



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003340

(51) **C12N 1/00; C12R 1/07**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00037

(22) 14/11/2019

(67) 1-2019-06379

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/05/2021 398

(73) Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học - Đại học Quốc Gia Hà Nội (VN)
Nhà E2, 144 đường Xuân Thủy, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Trịnh Thị Vân Anh (VN); Hoàng Văn Vinh (VN).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) **CHỦNG VI SINH BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS VTCC 910051 VÀ CHẾ PHẨM
VI SINH CHỨA CHỦNG NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ các mẫu phế thải vỏ tôm và các chế phẩm vi sinh chứa chủng này dùng làm nguyên liệu cho các ngành phân bón, xử lý chất thải và các quy trình công nghiệp khác. Chủng VTCC 910051 theo giải pháp hữu ích có khả năng tổng hợp các enzym CMCaza, proteaza, α -amylaza với hoạt tính cao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi sinh *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sản sinh các enzym carboxymetyl xenlulaza (CMCaza), caseinaza, α -amylaza với hoạt tính cao và chế phẩm vi sinh chứa chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bacillus amyloliquefaciens (*B. amyloliquefaciens*) là vi khuẩn hình que gram dương có mặt trong đất, có quan hệ gần gũi với *Bacillus subtilis*. *B. amyloliquefaciens* thường tồn tại thành dạng chuỗi, khác với các loài *Bacillus* khác thường tồn tại thành các tế bào đơn lẻ. Nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của tế bào là từ 30 đến 40°C. Giống như các loài *Bacillus* khác, *B. amyloliquefaciens* tạo thành nội bào tử ở trung tâm tế bào cho phép chúng tồn tại trong một thời gian dài.

Từ năm 1940–1980, các nhà vi khuẩn học tranh luận về việc liệu *B. amyloliquefaciens* được coi là một loài riêng biệt hay là một loài phụ của *Bacillus subtilis*. Chỉ đến năm 1987, *B. amyloliquefaciens* mới được đồng ý để trở thành một loài riêng biệt. Từ đó đến nay, nhiều chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập từ các hệ sinh thái khác nhau ở các vùng địa lý khác nhau đã được công bố.

B. amyloliquefaciens được biết đến với nhiều ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm thương mại như sản xuất enzym công nghiệp. Enzym từ *Bacillus amyloliquefaciens* như amylaza, cellulaza, proteaza và lipaza có nhiều đặc tính quý như khả năng hoạt động tốt trong dải pH rộng và bền nhiệt. Do đó, enzym từ *Bacillus amyloliquefaciens* đã được ứng dụng nhiều trong công nghiệp chế biến thực phẩm, công nghiệp dệt may, công nghiệp giấy và công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa. Từ những năm 1943, *B. amyloliquefaciens* đã được sử dụng để sản xuất 2 loại enzym cung cấp trên thị trường là α -amylaza và proteaza, cung cấp cho thị trường sản xuất chất tẩy rửa.

Trong số các đặc điểm nêu trên, khả năng sinh tổng hợp các enzym thủy phân là đặc tính đáng chú ý nhất với nhiều ứng dụng nhất. Các enzym thủy phân do *B. amyloliquefaciens* sinh tổng hợp được bao gồm amylaza, proteaza, CMCaza, phytaza,

xylanaza, v.v. với amylaza, proteaza, và CMCaza là các enzym quan trọng nhất nhờ đặc tính thủy phân tinh bột, protein và chất xơ, là các thành phần chủ yếu trong khẩu phần ăn hàng ngày của con người cũng như động vật, của chúng.

Với những đặc điểm nêu trên, *B. amyloliquefaciens* được ứng dụng nhiều trong y học, nông nghiệp và trong công nghiệp thực phẩm dưới dạng chế phẩm sinh học hay còn gọi là probiotic, chứa các vi sinh vật sống có tác dụng làm cải thiện hệ vi sinh vật ở cơ thể vật chủ. Ở nước ta, *B. amyloliquefaciens* hiện đang được sử dụng dưới dạng chế phẩm probiotic hỗ trợ tiêu hóa sử dụng trực tiếp hoặc gián tiếp bằng cách bổ sung vào thức ăn và nước uống dùng cho người và vật nuôi. Ngoài ra, *B. amyloliquefaciens* còn được sử dụng để xử lý môi trường nước trong nuôi trồng thủy sản. Mặc dù có rất nhiều ứng dụng, nhưng hiện tại nguồn cung cấp *B. amyloliquefaciens* ở nước ta chủ yếu là nhập khẩu từ nước ngoài. Điều này làm cho chi phí sản xuất chế phẩm sinh học chứa *B. amyloliquefaciens* tăng cao dẫn đến giá thành cao. Do đó, yêu cầu đặt ra là có nguồn cung cấp *B. amyloliquefaciens* dồi dào với giá thành vừa phải. Từ nhiệm vụ đó, nhóm tác giả đã triển khai các nghiên cứu để phân lập, tuyển chọn các chủng *B. amyloliquefaciens* có hoạt tính enzym cao, nhằm tạo nên các chế phẩm thương mại chất lượng cao dựa trên các nguyên liệu trong nước, hạn chế nhập khẩu.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất chủng *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sản sinh các enzym như CMCaza, proteaza, α -amylaza, v.v. có hoạt tính cao, và có hoạt tính kháng khuẩn với nhiều ứng dụng trong thực tế.

