng tiêu hóa (%)
Nhóm đối chứng	22,22
CJMPB150	24,48
Enzym	23,85

Như được thể hiện trong bảng 5 và Fig.5, nếu CJMPB150 được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, khả năng tiêu hóa tăng 2,2% so với nhóm đối chứng (nhóm thử nghiệm trong đó CJMPB150, enzym, hoặc thành phần tương tự,

không được bổ sung), và enzym (mananaza, 1%) được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, khả năng tiêu hóa tăng 1,6% so với nhóm đối chứng. Do đó, chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 theo sáng chế được khẳng định là có thể làm tăng khả năng tiêu hóa của thức ăn chăn nuôi và thay thế enzym, mà là phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Ví dụ 7

Độ an toàn của chủng CJMPB150

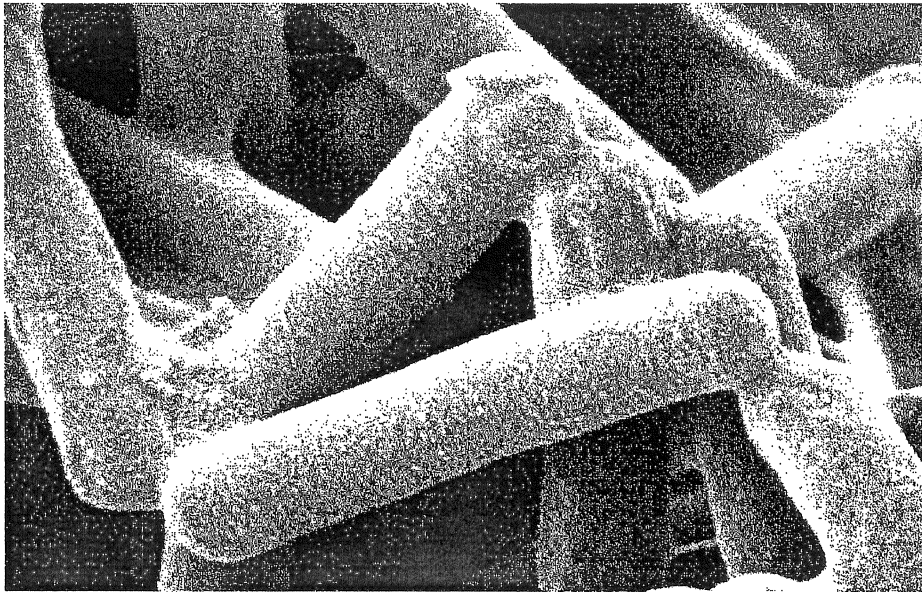
Để khẳng định độ an toàn của CJMPB150, sự tiêu máu β được nghiên cứu. Sự tiêu máu β là một hoạt động làm tan máu tế bào hồng cầu bằng cách tạo ra phospholipaza ở vi khuẩn có hại để thủy phân phospholipit được cung cấp bởi các tế bào hồng cầu.

Để khẳng định sự tiêu máu bởi chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150, môi trường thạch đậu tương trypsin (TSA, Difco, USA) chứa 5% máu cừu (Kisan Biotech, Hàn Quốc) được điều chế. Chủng này được cấy vạch trên môi trường thạch máu đã điều chế và sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Sau đó, kết quả là sự tiêu máu được khẳng định là không xảy ra như được thể hiện trong Fig.6.

