



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0031534

(51)⁸ C12N 1/20; C12R 1/07; A23L 11/00;
A23L 11/20

(13) B

(21) 1-2018-01270

(22) 01/09/2016

(86) PCT/KR2016/009804 01/09/2016

(87) WO2017/039361 09/03/2017

(30) 10-2015-0124820 03/09/2015 KR

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/06/2018 363A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) KIM, Hye Jin (KR); SHIN, Dong Joo (KR); SHIN, Hye Won (KR); JANG, Eun Seok (KR); KANG, Dae Ik (KR); MOON, Byoung Seok (KR); OH, Seon Mi (KR); CHO, Sun A (KR).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHỦNG BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS CJ14-6 ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ MEJU TRUYỀN THỐNG, PHƯƠNG PHÁP CHẾ BIẾN KOJI ĐẬU NÀNH BẰNG CÁCH SỬ DỤNG CHỦNG NÀY VÀ KOJI ĐẬU NÀNH ĐƯỢC CHẾ BIẾN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 được phân lập từ *meju* truyền thống, phương pháp chế biến *koji* đậu nành bằng cách sử dụng chủng này, và *koji* đậu nành được chế biến bằng phương pháp chế biến này. Phương pháp chế biến *koji* đậu nành bao gồm bước ngâm đậu nành trong nước hoặc bổ sung nước vào đậu nành và hấp đậu nành đã ngâm; và cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 vào đậu nành đã hấp, lên men đậu nành đã hấp, và làm khô đậu nành đã lên men để chế biến *koji* đậu nành.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 được phân lập từ món *meju* truyền thống và có hoạt tính proteaza và hoạt tính chống béo phì cao, phương pháp chế biến *koji* đậu nành bằng cách sử dụng chủng mới này và *koji* đậu nành được chế biến bằng phương pháp chế biến này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Meju là thực phẩm lên men dùng làm thành phần cơ bản cho các thực phẩm từ đậu nành lên men truyền thống của Hàn Quốc, như *ganjang* (sốt đậu nành), *gochujang* (tương ớt), và *doenjang* (tương đậu nành). *Meju*, với thành phần chính làm từ đậu nành, cũng là men rất quan trọng để chế biến các đồ gia vị truyền thống của Hàn Quốc, tức là, *ganjang* (sốt đậu nành), *gochujang* (tương ớt đỏ), và *doenjang* (tương đậu nành).

Meju (đậu nành lên men) được phân loại một cách rộng rãi thành *meju* truyền thống, *meju* cải biến, hoặc *koji* công nghiệp (*Kokja*) tùy thuộc vào phương pháp chế biến. *Meju* truyền thống chỉ được chế biến từ đậu nành mà đã được đồ khuôn, gói trong rơm lúa, và sau đó lên men trong khoảng thời gian xác định. *Meju* cải biến được chế biến từ đậu nành hấp và lên men bằng chủng *Aspergillus sp.* *Koji* công nghiệp được chế biến bằng cách lên men hạt lúa mỳ hoặc bột mỳ bằng *Aspergillus oryzae*.

Gochujang (tương ớt đỏ) được phân loại một cách rộng rãi thành *gochujang* truyền thống (kiểu Hàn Quốc) và *gochujang* sản xuất trong nhà máy (cải biến) theo phương pháp chế biến. *Gochujang* truyền thống là đồ gia vị lên men làm từ bột *meju* dùng cho *gochujang* (hỗn hợp đậu nành và hạt theo tỷ lệ nhất định), thành phần tinh bột như gạo nếp, *yeotgireum* (bột mầm đại mạch), muối, và bột ớt, qua lên men và làm ngấu. *Gochujang* chế biến tại nhà máy là *gochujang* làm ngấu bằng diastaza bằng cách sử dụng *koji* với *Aspergillus oryzae* nuôi cấy thay cho bột *meju* dùng cho *gochujang*. Trong việc chế biến *koji*, thành phần protein là đậu nành; và thành phần tinh bột là bột gạo hoặc bột mỳ.

Vì phụ nữ đi làm ngày càng nhiều, ngày càng có nhiều người mua *gochujang* chế biến tại nhà máy. Do đó, việc sản xuất *gochujang* chế biến tại nhà máy ngày càng tăng, và việc xuất khẩu *gochujang* cũng đang tăng lên.

Về phương pháp thông thường để sản xuất *gochujang* chế biến tại nhà máy, bằng sáng chế Hàn Quốc số 10-0668056 bộc lộ *meju* đậu nành và phương pháp chế biến *meju* đậu nành, trong đó các vi sinh vật được nuôi cấy được cấy vào đậu nành để lên men đậu nành. Cụ thể hơn, giải pháp đã biết này mô tả phương pháp chế biến *meju* đậu nành và *meju* đậu nành được chế biến bằng phương pháp này, phương pháp này bao gồm bước hấp và làm khô đậu nành, và bước lên men gồm cấy vi sinh vật đã nuôi cấy được phân lập từ *meju* truyền thống vào đậu nành và sau đó lên men đậu nành trong khoảng thời gian xác định.

Ngay cả khi sử dụng phương pháp này, vẫn còn có nhu cầu phát triển *koji* đậu nành để sản xuất lượng lớn *gochujang* chế biến tại nhà máy.

Tài liệu kỹ thuật viện dẫn

(Tài liệu sáng chế 1) KR 10-0668056 B1 (công bố ngày 11/01/2007)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Trong nỗ lực nghiên cứu sản xuất lượng lớn *gochujang* chế biến tại nhà máy, các tác giả sáng chế đã phát hiện thực tế rằng chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 được chọn từ các chủng có hoạt tính proteaza cao được phân lập từ các đồ gia vị truyền thống có thể được sử dụng để chế biến *koji* đậu nành thích hợp để sản xuất lượng lớn *gochujang* chế biến tại nhà máy, nhờ đó đã thực hiện sáng chế.

Do đó, mục đích của sáng chế là cung cấp chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 được phân lập từ *meju* truyền thống.

Mục đích khác của sáng chế là cung cấp phương pháp chế biến *koji* đậu nành bằng cách sử dụng chủng này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là cung cấp *koji* đậu nành được chế biến bằng phương pháp chế biến này.

Để đạt được các mục đích của sáng chế, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 được phân lập từ *meju* truyền thống và có hoạt tính proteaza và hoạt tính chống béo phì cao được đề xuất.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp chế biến *kaji* đậu nành mà bao gồm bước hấp đậu nành ngâm trong nước hoặc bổ sung nước vào đậu nành và hấp đậu nành đã ngâm hoặc đậu nành đã bổ sung nước; và bước chế biến *kaji* đậu nành gồm việc cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 vào đậu nành đã hấp và lên men đậu nành hấp này.

Sáng chế cũng đề xuất *kaji* đậu nành được chế biến bằng phương pháp chế biến này.

Hiệu quả của sáng chế

Hiệu quả của sáng chế là cho phép sản xuất *gochujang* chế biến tại nhà máy với lượng lớn bằng cách sử dụng chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 được chọn dưới dạng chủng phân lập được từ *meju* truyền thống và có hoạt tính proteaza cao trong chế biến *kaji* đậu nành.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình ảnh các tế bào mỡ ở nhóm đối chứng được nhuộm bằng xanh anilin trong ví dụ thử nghiệm 1.

Fig. 2 là hình ảnh các tế bào mỡ ở nhóm thử nghiệm ví dụ 2 được nhuộm bằng xanh anilin trong ví dụ thử nghiệm 2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề xuất chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 được phân lập từ *meju* truyền thống và có hoạt tính proteaza cao.

Cụ thể hơn, nhiều chủng được phân lập từ *meju* truyền thống của Hàn Quốc. Ở bước chọn lọc thứ nhất trong số nhiều chủng khác nhau, các chủng *Bacillus spp.* Với hoạt tính proteaza cao được phân lập từ môi trường hoạt động; và ở bước chọn lọc thứ hai từ các chủng *Bacillus spp.*, chủng với khả năng phân giải protein cao được tách từ môi trường nuôi cấy rắn có sử dụng đậu nành. Việc giải trình tự rADN 16s được thực hiện để chọn lọc lần cuối chủng *Bacillus spp.*

Chủng *Bacillus spp.* phân lập được ở bước chọn lọc lần cuối được nhận dạng là *Bacillus amyloliquefaciens* (trình tự số 1). Chủng với hoạt tính proteaza cao này được gọi là “*Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6” và được nhận bởi Trung tâm Giống Vi

sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms - KCCM) vào ngày 01/07/2015 (số truy cập KCCM11718P).

Theo phương án thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến *koji* đậu nành mà bao gồm bước hấp đậu nành ngâm trong nước hoặc bổ sung nước vào đậu nành và hấp đậu nành đã ngâm hoặc đậu nành đã bổ sung nước; và bước chế biến *koji* đậu nành gồm việc cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 vào đậu nành đã hấp và lên men đậu nành hấp này.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến *koji* đậu nành bao gồm bước: ngâm đậu nành đã chọn và rửa trong nước hoặc bổ sung nước vào đậu nành đã chọn và rửa; hấp và làm nguội đậu nành; ủ chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 để chuẩn bị môi trường nuôi cấy; và cấy môi trường nuôi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 vào đậu nành nguội và lên men đậu nành để chế biến *koji* đậu nành.

Phương pháp chế biến này có thể bao gồm thêm bước ngâm đậu nành đã chọn và rửa trong nước ngâm được giữ ở nhiệt độ từ 10 đến 50°C trong 1 đến 15 giờ trước bước hấp đậu nành. Đậu nành có thể được hấp bằng hơi bão hòa (1,0 đến 2,0 kgf/cm²) ở nhiệt độ từ 100 đến 150°C trong 1 đến 60 phút. Tuy nhiên, phương pháp hấp theo sáng chế không chỉ giới hạn ở phương pháp đã chỉ rõ này. Đậu nành đã hấp có thể được làm nguội đến khoảng 30 đến 50°C, cụ thể hơn là khoảng 30 đến 35°C.

Đậu nành có thể được hấp trong thiết bị khử trùng bằng hơi áp lực cao (nồi hấp) ở nhiệt độ từ 100 đến 150°C trong 5 đến 15 phút, cụ thể hơn là ở nhiệt độ 110°C trong 10 phút.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 có thể được sử dụng ở dạng bào tử được ủ trong môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy có thể được cấy đều vào đậu nành đã hấp với lượng từ 0,1 đến 3,0% khối lượng với tổng khối lượng nguyên liệu đậu nành.

Môi trường nuôi cấy để ủ chủng này có thể là môi trường sốt đậu nành. Môi trường sốt đậu nành như được sử dụng ở đây có thể được chuẩn bị bằng cách trộn 1 đến 10% sốt đậu nành được chọn từ nhóm gồm sốt đậu nành kiểu Hàn Quốc, sốt đậu nành chế biến tại nhà máy, hoặc sốt đậu nành hỗn hợp và 0,1 đến 10% đường được chọn từ nhóm gồm glucoza, sacaroza, galactoza, và maltoza.

Theo một phương án khác, sáng chế bao gồm việc cấy vào môi trường sốt đậu nành (chứa sốt đậu nành chế biến tại nhà máy và glucoza) bằng chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6, thu được bằng cách phân lập giống thuần và bảo quản, và tiến hành ủ ở khoảng nhiệt độ từ 30 đến 42°C trong 20 đến 42 giờ cho đến khi tạo ra bào tử để chuẩn bị môi trường nuôi cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6.

Sau khi cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6, đậu nành được lên men ở nhiệt độ từ 30 đến 45°C, cụ thể hơn là ở nhiệt độ từ 34 đến 44°C, trong một đến ba ngày để chế biến *koji* đậu nành.

Phương pháp chế biến này có thể bao gồm thêm bước làm khô sau bước lên men.

Theo phương án thứ ba, sáng chế đề xuất *koji* đậu nành được chế biến bằng phương pháp chế biến *koji* đậu nành này.

Koji đậu nành được chế biến bằng phương pháp chế biến theo sáng chế có thể được sử dụng trong sản xuất lượng lớn *gochujang* chế biến tại nhà máy.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết có tham chiếu đến các ví dụ sau, các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm minh họa sáng chế và không được hiểu là để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập chủng từ *meju* truyền thống và nhận dạng chủng

(1) Phân lập chủng và nhận dạng

Chủng được sử dụng làm men để lên men theo sáng chế được phân lập và chọn lọc từ *meju* truyền thống thu được từ những nhà sản xuất thực phẩm truyền thống tại tỉnh Gyeonggi-do, Gangwon-do, Chungbuk, và Chunnam.

Meju truyền thống được pha loãng bằng nước vô trùng, cấy trải lên agar dinh dưỡng (Difco), và nuôi cấy ở 37°C. Năm vi sinh vật sống dưới dạng loài chiếm ưu thế trong *meju* truyền thống được chọn, được phân lập từ *meju* truyền thống bằng phương pháp phân lập qua nuôi cấy thuần, và nhận dạng. Các chủng riêng rẽ lần lượt được đặt tên là 'CJ 3-27', 'CJ 4-4', 'CJ 5-10', 'CJ 14-6', và 'CJ 16-57'.

Các chủng phân lập được nuôi cấy có lắc (ở 200 vòng/phút) trong môi trường dinh dưỡng lỏng (Difco) ở 37°C trong 24 giờ và sau đó đo hoạt tính proteaza. Kết quả nhận dạng và hoạt tính proteaza được thể hiện trên bảng 1.

Bảng 1

Kết quả nhận dạng các chủng phân lập được từ *meju* truyền thống

Các chủng chọn lọc chính	Hoạt tính proteaza (U/g)	Kết quả nhận dạng
CJ 3-27	62,58 ± 0,17	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
CJ 4-4	91,44 ± 6,97	<i>Bacillus licheniformis</i>
CJ 5-10	61,72 ± 4,13	<i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i>
CJ 14-6	140,73 ± 4,62	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
CJ 16-57	222,42 ± 0,63	<i>Bacillus licheniformis</i>

(2) Các chủng chọn lọc chính

Các chủng chọn lọc chính từ các chủng đã phân lập và nhận dạng là các chủng, như CJ 3-27, CJ-4-4, CJ 14-6, và CJ 16-57, không phải CJ 5-10 mà có hoạt tính proteaza thấp nhất.

(3) Các chủng chọn lọc thứ cấp

Bốn chủng được coi là chủng chọn lọc chính được dùng để chế biến *kōji* đậu nành và được đo hoạt tính proteaza. Kết quả đo được thể hiện trên bảng 2. Bằng cách so sánh hoạt tính proteaza, các chủng với hoạt tính proteaza cao được gọi là chủng chọn lọc thứ cấp.

Để chế biến *kōji* đậu nành, 1 kg đậu nành được ngâm trong nước tinh khiết trong 12 giờ, hấp trong thiết bị khử trùng bằng hơi áp lực cao (nồi hấp) ở 110°C trong 10 phút, và sau đó làm nguội xuống 35°C. Mỗi chủng đã phân lập được đưa vào đậu nành nguội với lượng 2,0% khối lượng so với tổng khối lượng nguyên liệu và ủ ở 37°C trong 3 ngày. Các chủng được nuôi cấy như vậy được dùng để chế biến *kōji* đậu nành riêng rẽ.