Mục đích khác của giải pháp hữu ích là đề xuất chế phẩm vi sinh có chứa chủng *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051 ứng dụng vào việc sinh ra các enzym để áp dụng vào các quy trình xử lý các sản phẩm công nghiệp ví dụ như loại bỏ protein từ vỏ tôm, ứng dụng chủng *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051 vào các chế phẩm xử lý nước thải và phân bón.

Các dấu hiệu và các đặc điểm nổi bật của giải pháp hữu ích sẽ được hiểu đầy đủ và được đánh giá đúng từ phần mô tả chi tiết sau đây dựa trên các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng VTCC 910051 khi được cấy ria trên

môi trường B1 ở nhiệt độ 37°C;

Fig.2 thể hiện hình thái học tế bào của chủng VTCC 910051 dưới kính hiển vi;

Fig.3 thể hiện kết quả điện di kiểm tra đoạn gen 16S rARN của chủng VTCC 910051;

Fig.4 thể hiện cây phát sinh chủng VTCC 910051 theo giải pháp hữu ích;

Các Fig.5 là các hình ảnh thể hiện hoạt tính enzym của chủng VTCC 910051 và các chủng vi sinh vật đối chứng, trong đó Fig.5A thể hiện hoạt tính enzym CMCaza, Fig.5B thể hiện hoạt tính enzym amylaza, và Fig.5C thể hiện hoạt tính enzym proteaza; và

Các Fig.6 là các hình ảnh thể hiện hoạt tính kháng khuẩn của VTCC 910051 và các chủng vi sinh vật đối chứng, trong đó Fig.6A thể hiện hoạt tính kháng *E. Coli*, và Fig.6B thể hiện hoạt tính kháng *Micrococcus* sp..

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được thể hiện rõ ràng hơn trong phần mô tả chi tiết các phương án thực hiện sau đây. Tuy nhiên, giải pháp hữu ích không bị giới hạn ở các phương án đó.

Theo giải pháp hữu ích, các môi trường dinh dưỡng được sử dụng bao gồm:

1. Môi trường thạch B1: cao nấm men 2 g, cao thịt 2 g, pepton 10 g; NaCl 3 g; KCl 2 g; MgSO₄·7H₂O 0,24 g; thạch 16 g; nước cất vừa đủ 1000 ml; độ pH 7,0; hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút.

2. Môi trường canh B1: cao nấm men 2 g, cao thịt 2 g, pepton 10 g; NaCl 3 g; KCl 2 g; MgSO₄·7H₂O 0,24 g; nước cất vừa đủ 1000 ml; độ pH 7,0; hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút.

3. Môi trường tạo bào tử DSM (Difco Sporulation Medium): Canh dinh dưỡng Difco 8 g; KCl 1 g; MgSO₄·7H₂O 0,25 g; nước cất vừa đủ 1000 ml; độ pH 7,0; hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút, để nguội đến 50-60°C; trước khi sử dụng bổ sung 1 ml Ca(NO₃)₂ 1M, 1 ml MnCl₂ 0,01M, và 1 ml FeSO₄ 1mM.

Theo một phương án, giải pháp hữu ích đề xuất chủng *B. amyloliquefaciens* thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ các mẫu phế liệu vỏ tôm.

Phân lập và định danh chủng *B. amyloliquefaciens* VTCC 910051

Tiến hành phân lập chủng vi sinh từ các mẫu phế thải vỏ tôm bằng cách nuôi cấy trên đĩa chứa môi trường dinh dưỡng thích hợp để tạo khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn có trong mẫu, từ đó thu được các chủng vi sinh thuần khiết. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng thực hiện việc chọn môi trường và các thao tác nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong quá trình phân lập này. Môi trường thường được dùng trong quá trình phân lập được đề cập ở đây là môi trường B1.

Sau một thời gian nuôi cấy nhất định, quan sát thấy có sự xuất hiện của các khuẩn lạc riêng lẻ có đặc điểm hình thái có dạng hình tròn, mép trơn nhẵn, bề mặt khô màu trắng sữa, và không tiết sắc tố ra môi trường như được thể hiện trên Fig.1 và được đặt tên là VTCC 910051. Trong số các khuẩn lạc đó, lựa chọn một khuẩn lạc đặc trưng nhất, cấy vào ống thạch nghiêng B1 để lưu chủng cho phần định danh và các thử nghiệm tiếp theo.

Cấy chuyển chủng VTCC 910051 vào đĩa petri chứa môi trường thạch B1, sau khi phát triển ổn định, tiến hành nhuộm gram và chụp soi dưới kính hiển vi, cho thấy hình ảnh hình thái học tế bào như được thể hiện trên Fig.2, đây là vi khuẩn hình que gram dương. Dựa vào đặc điểm hình thái học của khuẩn lạc và tế bào như trên, có thể sơ bộ xác định được chủng VTCC 910051 thuộc chi *Bacillus*.

Thực hiện phân tích 16S rARN, trình tự gen 16S rARN của chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được thể hiện bằng SEQ ID NO. 1. Đối chiếu kết quả phân tích 16S rARN thu được với ngân hàng dữ liệu gen của Trung tâm thông tin công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (National Center for Biotechnology Information - NCBI) cho thấy trình tự gen 16S rARN của chủng *B. amyloliquefaciens* tương đồng 99,93% với trình tự gen 16S rARN của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* FN597644.1.

Kết quả trên thể hiện rằng chủng VTCC 910051 phân lập được từ các mẫu phế thải vỏ tôm nêu trên thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens*. Chủng VTCC 910051 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Việt Nam (Vietnam Type Culture Collection: VTCC) ngày 17/12/2018 với số lưu chủng là VTCC 910051.