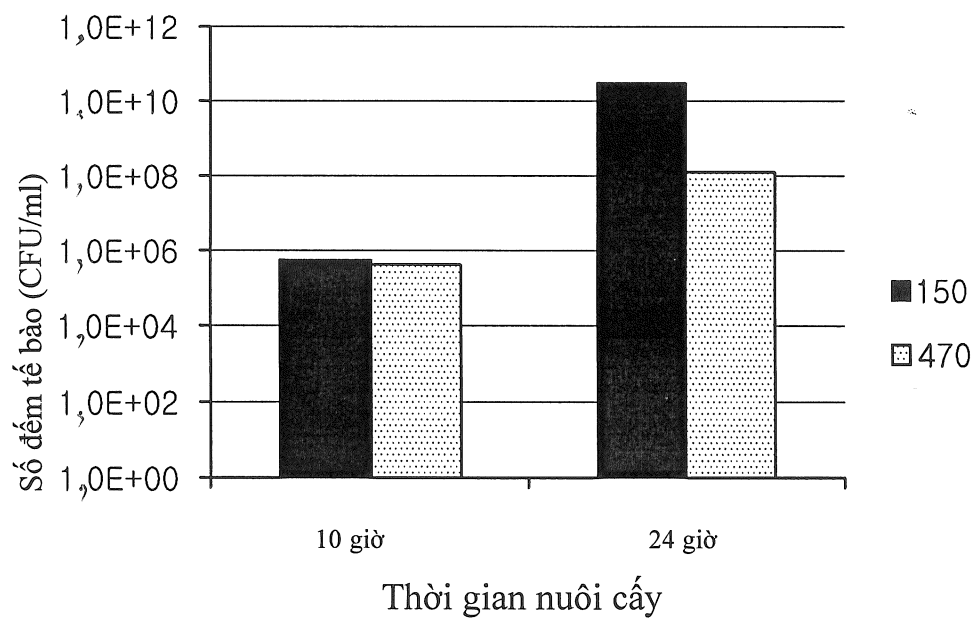
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 có khả năng sản xuất một hoặc nhiều enzym tiêu hóa được chọn từ proteaza, xenlulaza, amylaza, xylanaza, mananaza, và lipaza, có khả năng chịu axit, và kháng mật, trong đó chủng này được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM11268P.
2. Sản phẩm nuôi cấy của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 theo điểm 1.
3. Chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) theo điểm 1 hoặc sản phẩm nuôi cấy của chủng này theo điểm 2.
4. Phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) theo điểm 1, sản phẩm nuôi cấy của chủng này theo điểm 2 hoặc chế phẩm lợi khuẩn theo điểm 3.
5. Thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB150 (KCCM11268P) theo điểm 1, sản phẩm nuôi cấy của chủng này theo điểm 2, chế phẩm lợi khuẩn theo điểm 3, hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 4.

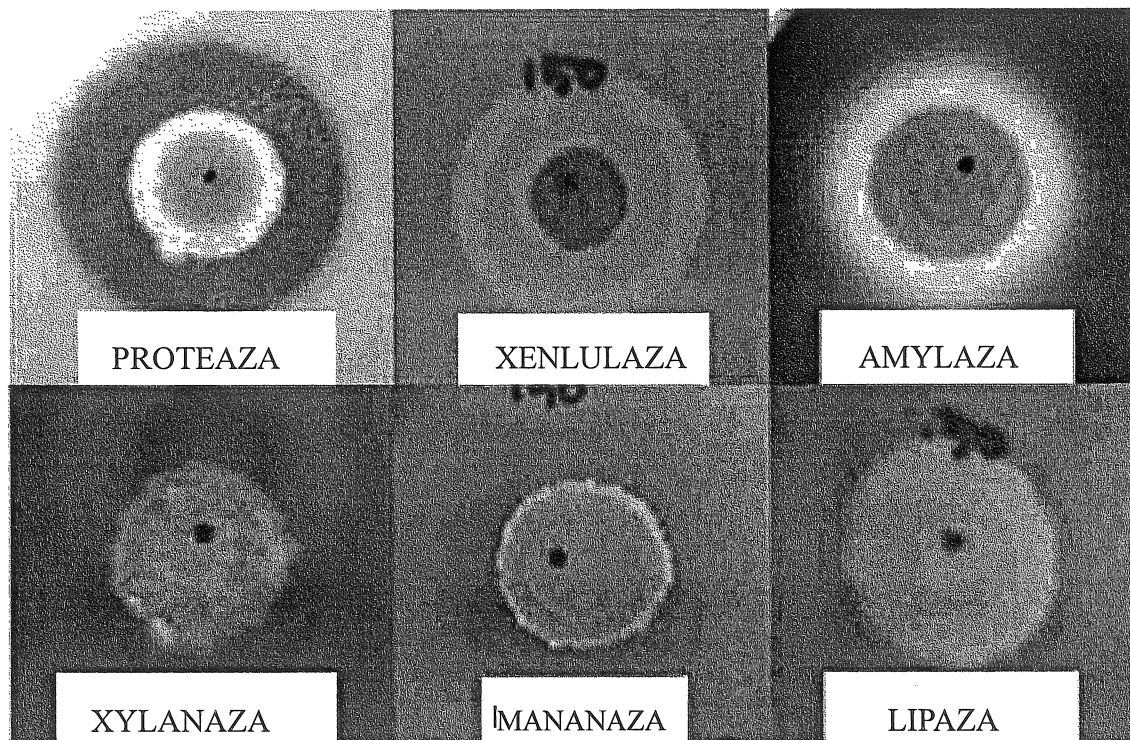
[FIG.1]