Để đo hoạt tính proteaza, mỗi *kōji* đậu nành được chiết và lọc ở 30°C trong một giờ, và dịch lọc được dùng làm dung dịch coenzym. Dung dịch phản ứng enzym được chuẩn bị bằng cách bổ sung 0,5 ml dung dịch coenzym, 1,5 ml casein sữa 2% làm cơ chất, và 1 ml đệm McIlvin (độ pH = 6,0) và tiến hành phản ứng enzym ở 38°C trong một giờ. Sau đó, 3 ml dung dịch TCA 0,4M được bổ sung vào để tạm ngừng phản ứng, và sau khi lọc, dung dịch phản ứng được trộn với 5 ml Na₂CO₃ 0,4M và 1 ml chất phản ứng phenol. Dung dịch thu được được hiện màu ở 38°C trong 30 phút, và độ hấp thụ ở 660 nm được xác định bằng quang phổ kế. Để thể hiện hoạt tính enzym,

lượng enzym tạo ra tyrosin tương ứng với 1 μg trong một phút được xác định là một đơn vị. Tyrosin được dùng làm chất tham chiếu để tạo ra đường cong hiệu chuẩn.

Bảng 2

So sánh hoạt tính proteaza đối với *kaji* đậu nành bằng cách sử dụng các chủng chọn lọc chính

Các chủng chọn lọc chính	Hoạt tính proteaza (U/g)
CJ 3-27	258
CJ 4-4	118
CJ 14-6	225
CJ 16-57	155

Từ kết quả trên bảng 2, các chủng CJ 3-27 và CJ 14-6 với hoạt tính proteaza cao được chọn.

(4) Bước chọn lọc thứ ba: Hoạt tính chống béo phì *in vitro* của 3T3-L1

(A) Dòng tế bào

Như đối với các tế bào mỡ biệt hóa, các tế bào 3T3-L1, dòng tế bào sợi phôi chuột nhắt được mua từ ngân hàng dòng tế bào Hàn Quốc (Korean Cell Line Bank - KCLB).

(B) Nuôi cấy tế bào

Việc nuôi cấy các tế bào 3T3-L1 được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy DMEM chứa 10% BCS và 1% penixilin-streptomycin. Các tế bào, khi đã tăng sinh đến 70% đĩa nuôi cấy, được tách bằng cách ly tâm ở 1000 vòng/phút và nuôi cấy thứ cấp với tỷ lệ 1:5.

(C) Thử nghiệm MTT

Dựa trên khả năng phản ứng với MTT và tạo ra tinh thể MTT formazan màu xanh sẫm của dehydrogenaza ti thể tế bào sống, thử nghiệm MTT được thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Carmichael và các đồng tác giả. 500 μl tế bào 3T3-L1 trên mỗi giếng được đưa vào đĩa 48-giếng ở nồng độ $1,5 \times 10^4/\text{ml}$ và ủ trong máy ủ (37°C , 5% CO_2) trong 24 giờ để cố định các tế bào vào đáy của đĩa. Vào ngày hôm sau, mẫu được bơm vào từng giếng đến nồng độ cuối 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, hoặc 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sau khi ủ trong 24 giờ, môi trường chứa mẫu được điều chỉnh đến 5 mg/ml và dung dịch thiazolyl xanh tetrazoli bromua được bổ sung vào theo tỷ lệ 50 μl mỗi giếng đến nồng độ cuối 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Các tế bào được ủ trong máy ủ (37°C , 5% CO_2) trong 4

giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, môi trường chứa chất phản ứng MTT được lấy ra, và 300 μ l dimetyl sulfoxit (DMSO) được bổ sung vào để hòa tan tinh thể MTT-formazan, mà đã được hiện màu trong 5 phút để đo độ hấp thụ ở 540 nm bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa ELISA.

(D) Cảm ứng sự biệt hóa tế bào 3T3-L1

Để cảm ứng sự biệt hóa tế bào, các tế bào được đưa vào đĩa 6-giếng với nồng độ $2,5 \times 10^4$ tế bào/ml và ủ trong môi trường nuôi cấy DMEM chứa 10% FBS và 1% penixilin-streptomycin trong máy ủ (37°C , 5% CO_2) trong 4 ngày đến khi các tế bào chuyển sang trạng thái sau hợp dòng. Đối chứng dương được sử dụng trong thử nghiệm chống béo phì là resveratrol có khả năng ức chế sự biệt hóa các tế bào mỡ tiền thân, đẩy nhanh sự phân giải mỡ, và ngăn chặn sự sinh mỡ bằng cách cảm ứng sự ‘tự chết’ tự định hướng của các tế bào mỡ trưởng thành.

Vào ngày 0, các tế bào ở trạng thái sau hợp dòng được xử lý bằng môi trường cảm ứng sự biệt hóa chứa 10% FBS, 1% penixilin-streptomycin, 5 $\mu\text{g/ml}$ insulin, 1 μM dexamethason (DMS), và 0,5 mM (3-isobutyl-1-metyl-xanthin (IBMX) trong 72 giờ. Vào ngày thứ 3 và ngày thứ 5, các tế bào được ủ với môi trường nuôi cấy DMEM hoạt hóa sự biệt hóa chứa 10% FBS, 1% penixilin-streptomycin, và 10 $\mu\text{g/ml}$ INS. Bắt cứ khi nào môi trường được thay thế, tất cả các mẫu được xử lý để có nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, hoặc 0 $\mu\text{g/ml}$ và điều chỉnh đến nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ để làm đối chứng dương.

(E) Nhuộm Oil Red O và định lượng

Để xác định mức độ biệt hóa của các tế bào 3T3-L1 trong quá trình ủ, các tế bào được nhuộm bằng chất phản ứng Oil Red O để nhuộm các giọt nhỏ lipid theo phương pháp cải biến từ phương pháp được mô tả bởi Rene và các đồng tác giả, và Kasturi và các đồng tác giả vào ngày thứ 7, tức là ngày biệt hóa cuối.

Các tế bào đang biệt hóa được cố định trong mỗi giếng chứa 4% para-formaldehyt (trong PBS) bằng phản ứng ở nhiệt độ phòng trong một giờ hoặc lâu hơn. Các tế bào được lấy ra khỏi dung dịch cố định và nhuộm bằng 0,5% Oil Red O trong một giờ. Để loại bỏ thuốc nhuộm còn lại, các tế bào được rửa bằng nước chảy hai lần đến khi không còn chất phản ứng nhuộm. Các giọt nhỏ lipid đã nhuộm được hòa tan trong isopropanol và đo độ hấp thụ ở 510 nm.

Hoạt tính chống béo phì in-vitro được xác định bằng cách so sánh hoạt tính ức chế sự biệt hóa tế bào mỡ giữa hai chủng *Bacillus amyloliquefaciens*, CJ 3-27 và CJ 14-6, mà đã chứng tỏ là có hoạt tính proteaza cao.

Bảng 3

Tỷ lệ ức chế sự biệt hóa tế bào mỡ của các chủng chọn lọc thứ cấp

Các chủng	Nồng độ môi trường nuôi cấy ($\mu\text{g/ml}$)	Tỷ lệ ức chế sự biệt hóa (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CJ 3-27	25	10,10
	50	6,98
	100	3,37
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CJ 14-6	25	20,57*
	50	26,41*
	100	36,61*

Hiệu chuẩn thống kê: kiểm định student-T

*: $P < 0,05$

Như có thể thấy từ kết quả trong bảng 3, môi trường nuôi cấy chủng CJ 14-6 thể hiện mức tỷ lệ ức chế sự biệt hóa tế bào mỡ đáng kể, trong khi môi trường nuôi cấy chủng CJ 3-27 không có sự thay đổi đáng kể về tỷ lệ ức chế sự biệt hóa tế bào mỡ.

Ví dụ 2: Chế biến *kaji* đậu nành

Chủng được chọn trong bước chọn lọc chủng mới lần cuối theo ví dụ này, *Bacillus amyloliquefaciens* CJ 14-6, được sử dụng làm thành phần men để chế biến *kaji* đậu nành theo phương pháp chế biến được đưa ra trong ví dụ 1-(1).

Để so sánh với *kaji* đậu nành thông thường bằng cách sử dụng *Aspergillus oryzae*, *kaji* đậu nành được chế biến bằng cách sử dụng *Aspergillus oryzae* có bán trên thị trường bởi Chungmoo Fermentation Co. làm thành phần men theo phương pháp chế biến được đưa ra trong ví dụ 1-(1).

(1) Xác định hoạt tính proteaza

Mỗi *kaji* đậu nành được đo hoạt tính proteaza. Kết quả đo được thể hiện trên bảng 4.

Bảng 4

Hoạt tính enzym của *kōji* đậu nành bằng cách sử dụng chủng mới *Bacillus amyloliquefaciens* CJ 14-6 và chủng thông thường *Aspergillus oryzae*

Các chủng	Hoạt tính proteaza (U/g)
Chủng mới <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CJ 14-6	225
Chủng thông thường <i>Aspergillus oryzae</i>	102

Như có thể thấy từ kết quả trong bảng 4, *kōji* đậu nành sử dụng chủng mới *Bacillus amyloliquefaciens* CJ 14-6 có hoạt tính proteaza cao hơn 120,6% so với *kōji* đậu nành sử dụng chủng thông thường *Aspergillus oryzae*. Điều này thể hiện rằng việc sử dụng *kōji* đậu nành dùng chủng mới *Bacillus amyloliquefaciens* CJ 14-6 có thể thúc đẩy hoạt tính phân hủy protein khi được dùng trong *gochujang* hoặc *doenjang* và góp phần tăng cường chất lượng vị giác.

Ví dụ thử nghiệm 1: Xác định hiệu quả chống béo phì của *kōji* đậu nành sử dụng chủng mới (CJ 14-6)

Thử nghiệm trên động vật được tiến hành để đánh giá hiệu quả chống béo phì của *kōji* đậu nành sử dụng chủng mới *Bacillus amyloliquefaciens* CJ 14-6. Các động vật được sử dụng trong thử nghiệm là chuột cống trắng đực (chuột cống S.D., 5 tuần tuổi), được mua từ hãng Damool Science (South Korea) và giữ trong chuồng sinh thái ở $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ trong điều kiện chiếu sáng theo chu kỳ 12 giờ (từ 08:00 đến 20:00).

Các đối tượng chuột được chia thành hai nhóm, mỗi nhóm gồm bảy đối tượng. Ở nhóm đối chứng, 20% mỡ lợn được bổ sung và thức ăn dạng bột cho chuột cống trắng, và các đối tượng chuột được cho ăn theo chế độ ăn giàu chất béo. Ở nhóm ví dụ 2, các đối tượng chuột được cho ăn 0,91% *kōji* đậu nành dùng chủng mới theo sáng chế theo cùng chế độ ăn giàu chất béo. Khối lượng của đối tượng chuột và khối lượng mô mỡ của đối tượng chuột lần lượt được thể hiện trong bảng 5 và 6.

Khối lượng và lượng ăn được xác định hằng tuần, và khối lượng mô mỡ và hàm lượng lipid được xác định sau khi cho nhịn ăn 12 giờ trước khi kết thúc thử nghiệm. Máu thu thập được được tách bằng ly tâm ở $1900 \times G$ trong 20 phút để tách huyết thanh, mà được sử dụng làm mẫu để xác định hàm lượng lipid trong huyết thanh. Để phân tích hàm lượng lipid tổng, hàm lượng chất béo trung tính, và tổng hàm lượng cholesterol của mô gan và mô mỡ, cloroform-metanol (2:1, v/v) được bổ sung vào

0,1g mô gan và mô mỡ đã thu thập, mà sau đó được giữ trong tủ lạnh trong 3 ngày và ngâm trong nước cất. Mô gan và mô mỡ được tách bằng ly tâm ở 1150 x G trong 20 phút và xác định tổng hàm lượng lipid trong lớp lipid, tức là lớp đáy. Mô lipid được pha loãng và sử dụng để xác định tổng hàm lượng cholesterol và hàm lượng chất béo trung tính. Hàm lượng lipid trong huyết thanh và các mô thông qua việc phân tích hàm lượng được thể hiện trong bảng 7 đến 10.

Để xác định hoạt tính enzym có liên quan đến sự sinh tổng hợp axit béo trong mô mỡ, đệm kali phosphat 0,1M (độ pH=7,4, 37°C) với thể tích gấp ba lần khối lượng mô mỡ được bổ sung vào, và sau khi đồng hóa, mô mỡ được tách bằng cách ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi thu được bằng cách này được tách bằng ly tâm ở 15000 vòng/phút trong 30 phút để thu được dịch nổi thứ hai. Số đo hoạt tính enzym được thể hiện trong bảng 11 và 12.

Để xác định kích thước tế bào mỡ, các tế bào mỡ thu được được cố định bằng dung dịch Bouin để tạo ra khối parafin, mà được cắt thành các lát cắt và nhuộm bằng thuốc nhuộm xanh anilin. Sau đó, chụp ảnh tế bào mỡ bằng kính hiển vi điện tử để so sánh các tế bào mỡ trong từng vùng được điều trị.

Bảng 5

Các nhóm	Khối lượng cơ thể ban đầu (g)	Khối lượng cơ thể cuối (g)	Độ tăng khối lượng cơ thể (g/ngày)	Lượng ăn hằng ngày (g/ngày)
Nhóm đối chứng	171,79	544,00	6,84±0,40	17,49±0,80
Nhóm ví dụ-2	172,57	513,29	6,26±0,40	17,33±1,78

Bảng 6

Các nhóm	Khối lượng mô mỡ (g/100g khối lượng cơ thể)		
	Chất béo trong mào tinh hoàn	Chất béo quanh thận	Tổng lượng chất béo trắng
Nhóm đối chứng	2,43	0,78	6,80
Nhóm ví dụ-2	2,24	0,65	6,29

Bảng 7

Các nhóm	Hàm lượng lipid trong huyết thanh (mg/dl)		
	Chất béo trung tính	Tổng lượng cholesterol	LDL-cholesterol
Nhóm đối chứng	225,57±25,64	128,43±12,92	125,40±15,43
Nhóm ví dụ-2	152,57±10,21***	95,86±8,28***	63,66±8,75***

Bảng 8

Các nhóm	Hàm lượng lipid trong mô gan (mg/g)		
	Tổng lượng chất béo	Chất béo trung tính	Tổng lượng cholesterol
Nhóm đối chứng	247,02±21,87	94,91±18,43	360,45±57,55
Nhóm ví dụ-2	220,99±16,77*	64,57±3,00**	292,48±76,68

Bảng 9

Các nhóm	Hàm lượng lipid trong mô mỡ mào tinh hoàn (mg/g)		
	Tổng lượng chất béo	Chất béo trung tính	Tổng lượng cholesterol
Nhóm đối chứng	501,55±57,14	166,15±16,18	294,90±15,00
Nhóm ví dụ-2	459,50±35,17	118,44±18,44***	250,48±26,74**

Bảng 10

Các nhóm	Hàm lượng lipid trong mô mỡ màng treo ruột (mg/g)		
	Tổng lượng chất béo	Chất béo trung tính	Tổng lượng cholesterol
Nhóm đối chứng	412,22±37,59	122,01±6,02	178,23±24,41
Nhóm ví dụ-2	368,37±23,66*	108,81±9,02**	147,77±12,72*

Bảng 11

Các nhóm	Enzym liên quan đến sự tổng hợp axit béo trong mô gan (nmol/phút/mg protein)		
	FAS	ME	G6PDH
Nhóm đối chứng	12,22±1,07	31,47±1,39	24,68±1,45
Nhóm ví dụ-2	9,77±0,54	26,96±1,74	17,31±1,19**

Bảng 12

Các nhóm	Enzym liên quan đến sự tổng hợp axit béo trong mô mỡ (nmol/phút/mg protein)		
	FAS	ME	G6PDH
Nhóm đối chứng	7,29±0,59	8,00±0,31	24,62±1,26
Nhóm ví dụ-2	5,35±0,35*	5,51±0,62**	20,21±1,30*

Bảng 13

Các nhóm	Nhóm đối chứng	Nhóm ví dụ-2
Ảnh chụp tế bào mỡ	Xem Fig. 1	Xem Fig. 2
Kích thước tế bào mỡ (μm^2)	21,41 $\pm$ 2,45	18,18 $\pm$ 1,11

Bảng 14

Các nhóm	Các yếu tố chỉ thị sự tích tụ chất béo trong cơ thể		
	Leptin ($\mu\text{g/ml}$)	HR-LPL (đơn vị/g)	TE-LPL (đơn vị/g)
Nhóm đối chứng	5,75 $\pm$ 0,70	7,03 $\pm$ 1,08	36,12 $\pm$ 5,50
Nhóm ví dụ-2	3,97 $\pm$ 0,17***	4,30 $\pm$ 1,06**	22,74 $\pm$ 2,08***

Hiệu chuẩn thống kê: kiểm định student-T

*: $P < 0,05$

**: $P < 0,01$

***: $P < 0,001$

Như có thể thấy từ kết quả trong bảng 5, nhóm ví dụ 2 có độ tăng khối lượng cơ thể chiếm không quá 91,5% độ tăng khối lượng cơ thể của nhóm đối chứng. Theo các kết quả được thể hiện trong bảng 6, nhóm ví dụ 2 có khối lượng mô mỡ quanh thận thấp hơn so với nhóm đối chứng; do vậy khối lượng mô mỡ quanh thận của nhóm ví dụ 2 chiếm không quá 83,3% so với khối lượng mô mỡ quanh thận của nhóm đối chứng.

Theo đó, kết quả của ví dụ này thể hiện rằng *kaji* đậu nành sử dụng chủng mới (CJ 14-6) tạo ra hiệu quả giảm khối lượng cơ thể.

Số truy cập

Viện lưu trữ: Trung tâm Giống Vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms) (nước ngoài)

Số truy cập: KCCM11718P

Ngày lưu trữ: 01/07/2015

Số hồ sơ của chủ đơn hoặc đại diện PP16-0112	Đơn quốc tế số
---	----------------

**CHỈ ĐỊNH LIÊN QUAN ĐẾN VI SINH VẬT ĐƯỢC LƯU TRỮ
HOẶC VẬT LIỆU SINH HỌC KHÁC**
(Quy tắc 13bis PCT)

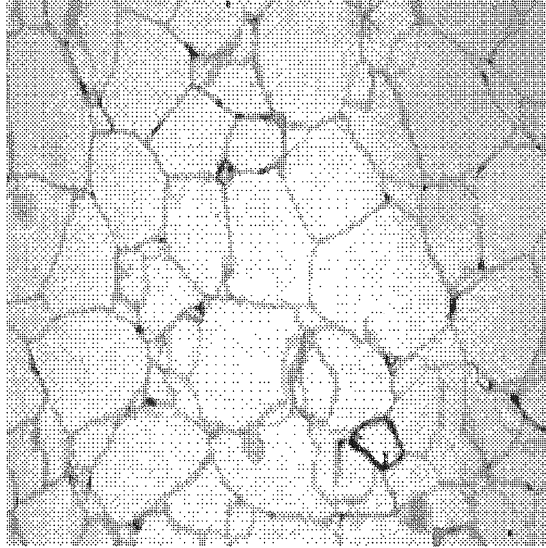
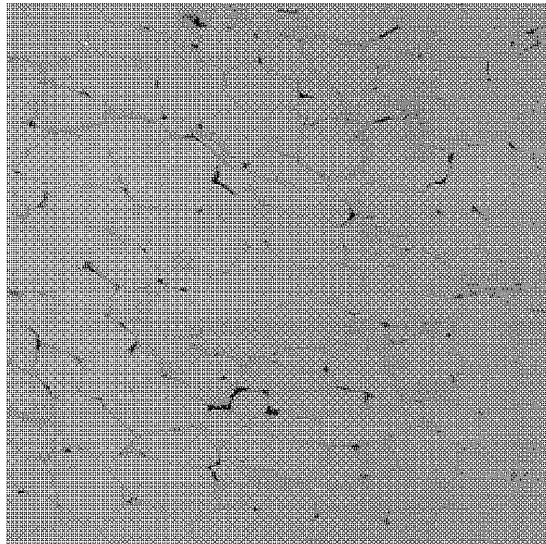
A. Các chỉ định đưa ra sau đây liên quan đến vi sinh vật được lưu trữ hoặc các vật liệu sinh học khác được đề cập đến trong phần mô tả trang 11, dòng 25.	
B. NHẬN DẠNG MẪU LƯU TRỮ Các mẫu lưu trữ khác được nhận dạng ở trang bổ sung	
Tên viện lưu trữ Trung tâm Giống Vi sinh vật Hàn Quốc	
Địa chỉ viện lưu trữ (<i>bao gồm mã bưu chính và nước</i>) Trung tâm giống vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) Yoorim Bldg. 45 Hongjenae 2-ga, Seodaemoon-gu, Seoul, 120-861, Rep. of Korea	
Ngày lưu trữ 01/07/2015	Số truy cập KCCM 11718P
C. CÁC CHỈ ĐỊNH KHÁC (<i>bỏ trống nếu không áp dụng</i>) Thông tin này được tiếp tục ở trang bổ sung	
D. CÁC QUỐC GIA ĐƯỢC CHỈ ĐỊNH (<i>nếu các chỉ định này không phải là cho mọi quốc gia được chỉ định</i>)	
E. CUNG CẤP CHỈ ĐỊNH RIÊNG (<i>để trống nếu không áp dụng</i>)	
Các chỉ định được liệt kê dưới đây sẽ được nộp cho Văn phòng quốc tế sau (<i>ghi rõ bản chất chung của các chỉ định ví dụ, "Số truy cập của mẫu lưu trữ"</i>)	

Chỉ dành cho Văn phòng nhận đơn Tờ khai này được nhận cùng với đơn quốc tế		Chỉ dành cho Văn phòng quốc tế Tờ khai này được nhận bởi Văn phòng quốc tế vào ngày:
Cán bộ có thẩm quyền		Cán bộ có thẩm quyền

Mẫu PCT/RO/134 (07/1998; in lại 01/2004)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ 14-6 (KCCM 11718P) được phân lập từ *meju* truyền thống và có hoạt tính proteaza và hoạt tính chống béo phì cao.
2. Phương pháp chế biến *koji* đậu nành bao gồm bước:
ngâm đậu nành trong nước hoặc bổ sung nước vào đậu nành, và hấp đậu nành; và cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ 14-6 theo điểm 1 vào đậu nành đã hấp và lên men đậu nành này để chế biến *koji* đậu nành.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này bao gồm thêm bước ngâm đậu nành đã chọn và rửa ở 10 đến 50°C trong 1 đến 15 giờ trước bước hấp, trong đó bước hấp bao gồm đẩy hơi bão hòa ở 1,0 đến 2,0 kgf/cm² để hấp đậu nành ở 100 đến 150°C trong 1 đến 60 phút, và trong đó phương pháp này còn bao gồm bước làm nguội đậu nành đã hấp xuống 30 đến 50°C sau bước hấp.
4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bước hấp được tiến hành trong thiết bị khử trùng bằng hơi áp lực cao (nồi hấp) ở 100 đến 150°C trong 5 đến 15 phút.
5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ 14-6 được cấy vào đậu nành đã hấp với lượng từ 0,1 đến 3,0% khối lượng so với tổng khối lượng các nguyên liệu thô.
6. *Koji* đậu nành được chế biến bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5.
7. *Koji* đậu nành có hoạt tính chống béo phì được chế biến bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5.

Fig. 1**Fig. 2**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ14-6 được phân lập từ *meju* truyền thống, phương pháp chế biến *koji* đậu nành bằng cách sử dụng chủng này và *koji* đậu nành được chế biến bằng phương pháp này

<130> PP16-0112

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1418

<212> ADN

<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<400> 1
 agtcgagcgg acagatggga gcttgctccc tgatgttagc ggcggacggg tgagtaacac
 60
 gtgggtaacc tgctgtgaag actgggataa ctccgggaaa ccgggggctaa taccggatgg
 120
 ttgtttgaac cgcattggttc agacataaaa ggtggcttcg gctaccactt acagatggac
 180
 ccgcggcgca ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcgacgat gcgtagccga
 240
 cctgagaggg tgatcggcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca
 300
 gcagtaggga atcttccgca atggacgaaa gtctgacgga gcaacgccgc gtgagtgatg
 360
 aaggttttcg gatcgtaaag ctctgttggt agggagaagc aagtgccgtt caaatagggc
 420
 ggcacctga cggtagctaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta
 480
 atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggaatt attgggcgta aagggtcgc aggcggtttc
 540
 ttaagtctga tgtgaaagcc cccgggtcaa ccggggaggg tcattggaaa ctggggaact
 600
 tgagtgcaga agaggagagt gggagtagca cgtgtagcgg tgacatgcgt agagatgtgg
 660
 aggaacacca gtggcgaagg cgactctctg gtctgtaact gacgctgagg agcgacagcg
 720
 tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaaccgat agtgataagt
 780

gttagggggt ttccgccctt tagtgctgca gctaacgcat taagcactcc gcctggggag
840

tacgggtcgca agagtgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat
900

gtggtttaat tagaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct ctgacaatcc
960

tagagatagg acgtcccctt cgggggcaga gtgacagggtg gagcatgggt gtcgtcagct
1020

cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccttgatt ttagttgcca
1080

gcattcagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtgggggatga
1140

cgtcaaata tcatgccctt tatgacctgg gttacacacg tgttacaatg gacagaacaa
1200

agggcagcga aaccgcgagg ttaagccaat cccacaaatc tgttttcagt tcggatcgca
1260

gtctgcaact cgactgcgtg aagctggaat cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg
1320

tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtctctc cacgagagtt tgtaacaccc
1380

gaagtcgggtg aggtaacctt ttaggagcca gccgccga
1418