Khả năng sinh tổng hợp enzym của chủng VTCC 910051

Khả năng sinh tổng hợp enzym của chủng VTCC 910051 được khảo sát và so sánh với hoạt tính của các chủng đối chứng bao gồm các chủng *Bacillus amyloliquefaciens*

VTCC 11038; *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 11041; *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plamtarum* VTCC 11947 nhận từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam (Vietnam Type Culture Collection: VTCC), trong đó các chủng đối chứng này là các chủng thường được sử dụng trong các chế phẩm vi sinh.

Phương pháp khảo sát hoạt tính enzym được sử dụng là phương pháp đục lỗ thạch dựa trên nguyên tắc khi bổ sung các loại enzym vào trong lỗ thạch, chúng sẽ khuếch tán ra môi trường thạch xung quanh, thủy phân cơ chất có trong môi trường thạch đĩa, và sau một thời gian nhất định sẽ xuất hiện vòng phân giải màu trong suốt quanh lỗ thạch này, dựa vào hiệu số đường kính vòng phân hủy và đường kính lỗ thạch có thể xác định đường kính vòng phân giải, từ đó đánh giá được hoạt tính enzym của chủng khảo sát. Chủng VTCC 910051 và các chủng đối chứng được nuôi cấy trong môi trường B1 dịch thể.

Chủng VTCC 910051 và các chủng đối chứng (sau đây gọi chung là các chủng khảo sát) được nuôi cấy trong môi trường nêu trên trong thời gian 24 giờ. Sau đó, hút dịch nuôi cấy và ly tâm để lấy phần dịch nổi lên phía trên chứa các enzym sinh ra bởi các chủng khảo sát. Các môi trường để thử hoạt tính enzym được chuẩn bị với các cơ chất bao gồm tinh bột, protein và xenluloza với nồng độ 0,1%. Dùng ống hút đục lỗ trên các đĩa thạch chứa cơ chất và nhỏ dịch nuôi cấy của các chủng khảo sát vào các lỗ thạch với lượng dịch tương đương nhau. Ủ đĩa thạch ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Sau đó nhuộm bằng thuốc nhuộm tương ứng và quan sát kết quả. Hoạt tính enzym được đánh giá bằng đường kính vòng phân giải cơ chất, đường kính càng lớn thì hoạt độ càng cao. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể dễ dàng thực hiện việc lựa chọn các loại thuốc nhuộm tương ứng dùng trong quá trình xác định hoạt tính enzym này.

Như được thể hiện trên Fig.5, các đĩa thạch (a), (b) và (c) lần lượt chứa xenluloza, tinh bột và protein dùng để thử hoạt tính các enzym CMCaza, amylaza và proteaza tương ứng, và các vị trí được đánh số 1, 2, 3, 4 là các vị trí thử nghiệm đối với các chủng VTCC 910051, VTCC 11038, VTCC 11041, VTCC 11947, tương ứng.

Như được thể hiện trên đĩa (a), dịch nuôi cấy của tất cả các chủng có khả năng phân giải xenluloza với hoạt độ mạnh, được đặc trưng bởi đường kính vòng phân giải lớn; trong đó chủng ở vị trí 1 có khả năng phân giải xenluloza mạnh nhất, và chủng ở vị trí 3, 4 có khả năng phân giải xenluloza yếu hơn. Tương tự, như được thể hiện trên đĩa

(b), dịch nuôi cấy các chủng ở các vị trí đều có khả năng phân giải tinh bột, được đặc trưng bởi đường kính vòng phân giải, trong đó đối với chủng ở các vị trí 2, 4 thể hiện khả năng yếu với đường kính vòng nhỏ. Như được thể hiện trên đĩa (c), dịch nuôi cấy các chủng ở các vị trí 1, 2 có khả năng phân giải protein với hoạt độ mạnh, được đặc trưng bởi các đường kính vòng phân giải lớn và tương đương nhau; trong khi các chủng ở vị trí 3 và ở vị trí 4 thể hiện khả năng này yếu hơn. Các kết quả thử nghiệm được tóm tắt trong bảng 1 dưới đây:

Bảng 1. Hoạt tính enzym của chủng VTCC 910051 so với các chủng đối chứng.

Hoạt tính enzym (D-d)*	Chủng phân tích	Chủng đối chứng		
	VTCC 910051	VTCC 11038	VTCC 11041	VTCC 11947
CMCaza	28 mm	26 mm	23 mm	21 mm
Amylaza	20 mm	18 mm	20 mm	14 mm
Proteaza	28 mm	27 mm	23 mm	22 mm

*Ghi chú: D – đường kính phân giải của chủng; d – đường kính lỗ thạch

Như được thể hiện trong bảng 1 nêu trên, có thể thấy rằng trong số các chủng khảo sát, có hai chủng vi sinh là VTCC 910051, VTCC 11038 đều có hoạt tính amylaza, proteaza và CMCaza. Tuy nhiên, chủng VTCC 910051 theo giải pháp hữu ích thể hiện hoạt độ mạnh và đồng đều nhất. Từ kết quả thu được, có thể khẳng định rằng chủng VTCC 910051 có khả năng sinh tổng hợp các enzym với hoạt tính cao.

Khả năng kháng *E. coli* và kháng *Micrococcus* sp. của chủng VTCC 910051

Khả năng kháng khuẩn của chủng VTCC 910051 được khảo sát theo phương pháp khuếch tán trên thạch sử dụng chủng vi sinh vật kiểm định *E. coli* và *Micrococcus* sp. nhận từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam (VTCC).

Nuôi cấy các vi sinh vật kiểm định trong môi trường B1 lỏng trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 37°C, sau đó bổ sung vào môi trường B1 đã khử trùng và làm nguội đến nhiệt độ 40°C, trộn đều và đổ vào các đĩa petri. Đục lỗ trên các đĩa thạch đã cấy vi sinh vật kiểm định, nhỏ dịch nuôi cấy của chủng VTCC 910051 và các chủng đối chứng thu được theo cách tương tự bước thử hoạt tính enzym nêu trên vào các lỗ thạch với lượng dịch tương đương nhau. Ủ đĩa thạch ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Sau đó nhuộm bằng thuốc nhuộm tương ứng và quan sát kết quả. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng đường kính vòng phát triển của vi sinh vật thử nghiệm, đường kính càng lớn thì hoạt tính kháng

càng cao.

Trên các Fig.6, các đĩa thạch (a), (b) lần lượt là các đĩa thạch nuôi cấy các chủng vi sinh vật kiểm định *E. coli*, *Micrococcus* sp., tương ứng, và các vị trí được đánh số 1, 2, 3, 4 là các vị trí thử nghiệm đối với các chủng VTCC 910051, VTCC 11038, VTCC 11041, VTCC 11947, tương ứng. Như được thể hiện trên đĩa (a), dịch nuôi cấy các chủng ở các vị trí có khả năng kháng *E. coli*, được đặc trưng bởi các đường kính vòng phát triển. Tương tự, như được thể hiện trên đĩa (b), dịch nuôi cấy các chủng ở các vị trí đều có khả năng kháng *Micrococcus* sp. với hoạt độ vừa phải được đặc trưng bởi các đường kính vòng phát triển vừa phải; trong khi chủng ở vị trí thứ 2 thể hiện khả năng này yếu. Hình ảnh kết quả thử nghiệm được thể hiện trên các Fig.6 và các kết quả thử nghiệm được tóm tắt trong bảng 2 dưới đây:

Bảng 2. Hoạt tính kháng vi sinh vật của chủng VTCC 910051 so với các chủng đối chứng

Hoạt tính kháng vi sinh vật (D)	Chủng phân tích	Chủng đối chứng		
	VTCC 910051	VTCC 11038	VTCC 11041	VTCC 11947
<i>E. Coli</i>	13 mm	10 mm	11 mm	12 mm
<i>Micrococcus</i> sp.	13 mm	11 mm	12 mm	12 mm

*Ghi chú: D – đường kính kháng vi sinh vật

Từ kết quả thu được trong bảng 2 nêu trên, có thể thấy rằng dịch nuôi cấy của chủng VTCC 910051 có khả năng kháng tất cả các chủng vi sinh vật kiểm định được sử dụng trong nghiên cứu; trong khi chủng VTCC 11038 thể hiện hoạt tính kháng *E. Coli* và *Micrococcus* với hoạt độ yếu. Từ kết quả thu được, có thể khẳng định rằng chủng VTCC 910051 có khả năng kháng tất cả các loại vi sinh vật kiểm định nêu trên so với các chủng vi sinh vật đối chứng.

Các ví dụ của giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ được minh họa chi tiết hơn qua các ví dụ thực hiện cụ thể dưới đây. Tuy nhiên, giải pháp hữu ích không bị giới hạn ở các ví dụ này, mà phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích sẽ được xác định dựa trên các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Phân lập và định danh chủng VTCC 910051

1. Phân lập

Mẫu phế liệu vỏ tôm được thu gom từ các nhà máy chế biến tôm, và được bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ 4-8°C trong lọ sạch tiệt trùng để đảm bảo không bị nhiễm tạp các vi sinh vật từ môi trường cho đến khi phân tích.

Cân 1 g mẫu, pha loãng trong dung dịch muối đệm phosphat PBS (phosphate buffer saline) (5 g/45 ml) và lắc đều trong 30 phút. Sau đó xử lý ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 10 phút và trải trên môi trường B1 ở các nồng độ pha loãng khác nhau từ 10^{-1} đến 10^{-6} . Ủ mẫu trải ở nhiệt độ 37°C. Sau 1 ngày quan sát thấy có sự xuất hiện của các khuẩn lạc. Sau 2 ngày, các khuẩn lạc này phát triển thành các cụm khuẩn lạc nhô cao, có dạng hình tròn, mép trơn nhẵn hoặc gồ ghề, bề mặt khô, màu trắng sữa có kích thước 4,0-6,0 mm và không tiết sắc tố ra môi trường. Chọn các khuẩn lạc đặc trưng nhất, cấy vào các ống thạch nghiêng B1 để lưu chủng cho phần định danh và sử dụng sau. Chủng này được đặt tên là VTCC 910051 với hình thái khuẩn lạc như được thể hiện trên Fig.1. Chọn một khuẩn lạc riêng lẻ và có hình thái học đặc trưng nhất, cấy vào các ống thạch nghiêng B1 và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ để vi sinh vật phát triển, sau đó chuyển vào tủ lạnh để bảo quản và lưu chủng cho phần định danh và sử dụng sau. Đồng thời, tiến hành làm tiêu bản, nhuộm gram và chụp soi kính hiển vi, nhận thấy tế bào chủng VTCC 910051 bắt màu gram dương, có hình que, đứng đơn lẻ hoặc thành chuỗi ngắn, như được thể hiện trên Fig.2.

Dựa vào đặc điểm hình thái học của khuẩn lạc và tế bào như trên, có thể sơ bộ xác định được VTCC 910051 thuộc chi *Bacillus*.

2. Định danh

Từ chủng VTCC 910051 phân lập được ở trên, thực hiện tách chiết ADN và thực hiện nhân gen sử dụng máy PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất sử dụng cặp mồi 27F/1492R được thiết kế dựa vào trình tự có tính bảo thủ cao của gen 16S ở sinh vật có nhân điển hình.

Mồi xuôi 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

Mồi ngược 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Sau khi phản ứng PCR kết thúc, thực hiện điện di kiểm tra trên gel agarosa 1%, nhuộm bằng dung dịch RedSafe và sau đó soi bản gel dưới tia tử ngoại trên cơ sở so

sánh với đối chứng âm là nước, đối chứng dương là VTCC 11038, và chất chỉ thị phân tử ADN DL 5000 ADN marker. Trên Fig.3, các băng từ 1 đến 4 lần lượt thể hiện kết quả điện di đối với mẫu đối chứng âm, mẫu đối chứng dương, mẫu phân tích ADN của chủng VTCC 910051, và chất chỉ thị DL 5000 ADN marker. Như được thể hiện trên hình vẽ, có thể thấy rằng ở mẫu phân tích của chủng VTCC 910051 có xuất hiện phân tử ADN có kích thước ~1600 bp, tương ứng với kích thước của mẫu đối chứng dương 1600 bp. Từ đó có thể xác nhận phản ứng PCR đã xảy ra một cách thành công.

Sau đó, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Đức) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và kiểm tra độ tinh sạch của mẫu trên máy quang phổ khả kiến ở các bước sóng 260 nm và 280 nm cho tỷ lệ tinh sạch là $OD_{260}/OD_{280} > 1,7$. Từ đó, xác nhận sản phẩm PCR đã đạt độ tinh sạch như yêu cầu.

Tiếp tục thực hiện khuếch đại ADN đối với sản phẩm PCR tinh sạch sử dụng bộ kit ABI PRISM Cycle Sequencing (Perkin-Elmer Applied Biosystem, US) và cặp mồi 27F/1492R được thiết kế dựa vào trình tự của gen 16S.

Mồi 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Sản phẩm thu được sau phản ứng này là các đoạn ADN đơn được duỗi ra. Tiến hành tinh sạch mẫu thu được, làm khô mẫu bằng máy cô quay chân không trong thời gian 3-5 phút, sau đó thêm 10 µl Hi-Di™ formamide (Applied Biosystem, US), trộn đều sau đó ủ ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 2 phút và để trên đá lạnh trước khi cho vào máy đọc trình tự tự động.

Trình tự của gen 16S rARN của chủng VTCC 910051 được đọc trực tiếp trên máy đọc trình tự tự động 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem, US). Kết quả xác định được trình tự có kích thước 1399 nucleotit.

GCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAG
GTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA

GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
 AGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
 GCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGC
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
 AATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
 GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGC
 AGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
 GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGA
 GGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGC
 AGCTAACGCTTTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
 CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTA
 GAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
 GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
 TTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC
 TGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCG
 AGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAAC
 TCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG
 TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT
 GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTATAC

So sánh kết quả trình tự thu được với các trật tự của các loài đã được xác định trong ngân hàng gen cho thấy trình tự gen 16S rRNA của chủng VTCC 910051 tương đồng 99,93% với trình tự gen 16S rRNA của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* FN597644.1. Mối quan hệ phát sinh chủng loài của VTCC 910051 được xây dựng sử dụng phần mềm Mega 6.0, BioEdit và được thể hiện ở Fig.4.

Ví dụ 2. Sản xuất giống gốc VTCC 910051

Trong sản xuất vi sinh, giống thường được dự trữ với số lượng lớn (giống gốc) đủ để đảm bảo đủ dùng trong vài năm, không cần phải cấy chuyển và biến đổi di truyền. Do đó, việc chuẩn bị giống tốt là điều kiện tiên quyết cho quá trình sản xuất.

Cấy chuyển mẫu giống VTCC 910051 được lưu giữ từ ví dụ 1 trong đĩa thạch B1 và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ, quan sát thấy sự xuất hiện của các khuẩn lạc như được mô tả ở trên. Lấy một khuẩn lạc riêng lẻ, đặc trưng của *Bacillus amyloliquefaciens* mới mọc để cấy lên thạch nghiêng B1 và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ để tế bào phát triển tốt, ổn định. Tiến hành làm tiêu bản và nhuộm Gram để kiểm tra độ tinh khiết của ống giống thạch nghiêng.

Dùng pipet chuyển 4 ml nước muối sinh lý đã tiệt trùng vào ống thạch nghiêng đã kiểm tra là tinh khiết, cào vi khuẩn hòa lên để tạo dịch huyền phù tế bào.

Cấy 2 ml dịch tế bào vào bình nuôi cấy (bình Roux) chứa môi trường tạo bào tử DSM, ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 3 ngày để chủng VTCC 910051 phát triển tốt và tạo bào tử.

Dùng pipet thêm 10 ml nước muối sinh lý đã tiệt trùng vào bình và cào vi khuẩn hòa lên để tạo dịch bào tử. Thu dịch bào tử thu được, kiểm tra độ tinh khiết của dịch bào tử bằng cách làm tiêu bản và nhuộm Gram. Sau khi xác nhận được dịch bào tử là tinh khiết, bổ sung môi trường đông khô sữa gầy 5% với thể tích tương đương, trộn đều để thu được dịch huyền phù đồng nhất. Dùng pipet vô trùng nhỏ dịch huyền phù vào từng lọ đông khô (lọ ampul) trong điều kiện vô trùng, lắp vào hệ thống đông khô để tiến hành đông khô mẫu trong thời gian từ 24-30 giờ, hàn đóng ống đông khô trong chân không. Kiểm tra chân không của các ống bằng đèn cực tím, loại bỏ các ống không đạt và bảo quản ống đông khô đạt tiêu chuẩn ở nhiệt độ 4°C trong tủ lạnh.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051 là một chủng mới phân lập có khả năng sản sinh các enzym tiêu hóa với hoạt tính cao. Do đó, việc phân lập và sử dụng chủng này rất có ý nghĩa trong việc sản xuất các chế phẩm sinh học dựa trên nguồn nguyên liệu trong nước, hạn chế nhập khẩu. Các chế phẩm vi sinh theo giải pháp hữu ích có chất lượng cao, được sản xuất với quy trình đơn giản, dễ thực hiện nên giá thành hạ so với các chế phẩm cùng loại được nhập khẩu hoặc sản xuất từ nguyên liệu nhập khẩu.

Các chế phẩm thu được theo giải pháp hữu ích có thể được sử dụng dưới dạng nguyên liệu trong các ngành phân bón, xử lý chất thải và các quy trình công nghiệp khác. Trong ngành công nghiệp xử lý chất thải, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC

910051 có khả năng sinh ra các enzym để áp dụng vào các quy trình xử lý các sản phẩm công nghiệp, ví dụ như loại bỏ protein từ vỏ tôm. Trong các ngành phân bón, các chế phẩm theo giải pháp hữu ích có thể được sử dụng trực tiếp hoặc gián tiếp dưới dạng thành phần bổ sung vào các khẩu phần ăn hàng ngày.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi sinh *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051 có đoạn gen mã hóa 16S ARN có kích thước 1399 bp (SEQ ID NO. 1) và được lưu giữ tại Bảo tàng Giống chuẩn quốc gia (VTCC) với số lưu chủng là VTCC 910051, trong đó chủng này được phân lập từ các mẫu phế thải vỏ tôm, có khả năng sinh tổng hợp các enzym tiêu hóa bao gồm amylaza, proteaza và CMCaza, và có khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh bao gồm *E. Coli*, *Micrococcus* sp..
2. Chế phẩm vi sinh chứa chủng vi sinh *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051 theo điểm 1.
3. Chế phẩm vi sinh theo điểm 2, trong đó chủng vi sinh *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051 ở dạng bào tử.
4. Chế phẩm vi sinh theo điểm 2, trong đó chế phẩm này còn bao gồm các chủng vi sinh khác được lựa chọn từ nhóm gồm có *Lactobacillus* sp., *Saccharomyces* sp., *Enterococcus* sp.
5. Chế phẩm vi sinh theo điểm bất kỳ từ 2 đến 4, trong đó chế phẩm ở dạng bột.
6. Chế phẩm vi sinh theo điểm 5, trong đó chế phẩm này còn bao gồm chất mang được chọn từ nhóm gồm có tinh bột tan, dextrin hoặc hỗn hợp của chúng.
7. Chế phẩm vi sinh theo điểm bất kỳ từ 2 đến 4, trong đó chế phẩm ở dạng lỏng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học - Đại học Quốc Gia Hà Nội

<120> CHỦNG VI SINH BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS VTCC 910051 VÀ CHẾ PHẨM VI SINH CHỨA CHỦNG NÀY

<140>

<141>

<160> 1

<210> 1

<211> 1399

<212> ADN

<213> *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051

<220>

<223> 16S rARN của *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 910051

<400>

```
gcagtcgagc ggacagatgg gagcttgctc cctgatgtta gcggcggacg ggtgagtaac 60
acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat 120
gcttgtttga accgcatggt tcagacataa aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg 180
acccgcggcg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc 240
gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg 300
cagcagtagg gaatcttcg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga 360
tgaaggtttt cggatcgtaa agctctgttg ttagggaaga acaagtgccg ttcaaataag 420
gcggcacctt gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg 480
taatacgtag gtggcaagcg ttgtccgga ttattgggcg taaagggctc gcaggcgggt 540
tcttaagtct gatgtgaaag cccccggctc aaccggggag ggtcattgga aactggggaa 600
cttgagtgca gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg 660
gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag gagcgaaagc 720
gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag 780
```

```

tgtagggggg tttccgcccc ttagtgctgc agctaacgct ttaagcactc cgcctgggga 840
gtacgggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca 900
tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc 960
ctagagatag gacgtcccct tcgggggcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc 1020
tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc 1080
agcattcagt tgggcactct aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg 1140
acgtcaaatc atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat gggcagaaca 1200
aagggcagcg aaaccgcgag gttaagccaa tcccacaaat ctgttctcag ttcggatcgc 1260
agtctgcaac tcgactgcgt gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg 1320
gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc 1380
cgaagtcggt gaggtatac 1399

```

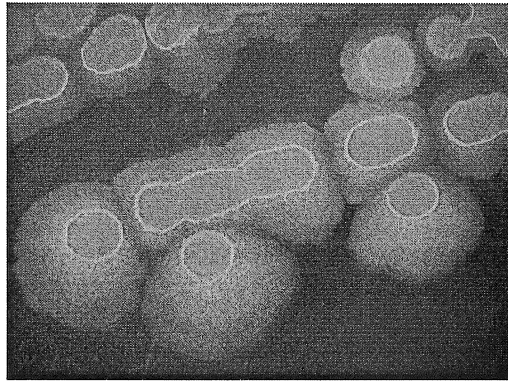



Fig.1

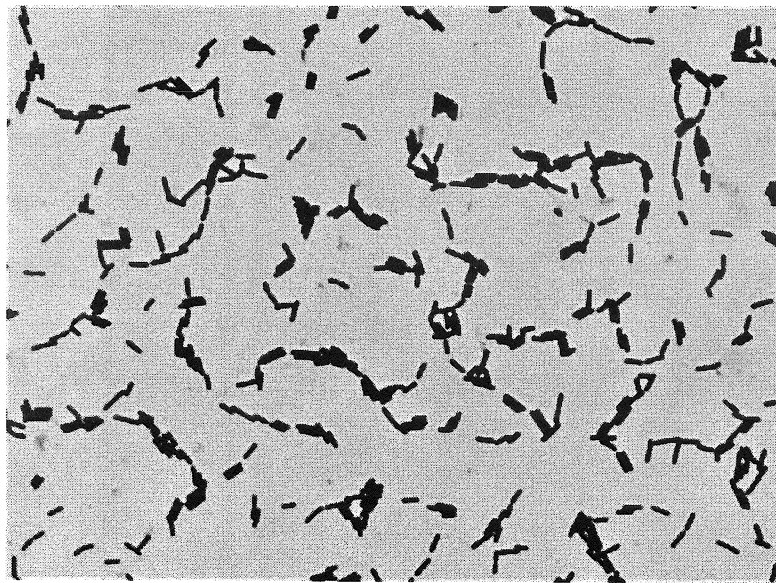


Fig.2

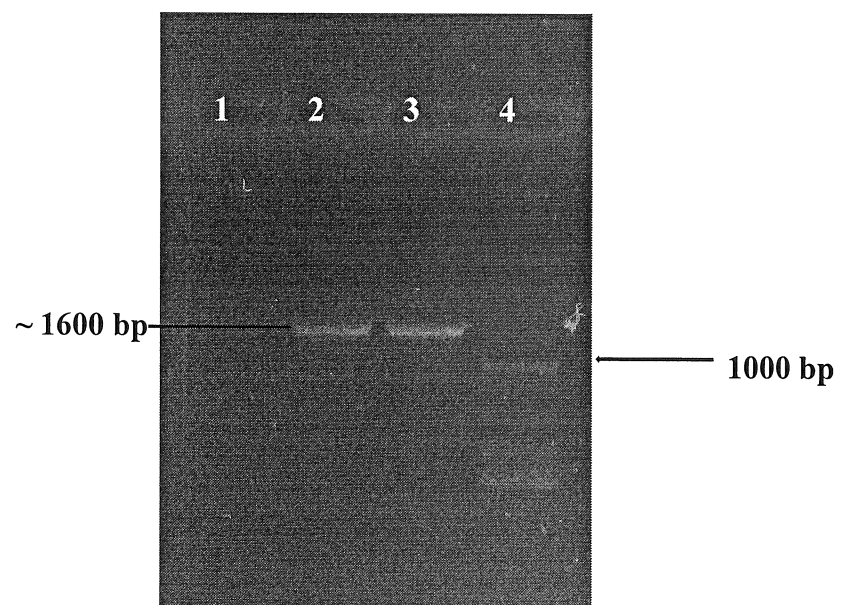


Fig.3

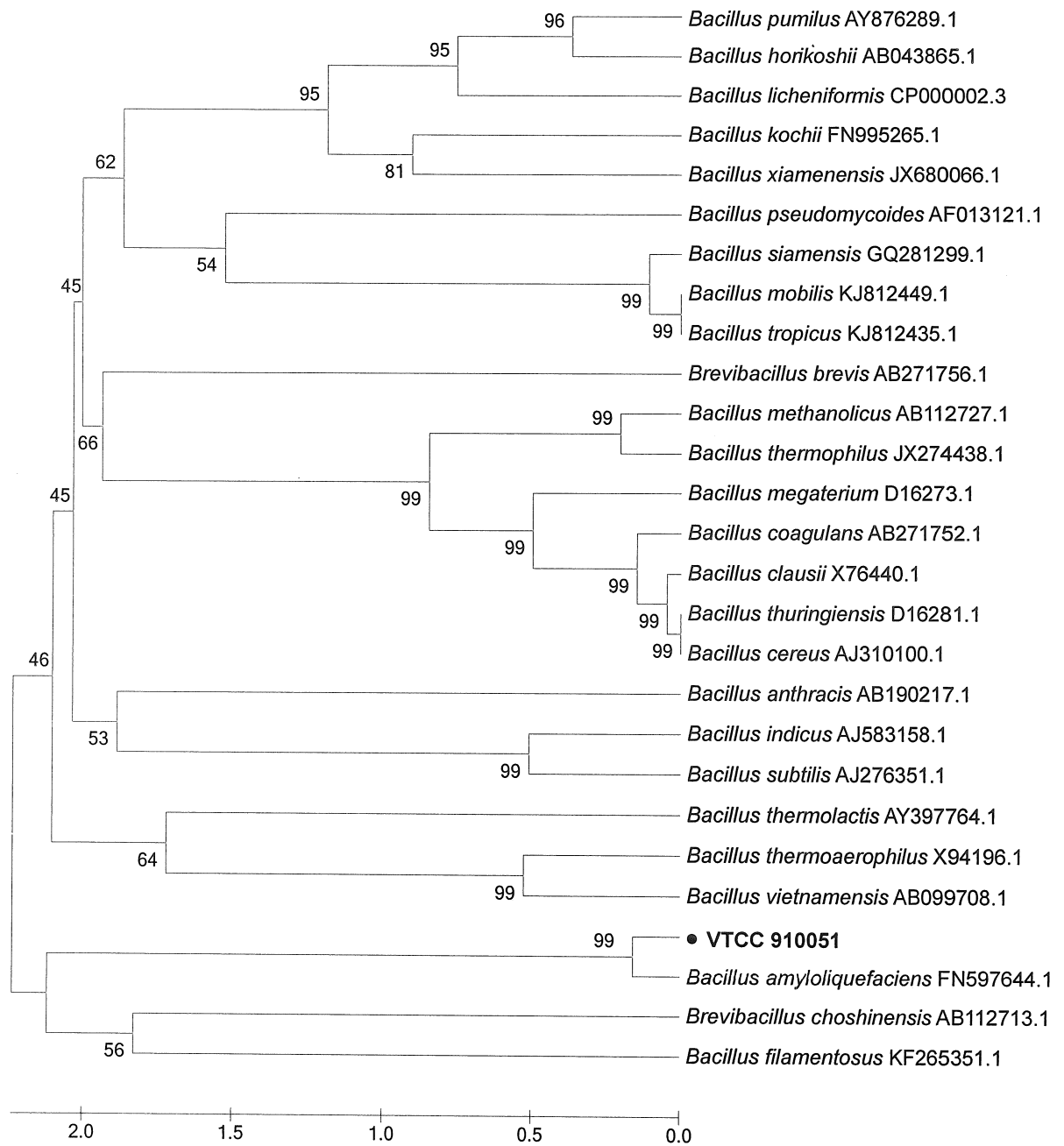
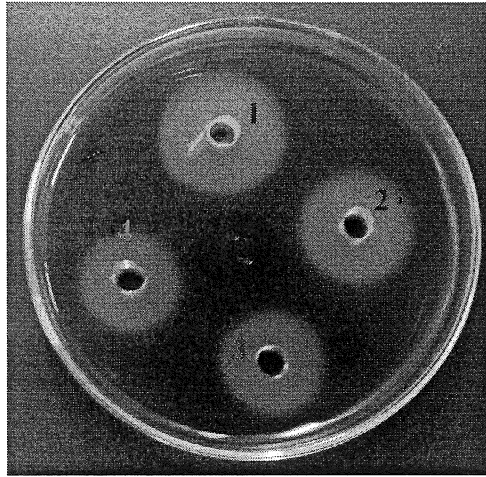
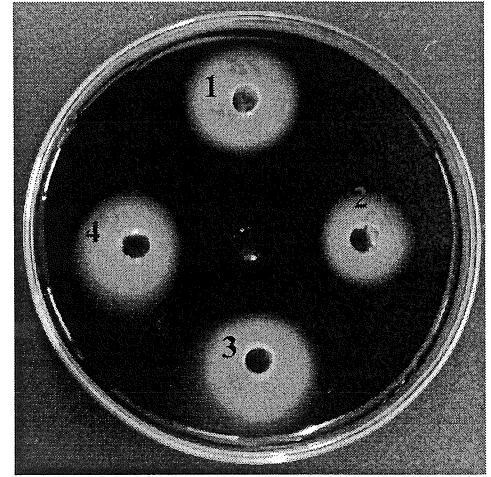
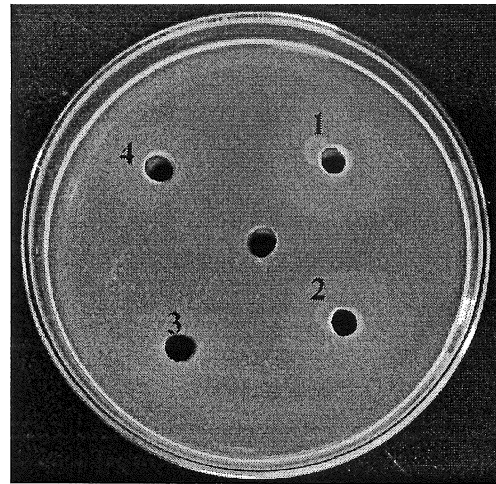
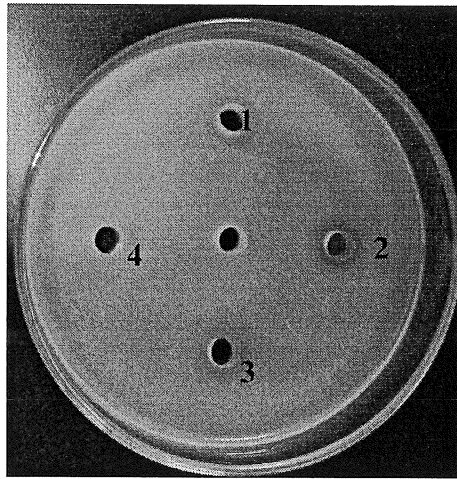
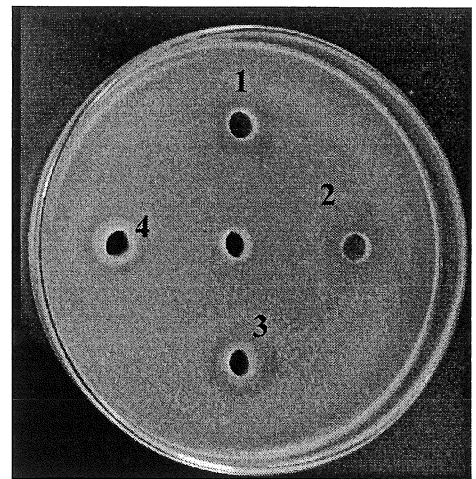


Fig.4

**a****b****c****Fig.5**

**a****b****Fig.6**