



(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)



1-0036920

(51)⁷ C12N 1/20; C12N 1/00; A23B 7/10;
A23L 19/00

(13) B

(21) 1-2019-00579

(22) 14/07/2017

(86) PCT/KR2017/007616 14/07/2017

(87) WO2018/012942 18/01/2018

(30) 10-2016-0090286 15/07/2016 KR

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/04/2019 373A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) CHOI, Seung Hye (KR); OH, Ji Young (KR); LEE, Dong Yun (KR).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHỦNG LEUCONOSTOC MESENTEROIDES CJLM181 TẠO RA LƯỢNG KHÍ GIẢM, CHẾ PHẨM MEN GIỐNG CHỨA CHỦNG NÀY, KIM CHI CHỨA CHẾ PHẨM NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP CHẾ BIẾN KIM CHI BẰNG CÁCH SỬ DỤNG CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) tạo ra lượng khí giảm, chế phẩm men giống chứa chủng này, và phương pháp chế biến kim chi bằng cách sử dụng chủng này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Leuconostoc mesenteroides* tạo ra lượng khí giảm và phương pháp chế biến kim chi bằng cách sử dụng chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kim chi là thực phẩm được chế biến bằng hoạt động lên men của vi sinh vật, trong đó các vi sinh vật có thể hoạt động để phân giải các thành phần của thực phẩm và tổng hợp các thành phần mới để cải thiện giá trị dinh dưỡng, sự yêu thích và độ ổn định khi bảo quản thực phẩm.

Kim chi truyền thống gặp vấn đề ở chỗ khí (chủ yếu là cacbon dioxit) được tạo ra trong quá trình phân phối kim chi làm cho bao bì bị phồng, làm hư hỏng bao bì, và rò rỉ từ bao bì, và ở chỗ chất lượng vị giác của kim chi giảm do vị chua mạnh sinh ra từ sự dư thừa này.

Để giải quyết những vấn đề này, các phương pháp kiểm soát bằng cách sử dụng nhiều công nghệ bao gói khác nhau như màng polyme có độ thấm thấu khí cao (công bố đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-1999-0078725) hoặc sử dụng van một chiều (công bố đơn giải pháp hữu ích Hàn Quốc số 20-2013-0002058) đã được báo cáo. Tuy nhiên, các phương pháp này có hạn chế về mặt chi phí hoặc tương tự khi thương mại hóa chúng trong thực tế, và không đưa ra được giải pháp cơ bản cho sự thay đổi chất lượng kim chi, như vị chua quá mạnh do dư thừa khí.

Trong tình trạng kỹ thuật như vậy, các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu sâu rộng để phát triển phương pháp giảm sự tạo khí khi chế biến kim chi. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện rằng khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng chủng *Leuconostoc mesenteroides* cụ thể, mức tạo khí có thể giảm trong khi ngăn chặn được sự gia tăng vị chua, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Các tài liệu về giải pháp kỹ thuật đã biết

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: KR 10-1999-0078725 A (1999.11.05);

Tài liệu sáng chế 2: KR 20-2013-0002058 A (2013.04.02).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật được giải quyết

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) tạo ra lượng khí giảm.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm men giống chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất kim chi chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 hoặc chế phẩm men giống theo sáng chế.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp chế biến kim chi, bao gồm bước cho chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 hoặc chế phẩm men giống theo sáng chế tiếp xúc với nguyên liệu cần lên men.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Trong khi đó, phần mô tả một khía cạnh và phương án được bộc lộ trong sáng chế cũng có thể được áp dụng được cho các khía cạnh và phương án khác về mặt các yếu tố chung. Hơn nữa, tất cả các tổ hợp của nhiều thành phần khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều thuộc phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở phần mô tả chi tiết sau đây.

Để đạt được các mục đích của sáng chế, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) tạo ra lượng khí giảm. Chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) theo sáng chế có thể là *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*.

Theo các phương án khác của sáng chế, chủng theo sáng chế có thể là chủng tạo lượng axit giảm. Cụ thể, axit theo sáng chế có thể là axit lactic. Do đó, khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng chủng theo sáng chế, chất lượng vị giác của kim chi có thể được duy trì bằng cách

ngăn chặn sự gia tăng vị chua, so với khi kim chi được chế biến bằng các chủng *Leuconostoc mesenteroides* khác.

Theo một phương án khác của sáng chế, chủng theo sáng chế có thể là chủng tạo ra lượng manitol tăng. Manitol tạo ra cảm giác mát dịu và vị dễ chịu cho kim chi, ngăn vị chua, và ngăn chặn cả sự tăng sinh của các vi sinh vật tạo quá nhiều axit để ngăn cho kim chi khỏi bị lên men quá mức.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, chủng theo sáng chế thể hiện kết quả âm tính trong các thử nghiệm hóa lỏng gelatin, tạo chất chuyển hóa độc (ví dụ, amoniac), tạo phenylalanin deaminaza, và tiêu huyết, cho thấy rằng chủng này an toàn khi được ứng dụng trong thực phẩm (xem ví dụ 5).

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, chủng theo sáng chế có thể có rARN 16s chứa trình tự SEQ ID NO: 1.

Chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 theo sáng chế có thể bao gồm mảnh thành tế bào, tế bào sống hoặc tế bào khô của chủng này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm men giống chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) hoặc sản phẩm nuôi cấy chủng này.

Chế phẩm men giống theo sáng chế có thể chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) theo sáng chế với nồng độ 10^7 cfu/ml hoặc cao hơn, cụ thể là, 10^7 cfu/ml đến 10^{13} cfu/ml, hoặc 10^9 cfu/ml đến 10^{12} cfu/ml.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “sản phẩm nuôi cấy” nghĩa là vật liệu thu được từ việc nuôi cấy chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) theo sáng chế sau khi cấy vào môi trường. Cụ thể, sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế có thể bao gồm bản thân sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy chủng theo sáng chế (tức là, sản phẩm nuôi cấy có thể bao gồm chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) theo sáng chế, môi trường hoặc sản phẩm chuyển hóa của chủng này), dịch lọc (ví dụ, dịch nổi sau ly tâm) thu được bằng cách lọc hoặc ly tâm sản phẩm nuôi cấy để loại bỏ chủng này, hoặc tương tự. Ngoài ra, sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế có thể bao gồm sản phẩm nuôi cấy thu

được bằng cách làm khô (ví dụ, đông khô) và nghiền bột sản phẩm nuôi cấy.

Theo một phương án của sáng chế, việc nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện ở nhiệt độ từ 10°C đến 30°C trong 6 đến 48 giờ. Cụ thể, việc nuôi cấy có thể được thực hiện ở nhiệt độ từ 20°C đến 30°C trong 12 đến 36 giờ hoặc 18 đến 30 giờ.

Môi trường được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn và có thể là môi trường bất kỳ đã biết dùng cho vi khuẩn axit lactic. Cụ thể, môi trường được dùng theo sáng chế có thể bao gồm nguồn cacbon và nguồn nitơ. Cụ thể hơn, nguồn cacbon có thể là một hoặc nhiều nguồn được chọn từ nhóm gồm sucroza, glucoza và fructoza, và nguồn nitơ có thể là một hoặc nhiều nguồn được chọn từ nhóm gồm chiết xuất nấm men, pepton, chiết xuất thịt bò, chiết xuất mầm đại mạch, dịch chiết ngô, amoni xitrat, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat. Môi trường được dùng theo sáng chế còn có thể bao gồm một hoặc nhiều môi trường được chọn từ nhóm gồm Tween 80, natri xitrat, kali phosphat, natri axetat, mangan sulfat, magie sulfat, và nước cất.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "men giống" nghĩa là tác nhân mà được áp dụng theo cách nhân tạo lên nguyên liệu cần lên men để hỗ trợ việc khởi đầu lên men.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm men giống có thể ở dạng lỏng hoặc dạng bột.

Theo các phương án khác của sáng chế, chế phẩm men giống theo sáng chế còn có thể chứa chất bảo quản lạnh đông. Cụ thể hơn, chế phẩm men giống có thể chứa thêm một hoặc nhiều chất bảo quản lạnh đông được chọn từ nhóm gồm glyxerol, trehaloza, maltodextrin, sữa bột tách béo, và tinh bột. Chất bảo quản lạnh đông được dùng theo sáng chế có thể có mặt với lượng từ 0,01% khối lượng đến 20% khối lượng, hoặc từ 0,01% khối lượng đến 10% khối lượng, dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm men giống theo sáng chế. Cụ thể, theo sáng chế, glyxerol có thể có mặt với lượng từ 5 đến 20% khối lượng trong chế phẩm men giống; trehaloza có thể có mặt với lượng từ 2 đến 10% khối lượng trong chế phẩm men giống; sữa bột tách béo có thể có mặt với lượng từ 0,5 đến 2% khối lượng trong chế phẩm men giống; và tinh bột có thể có mặt với lượng từ 0,1 đến 1% khối lượng trong chế phẩm men giống.

Theo một phương án khác của sáng chế, chế phẩm men giống theo sáng chế có thể chứa thêm tá dược. Cụ thể, tá dược được dùng theo sáng chế có thể là một hoặc nhiều tá dược được chọn từ nhóm gồm glucoza, dextrin và sữa bột tách béo. Cụ thể hơn, tá dược được dùng theo sáng chế có thể có mặt với lượng từ 75 đến 95% khối lượng, hoặc từ 85 đến 95% khối lượng, dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm men giống theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kim chi chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) theo sáng chế hoặc chế phẩm men giống theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “kim chi” là thực phẩm thu được bằng cách ướp muối rau (ví dụ, cải thảo (Chinese cabbage), cải củ, hành lá, cải bẹ xanh và dưa chuột, v.v.) và bổ sung gia vị (ví dụ, bột ớt, tỏi, gừng và cá muối, v.v.) vào rau đã ướp muối, tiếp theo là lên men.

Kim chi theo sáng chế có thể chứa thêm các chất phụ gia đã biết được chấp nhận trong thực phẩm. Cụ thể, kim chi theo sáng chế có thể chứa thêm hương liệu tự nhiên như hương mặn, hương chanh, hương dứa, hương thảo mộc hoặc tương tự; chất màu tự nhiên như nước trái cây tự nhiên, chlorophyllin, flavonoid hoặc tương tự; thành phần làm ngọt như fructoza, mật ong, rượu đường hoặc đường; hoặc chất tạo độ axit như axit xitric hoặc natri xitrat.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến kim chi, bao gồm bước cho chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) theo sáng chế hoặc chế phẩm men giống theo sáng chế tiếp xúc với nguyên liệu cần lên men.

Theo các phương án khác của sáng chế, chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) theo sáng chế hoặc chế phẩm men giống theo sáng chế có thể được cho tiếp xúc với nguyên liệu cần lên men với lượng từ 0,01 đến 3% khối lượng, 0,1 đến 3% khối lượng, 0,5 đến 3% khối lượng, hoặc 0,5% khối lượng đến 2% khối lượng, dựa trên tổng khối lượng của nguyên liệu cần lên men.

Ngoài ra, việc tiếp xúc theo sáng chế có thể được thực hiện ở nhiệt độ từ 3 đến 10°C hoặc từ 5 đến 10°C trong 1 đến 90 ngày, 10 đến 90 ngày, 10 đến 60 ngày, 20 đến 60 ngày, hoặc

20 đến 40 ngày.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kim chi được chế biến bằng phương pháp chế biến kim chi theo sáng chế.

Hiệu quả của sáng chế

Chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) theo sáng chế tạo ra lượng khí giảm. Do đó, khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng chủng này hoặc sản phẩm nuôi cấy chủng này làm men, sự tạo khí trong quá trình phân phối kim chi có thể giảm, và do đó các vấn đề như hư hỏng bao bì do khí sinh ra có thể được ngăn chặn, nhờ đó làm ổn định chất lượng kim chi khi phân phối. Hơn nữa, chủng theo sáng chế tạo ra lượng axit giảm, và do đó duy trì độ axit không đổi. Ngoài ra, chủng theo sáng chế có khả năng tạo manitol tuyệt vời, và do đó hữu hiệu trong việc cải thiện chất lượng vị giác của kim chi.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với sự tham chiếu đến các ví dụ. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các ví dụ này được đưa ra nhằm hiểu rõ hơn về sáng chế và không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1: Phân lập chủng tạo ra lượng khí giảm

1-1) Phân lập và nhận dạng chủng

Nhiều loại kim chi khác nhau mua từ siêu thị được lão hóa ở nhiệt độ thấp 5°C, và kim chi mà đạt độ pH trong khoảng từ 3,8 đến 4,5 được dùng làm mẫu kim chi. Mẫu kim chi được pha loãng 10-lần bằng nước muối 0,85%, cấy vào đĩa môi trường aga PES (aga sucroza rượu phenyl etylic; trong một lít nước cất, 5 g trypton, 0,5 g chiết xuất nấm men, 20 g sucroza, 2 g amoni sulfat, 1 g kali phosphat dibazơ, 0,244 g magie sulfat, 2,5 ml rượu phenyl etylic, và 15 g aga), và cấy trải bằng dụng cụ cấy trải. Tiếp theo, đĩa được ủ trong máy ủ ở 25°C trong 24 giờ, và sau đó mỗi khuẩn lạc được tạo ra được cấy vạch lên đĩa aga riêng và tách thành các khuẩn lạc đơn.

1-2) Chọn chủng tạo ra lượng khí giảm

Mỗi khuẩn lạc của chủng đã tách trong ví dụ 1-1 trên đây được cấy vào 10 ml môi

trường lỏng MRS (môi trường lỏng MRS của Difco; 10 g bacto pepton, 10 g chiết xuất thịt bò, 5 g chiết xuất nấm men, 20 g glucoza, 1 g Tween 80, 2 g amoni xitrat, 2 g kali phosphat dibazơ, 5 g natri axetat, 0,1 g mangan sulfat, 0,05 g magie sulfat, và 1 L nước cất) trong ống nghiệm chứa ống Durham dài 30 mm, và sau đó nuôi cấy tĩnh ở 25°C trong 24 giờ. Chiều cao của cột khí được bẫy trong ống Durham được đo để xác định mức độ tạo khí, và các chủng thể hiện mức tạo khí 10 mm hoặc thấp hơn được chọn.

1-3) Chọn chủng tạo lượng axit giảm

Mỗi khuẩn lạc của chủng được chọn trong ví dụ 1-2 trên đây được cấy vào 10 ml môi trường lỏng MRS (môi trường lỏng MRS của Difco; 10 g bacto pepton, 10 g chiết xuất thịt bò, 5 g chiết xuất nấm men, 20 g glucoza, 1 g Tween 80, 2 g amoni xitrat, 2 g kali phosphat dibazơ, 5 g natri axetat, 0,1 g mangan sulfat, 0,05 g magie sulfat, và 1 L nước cất). Để xác định mức độ tạo axit, mỗi khuẩn lạc được nuôi cấy tĩnh ở 25°C trong 24 giờ, và sau đó đo độ pH bằng cách sử dụng máy đo pH (SevenCompact/Ion S220, Mettler Toledo), và các chủng có độ pH 4,39 hoặc cao hơn được chọn.

1-4) Chọn chủng tạo lượng manitol tăng

Mỗi khuẩn lạc của chủng được chọn trong ví dụ 1-3 trên đây được cấy vào 10 ml môi trường tối thiểu (10 g bacto pepton, 20 g fructoza, 1 g Tween 80, 2 g amoni xitrat, 2 g kali phosphat dibazơ, 5 g natri axetat, 0,1 g mangan sulfat, 0,05 g magie sulfat, và 1 L nước cất) chứa 2% fructoza, và nuôi cấy tĩnh ở 25°C trong 24 giờ, sau đó đo lượng manitol được tạo ra. Lượng manitol được tạo ra được xác định bằng phương pháp HPLC, và chủng thể hiện mức độ sản sinh manitol là 16.000 mg/L hoặc cao hơn được chọn.

1-5) Nhận dạng chủng được chọn

Chủng được chọn trong ví dụ 1-4 trên đây được đặt tên là "CJLM181", và trình tự nucleotit của rARN 16s của chủng này (SEQ ID NO: 1) được phân tích. Kết quả là, có thể thấy rằng trình tự nucleotit của rARN 16s của chủng CJLM181 đồng nhất 99% với trình tự nucleotit của rARN 16s của *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides* CCMMB1121 (SEQ ID NO: 2). Theo đó, chủng CJLM181 được đặt tên là "*Leuconostoc mesenteroides* CJLM181", và

lưu trữ trong Korean Collection for Type Cultures tại Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology vào ngày 10/06/2016 với số truy cập KCTC 13042BP.

Ví dụ 2: So sánh mức tạo khí

Để so sánh mức độ tạo khí bởi *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 được chọn trong ví dụ 1 với các chủng khác trong số các chủng *Leuconostoc mesenteroides*, các chủng *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3100 và KCTC3722, mà là các chủng *Leuconostoc mesenteroides* chuẩn được sử dụng làm chủng đối chứng để xác định mức độ tạo khí. Mỗi chủng được cấy vào 10 ml môi trường lỏng MRS trong ống nghiệm chứa ống Durham dài 30 mm, và được nuôi cấy ở 25°C trong 24 giờ, sau đó chiều cao cột khí được bẫy trong ống Durham được đo và mức độ tạo khí được so sánh. Mức độ tạo khí được đánh giá theo các tiêu chuẩn sau: “-“ = không tạo khí; “+” = chiều cao cột khí được bẫy trong ống Durham là từ 1 đến 5 mm; “++” = chiều cao cột khí từ 6 đến 10 mm; “+++” = chiều cao cột khí từ 11 đến 15 mm; “++++” = chiều cao cột khí từ 16 đến 25 mm; và “+++++” = chiều cao cột khí trên 25 mm.

Kết quả là, thử nghiệm đã cho thấy rằng mức độ tạo khí của *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 là “++”, thấp hơn đáng kể so với mức độ tạo khí của các chủng đối chứng (“++++” hoặc “+++”) (bảng 1).

Bảng 1

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CJLM181	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3722
Mức độ tạo khí	++	++++	+++

Ví dụ 3: So sánh mức tạo axit

Mức độ tạo axit bởi *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 được chọn trong ví dụ 1 được so sánh với mức độ tạo axit của *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3100 và KCTC3722 là các chủng đối chứng. Mỗi chủng được cấy vào 10 ml môi trường lỏng MRS. Để xác định mức độ tạo axit, mỗi chủng được nuôi cấy tĩnh ở 25°C trong 24 giờ, và sau đó đo độ pH bằng cách

sử dụng máy đo pH (SevenCompact/Ion S220, Mettler Toledo).

Kết quả là, thử nghiệm đã cho thấy rằng mức độ tạo axit của *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 là thấp hơn đáng kể so với mức độ tạo axit của các chủng đối chứng (bảng 2).

Bảng 2

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CJLM181	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3722
pH	4,39	4,33	4,37

Ví dụ 4: So sánh mức tạo manitol

Mức độ tạo manitol bởi *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 được chọn trong ví dụ 1 được so sánh với mức độ tạo manitol của *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3100 và KCTC3722 là các chủng đối chứng. Mỗi chủng được cấy vào 10 ml môi trường tối thiểu (10 g bacto pepton, 20 g fructoza, 1 g Tween 80, 2 g amoni xitrat, 2 g kali phosphat dibazơ, 5 g natri axetat, 0,1 g mangan sulfat, 0,05 g magie sulfat, và 1 L nước cất) chứa 2% fructoza, và nuôi cấy ở 25°C trong 24 giờ, sau đó thành phần manitol trong dịch nổi được xác định bằng phương pháp HPLC.

Kết quả là, thử nghiệm đã cho thấy rằng mức độ tạo manitol bởi *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 tăng lần lượt 146% và 185% so với mức độ tạo manitol của các chủng đối chứng (bảng 3).

Bảng 3

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CJLM181	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3722
Mức độ tạo manitol (mg/L)	16336,34	11224,70	8815,10

Ví dụ 5: Đánh giá độ an toàn của chủng

Để kiểm tra xem *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 được chọn trong ví dụ 1 có thể được sử dụng làm men giống trong chế biến kim chi hay không, độ an toàn của chủng này được phân tích. Cụ thể, theo các phương pháp thử nghiệm đánh giá độ an toàn được đề xuất trong tài liệu Korean Bio Venture Association Standards, các thử nghiệm tiêu huyết, hóa lỏng gelatin, tạo chất chuyển hóa độc (amoniac) và phenylalanin deaminaza được tiến hành.

Kết quả là, thử nghiệm đã cho thấy rằng chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 thể hiện kết quả âm tính trong tất cả các thử nghiệm tiêu huyết, hóa lỏng gelatin, tạo chất chuyển hóa độc (amoniac) và phenylalanin deaminaza, cho thấy chủng này là chủng an toàn mà có thể được sử dụng cho cơ thể người và có thể dùng trong chế biến thực phẩm (bảng 4).

Bảng 4

Thử nghiệm hóa lỏng gelatin	Thử nghiệm phenylalanin deaminaza	Thử nghiệm tiêu huyết	Thử nghiệm tạo amoniac
Âm tính	Âm tính	γ	Âm tính

* γ (tiêu huyết gama): không tiêu huyết.

Ví dụ 6: Chế biến kim chi

6-1) Chế biến kim chi bằng cách sử dụng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181

Môi trường được chuẩn bị bằng cách trộn 2,5 g sucroza, 1,0 g trinati xitrat, 1,5 g pepton, 1,0 g glucoza, 1,0 g chiết xuất nấm men, 0,5 g fructoza, 0,5 g natri axetat và 1 L nước cất, tiếp theo là khử trùng. Khoảng 10^9 CFU/ml chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 được cấy vào môi trường với lượng 1% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của môi trường, và nuôi cấy ở 25°C trong 24 giờ, nhờ đó tạo ra sản phẩm nuôi cấy chủng. Tiếp theo, sản phẩm nuôi cấy chủng đã chuẩn bị được bổ sung vào gia vị kim chi thông thường (thu được bằng cách trộn bột ớt (2,5% khối lượng), tỏi (2% khối lượng), gừng (0,4% khối lượng), hành lá (1% khối lượng), rau cải bẹ xanh (18% khối lượng) và nước mắm cá (5% khối lượng) với lượng 0,1% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của kim chi để chuẩn bị gia vị. Sau đó, gia vị đã chuẩn bị được trộn với cải thảo ướp muối, nhờ đó tạo ra kim chi (ví dụ thử nghiệm 1).

6-2) Chế biến kim chi bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy chủng chuẩn

Kim chi được chế biến theo cách giống như đã mô tả trong ví dụ 6-1, trừ việc sản phẩm nuôi cấy của từng chủng chuẩn *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3100 và KCTC3722 được sử dụng (sử dụng sản phẩm nuôi cấy KCTC3100: Ví dụ so sánh 1; sử dụng sản phẩm nuôi cấy KCTC3722: Ví dụ so sánh 2).

6-3) Chế biến kim chi mà không bổ sung sản phẩm nuôi cấy của chủng

Kim chi (ví dụ so sánh 3) được chế biến theo cách giống như đã mô tả trong ví dụ 6-1 trên đây, trừ việc sản phẩm nuôi cấy của chủng không được bổ sung vào gia vị kim chi.

Ví dụ 7: Phân tích các đặc tính của kim chi

7-1) So sánh mức tạo axit

Kim chi của từng ví dụ thử nghiệm 1 và các ví dụ so sánh 1 đến 3 được bảo quản ở 7°C trong 30 ngày, và mức độ tạo axit lactic của từng kim chi được xác định. Cụ thể, lượng đã định của từng kim chi được nghiền, và sau đó lọc qua gạc để tạo ra nước ép kim chi. Để phân tích lượng axit lactic trong nước ép kim chi, 3 ml nước ép kim chi được lấy ra, ly tâm (ở 10.000 g trong 10 phút), và lọc qua bộ lọc 0,2 µm, và sau đó các thành phần của nó được phân tích bằng phương pháp HPLC.

Kết quả là, có thể thấy rằng mức độ tạo axit lactic trong kim chi của ví dụ thử nghiệm 1 là 70 đến 75% so với mức độ tạo axit lactic trong từng kim chi theo ví dụ so sánh 3, được chế biến mà không sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng, và của các mẫu kim chi theo ví dụ so sánh 1 và 2, được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng chuẩn. Điều này cho thấy rằng khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181, sự tăng vị chua có thể được ngăn chặn để duy trì chất lượng vị giác của kim chi (bảng 5).

Bảng 5

	Ví dụ thử nghiệm 1	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ so sánh 3
Mức độ tạo axit lactic (mg/L)	5382,4	7379,2	7198,2	7585,4

7-2) So sánh mức tạo khí

Lượng định trước của kim chi theo từng ví dụ thử nghiệm 1 và ví dụ so sánh 1 đến 3 được đặt trong túi Al không có chất hấp thụ khí và bảo quản ở 7°C trong 30 ngày, và sự tăng thể tích được đo để xác định mức độ tạo khí của từng kim chi.

Kết quả là, mức độ tạo khí của kim chi theo ví dụ thử nghiệm 1 là 37 đến 41% so với mức độ tạo khí của kim chi theo ví dụ so sánh 1 và 2, được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy chủng chuẩn, và thấp hơn so với kim chi theo ví dụ so sánh 3, được chế biến mà không sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng bất kỳ. Điều này cho thấy rằng khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181, mức độ tạo khí của kim chi có thể giảm đáng kể để nhờ đó tăng mức thuận tiện khi phân phối kim chi (bảng 6).

Bảng 6

	Ví dụ thử nghiệm 1	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ so sánh 3
Mức độ tạo khí (cc/g)	0,95	2,54	2,33	2,02

7-3) So sánh mức tạo manitol

Kim chi theo từng ví dụ thử nghiệm 1 và ví dụ so sánh 1 đến 3 được bảo quản ở 7°C trong 30 ngày, và mức độ tạo manitol của từng kim chi được xác định. Cụ thể, lượng đã định của từng kim chi được nghiền, và sau đó lọc qua gạc để tạo ra nước ép kim chi. 3 ml nước ép kim chi được lấy ra, ly tâm (ở 10.000 g trong 10 phút), và lọc qua bộ lọc 0,2 µm, và sau đó các thành phần của nó được phân tích bằng phương pháp HPLC.

Kết quả là, có thể thấy rằng mức độ tạo manitol trong kim chi của ví dụ thử nghiệm 1 là 172 đến 176% so với mức độ tạo manitol trong từng kim chi theo ví dụ so sánh 3, được chế biến mà không sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng bất kỳ, và của các kim chi theo ví dụ so sánh 1 và 2, được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng chuẩn. Điều này cho thấy rằng khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy chủng

Leuconostoc mesenteroides CJLM181, kim chi được chế biến có thể chứa lượng lớn manitol, và do đó có độ ổn định bảo quản và chất lượng vị giác tuyệt vời (bảng 7).

Bảng 7

	Ví dụ thử nghiệm 1	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ so sánh 3
Mức độ tạo manitol (mg/L)	16553,4	9418,8	9628,7	8099,8

Số truy cập

Tên viện lưu trữ: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology;

Số truy cập: KCTC 13042BP;

Ngày lưu trữ: 10/06/2016.

Số hồ sơ của chủ đơn hoặc đại diện	Đơn quốc tế số PP17-0115
---------------------------------------	------------------------------------

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 vật liệu sinh học khác được đề cập đến trong phần mô tả ở trang <u>10</u> , dòng <u>1</u> .	
B. NHẬN DẠNG MẪU LƯU TRỮ Các mẫu lưu trữ khác được nhận dạng ở trang bổ sung ☐	
Tên viện lưu trữ Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology	
Địa chỉ viện lưu trữ (bao gồm mã bưu chính và nước) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 181 Ipsingil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do, 56212, Korea	
Ngày lưu trữ 10/06/2016	Số truy cập KCTC 13042BP
C. CÁC CHỈ ĐỊNH KHÁC (bỏ trống nếu không áp dụng) Thông tin này được tiếp tục ở trang bổ sung ☐	
D. CÁC QUỐC GIA ĐƯỢC CHỈ ĐỊNH (nếu các chỉ định này không phải là cho mọi quốc gia được chỉ định)	
E. CUNG CẤP CHỈ ĐỊNH RIÊNG (để trống nếu không áp dụng)	
Các chỉ định được liệt kê dưới đây sẽ được nộp cho Văn phòng quốc tế sau (ghi rõ bản chất chung của các chỉ định, ví dụ, "Số truy cập của mẫu lưu trữ")	

Chỉ dành cho Văn phòng nhận đơn ☐ Tờ khai này được nhận cùng với đơn quốc tế Cán bộ có thẩm quyền
--

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

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) tạo ra lượng khí giảm.
2. Chế phẩm men giống chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) hoặc sản phẩm nuôi cấy của chủng này.
3. Chế phẩm men giống theo điểm 2, trong đó chế phẩm này chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) với nồng độ 10^7 cfu/ml hoặc cao hơn.
4. Chế phẩm men giống theo điểm 2, trong đó chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều chất bảo quản lạnh đông được chọn từ nhóm gồm glyxerol, trehaloza, maltodextrin, sữa bột tách béo, và tinh bột.
5. Kim chi chứa chế phẩm men giống theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4.
6. Phương pháp chế biến kim chi, bao gồm bước cho chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 (KCTC 13042BP) theo điểm 1 hoặc chế phẩm men giống theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4 tiếp xúc với nguyên liệu cần lên men.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181 tạo ra lượng khí giảm, chế phẩm men giống chứa chủng này, kim chi chứa chế phẩm này và phương pháp chế biến kim chi bằng cách sử dụng chủng này

<130> 2018-OPCJ-1714PCT

<150> KR 10-2016-0090286

<151> 15-07-2016

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 986

<212> ADN

<213> Chưa biết

<220>

<223> Gen cho rARN 16S của *Leuconostoc mesenteroides* CJLM181

<400> 1

aaaagttcgg gtctccagcg gacacttaat gcgtagctt cggcactaag aggcggaaac	60
ctcctaacac ctagtgttca tcgtttacgg tgtggactac cagggtatct aatcctgttt	120
gctaccacaca ctttcgagcc tcaacgtcag ttgcagtcca gtaagccgcc ttgcgccactg	180
gtgttcttcc atatatctac gcattccacc gctacacatg gagttccact tacctctact	240
gcactcaagt taaccagttt ccaatgccat tccggagttg agctccgggc ttccacatca	300
gacttaataa accgtctgcg ctgcgtttac gcccaataaa tccggataac gctcgggaca	360
tacgtattac cgcggctgct ggcacgtatt tagccgtccc tttctgggtat ggtaccgtca	420
aactaaaatc atttctatt ctagctgttc ttcccataca acagtgttt acgacccgaa	480
agccttcate acacacggcg cggtgtcca tcaggctttc gccattgtg gaagattccc	540
tactgcagcc tcccgtagga gtttgggccg tgtctcagtc ccaatgtggc cgatcagtct	600
ctcaactcgg ctatgcatca ttgtcttggg aggcctttac cccaccaact aactaatgca	660
cgcgggatcc atctctaggt gacgccgaag cgccttttaa ctttttgtca tgcgacacta	720
agttttattc ggtattagca tctgtttcca aatgttatcc ccagccttga ggcaggttgt	780
ccacgtgtta ctcaccggtt cgccactcac ttgaaagggtg caagcacctt tcgctgtgcg	840
ttcgacttgc atgtattagg cacgcgcga gcgttcatcc tgacagagaa aaaaaacta	900
tataaagggt tttggggtaa aatttttaag gaatttaggg accaaaggta aaaagcttaa	960
aagggttccc tggttaccga tgtttg	986

<210> 2

<211> 1514

<212> ADN

<213> Chưa biết

<220>

<223> Gen cho rARN 16S của chủng *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CCMMB1121

<400> 2

gctcaggatg aacgctggcg gcgtgcctaa tacatgcaag tcgaacgcac agcgaaaggt	60
gcttgccacct ttcaagttag tggcgaacgg gtgagtaaca cgtggacaac ctgcctcaag	120
gctgggggata acatttgga acagatgcta ataccgata aaacttagtg tcgcatgaca	180
aaaagttaaa aggcgcttcg gcgtcaccta gagatggatc cgcgggtgcat tagtttagttg	240
gtgggggtaaa ggcctaccaa gacaatgatg catagccgag ttgagagact gatcggccac	300
attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggctg cagtagggaa tcttccacaa	360
tgggcgaaag cctgatggag caacgccgcg tgtgtgatga aggctttcgg gtcgtaaagc	420
actgttgtat gggaagaaca gctagaatag gaaatgattt tagtttgacg gtaccatacc	480
agaaagggac ggctaaatac gtgccagcag ccgcggtaat acgtatgtcc cgagcgttat	540
ccggatttat tgggcgtaaa gcgagcgcag acggtttatt aagtctgatg tgaaagcccg	600
gagctcaact ccggaatggc attggaaact ggttaacttg agtgcagtag aggtaagtgg	660
aactccatgt gtagcgggtg aatgcgtaga tatatggaag aacaccagtg gcgaaggcgg	720
cttactggac tgcaactgac gttgaggctc gaaagtgtgg gtagcaaaca ggattagata	780
ccctggtagt ccacaccgta aacgatgaac actagggtgtt aggaggtttc cgcctcttag	840
tgccgaagct aacgcattaa gtgttccgcc tggggagtac gaccgcaagg ttgaaactca	900
aaggaattga cggggacccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg	960
aagaacctta ccaggctctg acatcctttg aagcttttag agatagaagt gttctcttcg	1020
gagacaaagt gacaggtggg gcatggctgt cgtcagctcg tgcgtgaga tgttggttga	1080
agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattgtt agttgccagc attcagatgg gcaacttagc	1140
gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggc ggggacgacg tcagatcatc atgcccctta	1200
tgacctgggc tacacacgtg ctacaatggc gtatacaacg agttgccaac ccgcgagggt	1260
gagctaattc cttaaagtac gtctcagttc ggattgtagt ctgcaactcg actacatgaa	1320
gtcggaatcg ctagtaatcg cggatcagca cgcgcgggtg aatacgttcc cgggtcttgt	1380
acacaccgcc cgtcacacca tgggagtttg taatgcccac agccggtggc ctaacctttt	1440
aggaaggagc cgtctaaggc aggacagatg actgggggtga agtcgtaaca aggtagccgt	1500
aggagaacct gcgg	1514