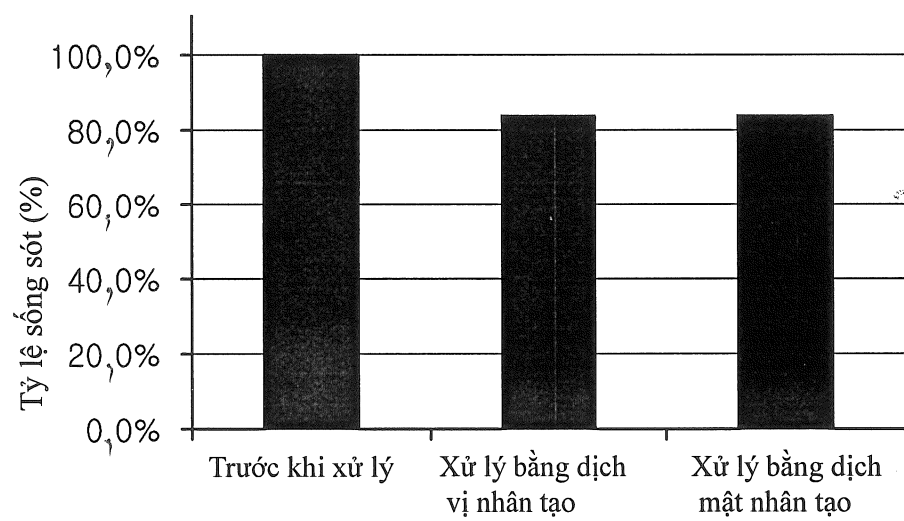
[FI.2]



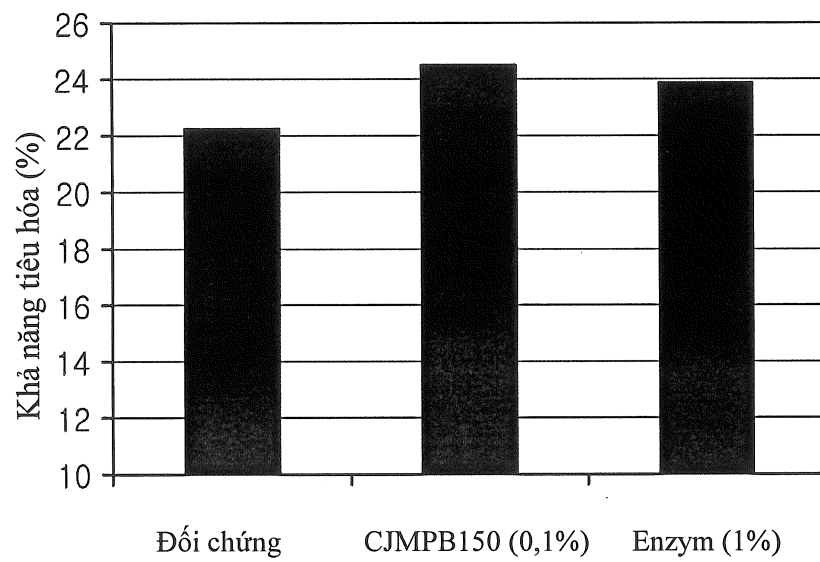
[FIG.3]



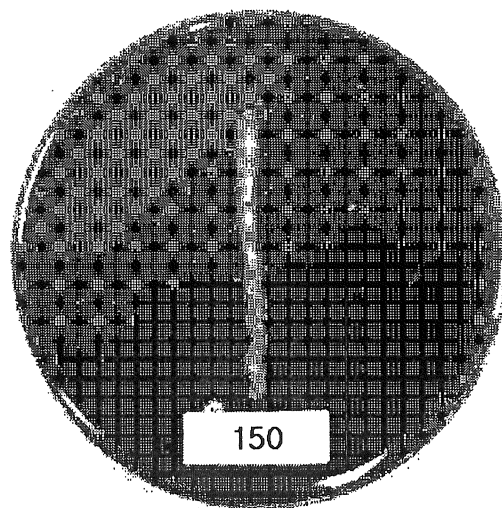
[FIG.4]



[FIG.5]



[FIG.6]



[FIG.7]

SEQ ID NO. 1 :

GTCACTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTA
CAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA
CCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGT
TGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCG
CGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCA
TAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGG
CAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGC
GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCA
TGCACCACCTGTCACCTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTC
AGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCAC
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGC
GACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGG
CGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGAC
CAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCG
CTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAA
TGACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCC
TGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGG