



(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)



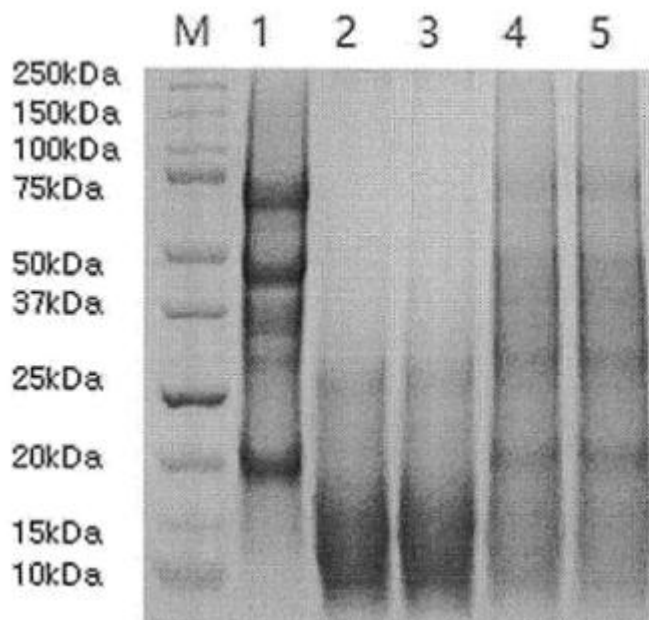
1-0039145

(51)^{2020.01} C12N 1/20; A23K 20/147; A23L 33/195; (13) B
A23K 10/12; A23L 33/185

- (21) 1-2020-01432 (22) 30/08/2018
(86) PCT/KR2018/010074 30/08/2018 (87) WO2019/045493 07/03/2019
(30) 10-2017-0111472 31/08/2017 KR; 10-2018-0054965 14/05/2018 KR
(45) 25/03/2024 432 (43) 25/06/2020 387
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea
(72) SEO, Hyojeong (KR); KIM, Bina (KR); KIM, Jungeun (KR); KIM, Seong Bo (KR);
PARK, Seung Won (KR); HONG, Youngho (KR).
(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ SẢN PHẨM ĐẬU NÀNH LÊN MEN SỬ DỤNG
CHUNG BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS VÀ SẢN PHẨM ĐẬU NÀNH
LÊN MEN ĐƯỢC ĐIỀU CHẾ BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề xuất chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P), chế phẩm kháng khuẩn chứa chủng này. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế sản phẩm đậu nành lên men bao gồm: cấy chuyển chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P) vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc; và thu được bã đậu nành lên men hoặc protein đậu nành cô đặc lên men, được lên men bằng cách nuôi cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens*, sản phẩm đậu nành lên men được điều chế theo phương pháp này và chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa sản phẩm lên men. Sản phẩm đậu nành lên men được điều chế bằng phương pháp này không chứa chất nhầy, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tối ưu và có hàm lượng các peptit trọng lượng phân tử thấp.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P) mới, chế phẩm kháng khuẩn chứa chủng này, phương pháp điều chế sản phẩm đậu nành lên men sử dụng chủng này, sản phẩm đậu nành lên men và chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa sản phẩm lên men.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thông thường, thức ăn chăn nuôi có chứa bột cá làm nguồn protein, nhưng chi phí bột cá đã tăng lên trên toàn thế giới do việc sản xuất chúng ở các nước sản xuất bột cá gần đây đã giảm, hoặc nguồn cung và nhu cầu bột cá không ổn định. Theo đó, nhu cầu nguồn protein thực vật có thể được sử dụng thay thế cho bột cá ngày càng tăng và những nỗ lực phát triển tương tự đang tiếp tục được tiến hành. Protein thực vật điển hình bao gồm protein có trong các loại đậu phộng, đậu và ngũ cốc, nhưng đậu nành trong protein đậu được biết là giàu protein, axit béo và polysaccharit hơn các loại đậu khác.

Bã đậu nành tách béo (sau đây gọi là bã đậu nành) là sản phẩm phụ còn lại sau khi chiết xuất chất béo từ đậu nành có các hàm lượng protein và chất béo cao. Tuy nhiên, bã đậu nành chứa các chất kháng dinh dưỡng (anti-nutritional factor: ANF) có thể làm giảm khả năng tiêu hóa khi được sử dụng làm thức ăn (Li và cộng sự, J. Anim Sci., 68:1790, 1990). Cụ thể là, chất ức chế trypsin (TI) được biết đến là chất chống oxy hóa điển hình làm giảm việc sử dụng protein bằng cách ức chế hoạt tính của enzym *in vivo*. Đặc biệt, khi các chất kháng dinh dưỡng được bổ sung vào thức ăn cho vật nuôi non, lượng sử dụng bị hạn chế. Ngoài ra, protein đậu nành được chiết xuất từ bã đậu nành sử dụng nước hoặc muối. Những protein đậu nành này có thể được phân loại thành các sản phẩm protein đậu nành đã qua chế biến của bã đậu nành tách béo, protein đậu nành cô đặc, protein đậu nành đã phối trộn, protein đậu nành thủy phân hoặc protein đậu nành phân lập tùy thuộc vào mức độ mà các thành phần không phải là protein như cacbohydrat tan trong nước và không hòa tan trong nước được loại bỏ từ bã đậu nành tách béo. Ngoài ra, do các protein đậu nành có hàm lượng protein cao, chúng có thể được sử dụng làm

thức ăn chăn nuôi, ngoài các sản phẩm thịt chế biến, các sản phẩm sữa chế biến và thực phẩm như bánh mì hoặc đồ ăn nhẹ.

Tuy nhiên, các protein đậu nành chiết xuất từ bã đậu nành có chứa protein trọng lượng phân tử cao bao gồm các tiểu đơn vị protein và nhiều chất kháng dinh dưỡng (ANF) làm suy giảm tiêu hóa hoặc tương tự. Cụ thể, các chất kháng dinh dưỡng này được biết là làm suy giảm khả năng tiêu hóa của các động vật. Theo đó, để sử dụng các protein đậu nành trong thức ăn chăn nuôi, cần tập trung nghiên cứu vào việc giảm các chất kháng dinh dưỡng để tăng khả năng tiêu hóa thức ăn chăn nuôi và chuyển đổi các protein trọng lượng phân tử cao thành các peptit trọng lượng phân tử thấp.

Trong khi đó, các sản phẩm protein đậu nành đã chế biến như protein đậu nành cô đặc, protein đậu nành phân lập hoặc protein đậu nành thủy phân hiện được sản xuất trải qua các quá trình xử lý hóa học hoặc enzym. Tuy nhiên, phương pháp xử lý hóa học đặt ra các vấn đề là chi phí sản xuất cao và để xử lý nhiệt, xử lý hóa học, sấy nhiệt hoặc tương tự trong quá trình sản xuất dẫn đến làm biến tính protein và mất axit amin hòa tan trong nước làm giảm đáng kể độ hòa tan protein. Do đó, phương pháp xử lý hóa học đã được xử lý nhiệt ở mức độ mà sự biến tính cực độ của protein không xảy ra. Do vậy, lượng đáng kể các chất ức chế trypsin là các chất kháng dinh dưỡng, có mặt trong sản phẩm protein đậu nành cuối cùng.

Sản phẩm đậu nành lên men bằng phương pháp chế biến sinh học để lên men bằng *Bacillus* hoặc nấm đã được phát triển như là cách để giải quyết các vấn đề về phương pháp chế biến hóa học của các sản phẩm protein đậu nành chế biến (Các Patent Hàn Quốc số 10-0645284, 10-0459240, 10-0925173, và 10-1139027). Tuy nhiên, ngay cả đối với bã đậu nành lên men hoặc protein đậu nành lên men cô đặc được điều chế bằng phương pháp chế biến sinh học, hàm lượng peptit trọng lượng phân tử thấp và hàm lượng các chất kháng dinh dưỡng trong sản phẩm chế biến có liên quan đến sự cải thiện khả năng tiêu hóa, có thể thay đổi tùy thuộc vào loài và chủng vi sinh vật như *Bacillus*, vi khuẩn axit lactic và nấm men. Cụ thể, ngay cả với cùng loài vi sinh vật, hàm lượng có thể thay đổi tùy thuộc vào khả năng sản xuất enzym và tốc độ sinh trưởng của từng chủng (Patent Hàn Quốc số 10-1517326). Tức là, chủng được sử dụng trong phương pháp chế biến sinh học là yếu tố quan trọng để chỉ ra sự khác biệt về đặc điểm và khả năng tiêu hóa của sản phẩm protein đậu nành chế biến cuối cùng.

Các kỹ thuật đã biết được đề cập bao gồm các patent Hàn Quốc số 10-0645284, 10-0459240, 10-0925173, và 10-1139027. Theo kỹ thuật được bộc lộ trong các patent, đúng là nguyên liệu protein chất lượng cao cho thức ăn có tỷ lệ hấp thụ tiêu hóa cao có thể được thực hiện do nhiều chất kháng dinh dưỡng có thể được loại bỏ trong quá trình lên men bằng cách sử dụng nuôi cấy giống của các quần thể vi sinh vật *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, *Lactobacillus reuteri*, và *Saccharomyces cerevisiae*, và protein hoặc cacbohyđrat còn có thể bị thoái biến thành dạng peptit trọng lượng phân tử thấp. Tuy nhiên, quần thể vi sinh vật, đặc biệt là *Bacillus subtilis* và *Bacillus amyloliquefaciens*, được sử dụng để lên men bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc, có nhược điểm là đề kháng thấp với các chất gây tạp nhiễm bên ngoài và khả năng sản xuất proteaza thấp do hoạt tính kháng khuẩn thấp. Ngoài ra, một số chủng vi sinh vật tạo ra chất nhầy trong quá trình lên men và do chất nhầy đó làm cho độ thấm của sản phẩm lên men bị suy giảm, do đó làm giảm hiệu quả của quá trình lên men hiếu khí.

Trong khi đó, tình trạng kỹ thuật đã biết liên quan đến sáng chế, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* K2G được chủ đơn bộc lộ trong Patent Hàn Quốc số 10-1517326 có khả năng loại bỏ các chất kháng dinh dưỡng, bao gồm các chất ức chế trypsin, có khả năng phân giải protein cao và hoạt tính kháng khuẩn cao, và rất hữu ích trong việc cung cấp thức ăn cho động vật có chứa peptit trọng lượng phân tử thấp. Tuy nhiên, các tài liệu tham khảo của tình trạng kỹ thuật đã biết được đề cập ở trên không bộc lộ cũng không đề xuất chủng mới có hoạt tính kháng khuẩn chống lại các vi sinh vật gây bệnh khác nhau bao gồm *Salmonella*, *Vibrio*, và *Photobacterium* và có khả năng làm tăng hàm lượng peptit trọng lượng phân tử thấp và ngăn chặn việc sản xuất chất nhầy và phương pháp điều chế sản phẩm đậu nành lên men bằng cách sử dụng chủng này.

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, các các giả sáng chế đã nỗ lực hết sức để phát triển phương pháp điều chế sản phẩm đậu nành lên men của các peptit trọng lượng phân tử thấp bằng cách cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P) mới vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc, và đã phát triển sản phẩm đậu nành lên men có hoạt tính kháng khuẩn tối ưu và không sản xuất chất nhầy với hàm lượng peptit trọng lượng phân tử thấp, từ đó hoàn thành sáng chế.

Tài liệu kỹ thuật liên quan

Tài liệu patent

(Tài liệu patent 1) Patent Hàn Quốc số 10-0645284 cấp ngày 06/11/2006

(Tài liệu patent 2) Patent Hàn Quốc số 10-0459240 cấp ngày 19/11/2004

(Tài liệu patent 3) Patent Hàn Quốc số 10-0925173 cấp ngày 29/10/2009

(Tài liệu patent 4) Patent Hàn Quốc số 10-1517326 cấp ngày 27/04/2015

(Tài liệu patent 5) Patent Hàn Quốc số 10-1139027 cấp ngày 16/04/2012

Tài liệu non- patent

(Tài liệu non- patent 1) Li và cộng sự, J. Anim Sci., 68:1790, 1990

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, các các giả sáng chế đã nỗ lực hết sức để phát triển phương pháp điều chế sản phẩm đậu nành lên men của các peptit trọng lượng phân tử thấp bằng cách cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P) mới vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc, và đã phát triển sản phẩm đậu nành lên men có hoạt tính kháng khuẩn tối ưu và không sản xuất chất nhầy với hàm lượng peptit trọng lượng phân tử thấp, từ đó hoàn thành sáng chế.

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế sản phẩm đậu nành lên men của các peptit trọng lượng phân tử thấp bằng cách cấy chuyển chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P) mới vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P) mới, trong đó hàm lượng peptit trọng lượng phân tử thấp được tăng lên và có hoạt tính kháng khuẩn tối ưu và không sản xuất chất nhầy.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất sản phẩm đậu nành lên men được điều chế bằng phương pháp nêu trên có hoạt tính kháng khuẩn tối ưu và không sản xuất chất nhầy.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa sản phẩm đậu nành lên men.

Các mục đích và hiệu quả khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng thông qua mô tả chi tiết kết hợp với các yêu cầu bảo hộ và hình vẽ kèm theo. Các nội dung không được mô tả trong bản mô tả này có thể được công nhận và suy luận đầy đủ bởi những người

có hiệu biết trung bình trong cùng lĩnh vực hoặc lĩnh vực tương đương với sáng chế và do đó mô tả về chúng sẽ được bỏ qua.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 theo sáng chế có hoạt tính kháng khuẩn và khả năng phân giải protein tối ưu và có khả năng sản xuất chất nhầy thấp. Do đó, sản phẩm đậu nành lên men chất lượng cao có hàm lượng peptit trọng lượng phân tử thấp và hoạt tính kháng khuẩn tối ưu có thể được điều chế bằng cách cấy chủng vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc. Cụ thể, nếu sản phẩm đậu nành lên men của sáng chế được cung cấp cho động vật dễ bị phơi nhiễm với các vi khuẩn gây bệnh khác nhau, không những có thể giảm tỷ lệ nhiễm trùng do vi khuẩn gây bệnh và tỷ lệ sống tăng lên do hoạt tính kháng khuẩn của nó, mà còn có thể tăng cường tốc độ hấp thu tiêu hóa do hàm lượng cao peptit trọng lượng phân tử thấp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh thể hiện protein đậu nành cô đặc lên men;

Fig.2 là hình ảnh thể hiện các kết quả SDS-PAGE của protein đậu nành cô đặc lên men;

Fig.3 là hình vẽ thể hiện các kết quả SDS-PAGE của bã đậu nành lên men;

Fig.4 là hình vẽ thể hiện các kết quả SDS-PAGE của bã đậu nành lên men dưới điều kiện độ ẩm thấp; và

Fig.5 là hình vẽ cây phả hệ thể hiện mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 mới theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Từng phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế có thể được áp dụng cho các phần mô tả và phương án khác, tương ứng. Tức là, tất cả sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không có bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể bên dưới.

Theo một khía cạnh để đạt được các mục đích trên, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế sản phẩm đậu nành lên men bao gồm: cấy chuyển chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P) vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô

đặc; và thu được bã đậu nành lên men hoặc protein đậu nành cô đặc lên men được lên men bằng cách nuôi cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens*.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 theo sáng chế có hoạt tính proteaza tối ưu và hoạt tính kháng khuẩn tối ưu chống lại mầm bệnh, và làm giảm khả năng sản xuất chất nhầy trong quá trình lên men, và do đó, có thể sản xuất sản phẩm đậu nành lên men chất lượng cao.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “sản phẩm đậu nành lên men” đề cập đến sản phẩm, protein đậu nành lên men hoặc loại bã đậu nành lên men thu được bằng cách cấy chủng của sáng chế hoặc chủng đối chứng vào protein đậu nành cô đặc hoặc bã đậu nành.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “protein đậu nành cô đặc” đề cập đến loại protein cô đặc được chiết xuất từ đậu nành, là cây họ đậu. Protein được chiết xuất từ đậu nành được sản xuất bằng cách chiết xuất dầu đậu nành từ đậu nành bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ như hexan hoặc tương tự và sau đó loại bỏ các thành phần không phải là protein như cacbohydrat hòa tan trong nước và không tan trong nước từ đậu nành tách béo còn lại.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “bã đậu nành” đề cập đến loại thức ăn chăn nuôi protein thực vật được sử dụng phổ biến nhất như sản phẩm từ làm sữa đậu nành, là cây họ đậu. Bã đậu nành là thức ăn chăn nuôi protein thực vật chất lượng cao và kinh tế nhất cho động vật và là sản phẩm phụ được sản xuất trong quá trình chiết xuất dầu từ đậu nành.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “*Bacillus amyloliquefaciens*” là vi sinh vật thuộc chi *Bacillus*, là loại vi khuẩn gram dương. Nó được biết đến là có mối quan hệ gần với *Bacillus subtilis* và tạo ra kháng sinh có tên là baARNse, loại enzym BamH1 và ribonucleaza. Vi khuẩn đất được biết đến là vi khuẩn hoạt tính kháng khuẩn chống lại nhiễm trùng rễ cây, đặc biệt là trong nông nghiệp.

Trong những năm gần đây, việc sử dụng các kháng sinh đã bị hạn chế trong thức ăn chăn nuôi và các sản phẩm đậu nành lên men, protein thực vật đang được sử dụng làm nguồn protein. Do đó, đặc tính kháng khuẩn tự nhiên của chế phẩm thức ăn, cụ thể là hoạt tính kháng khuẩn của các sản phẩm đậu nành lên men đã trở nên quan trọng hơn

trong việc giảm các bệnh do vi sinh vật gây bệnh. Theo đó, các tác giả sáng chế đã nỗ lực hết sức để phát triển chủng có hoạt tính kháng khuẩn chống lại các mầm bệnh khác nhau đồng thời có khả năng sản xuất proteaza có hoạt tính tối ưu và giảm khả năng sản xuất chất nhầy trong quá trình lên men. Cụ thể, *Bacillus amyloliquefaciens* được sử dụng để điều chế các sản phẩm đậu nành lên men thông thường đã được điều chế, và các chủng đã được lựa chọn và phân lập bằng bức xạ UV để cải thiện chủng, trong số đó, *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 của sáng chế có hoạt tính kháng khuẩn tối ưu chống lại các vi sinh vật gây bệnh khác nhau có thể được chọn. Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “cải thiện” có thể đạt được bằng phương pháp đột biến, tái tổ hợp di truyền, tạo dòng gen hoặc tương tự để cải thiện các khiếm khuyết hoặc năng suất của chủng và đột biến có thể bao gồm gen, nhiễm sắc thể hoặc đột biến gen. Đột biến vật lý, đột biến hóa học hoặc đột biến sinh học sử dụng các tia UV có thể được sử dụng để gây đột biến và các tia UV có thể được chiếu xạ bằng đèn UV trong một khoảng thời gian trong đó bước sóng từ 200 nm đến 300 nm đạt tỷ lệ tử vong từ 95% đến 100%. Theo sáng chế, bước sóng UV là 254 nm được chiếu xạ trong một khoảng thời gian trong đó tỷ lệ tử vong của chủng vi khuẩn hoang dại đạt 99,99%, do đó chỉ phân lập và thu được các chủng đột biến hình thành khuẩn lạc.

Theo một phương án, *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 theo sáng chế có hoạt tính kháng khuẩn tối ưu chống lại các mầm bệnh. Ví dụ, *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 có hoạt tính kháng khuẩn chống lại ít nhất một mầm bệnh được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella typhimurium*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium damsela*, *Listonella anguillarum*, và *Edwardsiella tarda*. Hoạt tính kháng khuẩn có thể được đo bằng phương pháp pha loãng, thí nghiệm khuếch tán đĩa, E-TEST hoặc tương tự.

Cụ thể, *Salmonella* có thể gây ngộ độc thực phẩm trong chăn nuôi, và các vi khuẩn khác bao gồm các loài *Vibrio* được biết là gây bệnh ở cá nuôi bao gồm nhiễm trùng huyết, *Vibrio cholerae*, bệnh *Vibrio* ở tôm, bệnh pasteurellosis ở cá cam và bệnh edwardsiellosis ở cá bơn. Đối với các vi khuẩn gây bệnh này, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* của sáng chế có hiệu quả ức chế sự phát triển của chúng, và do đó, sản phẩm đậu nành lên men được điều chế bằng cách sử dụng chủng này hoặc sản phẩm đậu nành lên men có chứa chủng này có thể có hoạt tính kháng khuẩn chống lại các mầm bệnh này.

Các sản phẩm đậu nành lên men thông thường tồn tại vấn đề ở chỗ chất nhầy dính được tạo ra do sự trùng hợp của fructan dạng levan và polyglutamat dẫn xuất từ sacarit và protein của nguyên liệu đậu nành thô, tương ứng, do enzym sản xuất trong quá trình lên men. Việc sản xuất chất nhầy làm cho các sản phẩm đậu nành lên men kết tụ thành cục, gây khó khăn trong việc khuấy trộn và khó kiểm soát và vận chuyển oxy hòa tan và nhiệt độ trong các sản phẩm lên men, do đó gây ra nhiều vấn đề trong quá trình sản xuất hàng loạt. Việc sản xuất chất nhầy có thể được xác định bằng cách đo độ nhớt hoặc độ bóng của chúng bằng cách quan sát kiểu hình của các khuẩn lạc hoặc bằng cách đo hàm lượng của polyme như axit poly- γ -glutamic.

Theo một phương án, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 theo sáng chế có thể có khả năng sản xuất chất nhầy thấp. Cụ thể hơn, sản phẩm đậu nành lên men được sản xuất từ chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có hàm lượng chất nhầy dính thấp và khó kết tụ thành cục, do đó, các sản phẩm đậu nành lên men chất lượng cao có thể được điều chế bằng cách sử dụng chủng này (xem ví dụ 4).

Theo một phương án, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 theo sáng chế có thể sản xuất proteaza hoạt tính cao và thủy phân hầu hết protein đậu nành được cấu thành từ các polyme, thoái biến thành các peptit trọng lượng phân tử thấp, do đó làm tăng đáng kể tỷ lệ hấp thụ tiêu hóa của sản phẩm đậu nành lên men. Các peptit của sáng chế tạo thành polyme bằng các tổ hợp axit amin khác nhau thông qua liên kết peptit và thường bao gồm từ 2 đến 50 axit amin liên kết với nhau. Peptit trọng lượng phân tử thấp là peptit nhỏ có trọng lượng phân tử thấp và có ưu điểm là tạo điều kiện thuận lợi cho sự hấp thụ trong quá trình tiêu hóa, do đó làm tăng khả năng tiêu hóa của nó khi sử dụng làm thức ăn chăn nuôi. Tùy thuộc vào loại và tỷ lệ thành phần của peptit trọng lượng phân tử thấp có trong sản phẩm thủy phân mong muốn được điều chế cuối cùng, các điều kiện về độ ẩm, hàm lượng protein, hoặc tương tự của protein đậu nành cô đặc, làm nguyên liệu thô, có thể lựa chọn và sử dụng phù hợp.

Theo một phương án, sản phẩm đậu nành lên men được điều chế bởi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* theo sáng chế có thể chứa tối thiểu 40% peptit trọng lượng phân tử thấp có trọng lượng phân tử 30 kDa trở xuống. Cụ thể hơn, sản phẩm đậu nành lên men chứa 40% đến 100%, 50% đến 95%, 60% đến 90%, 70% đến 90%, 75% đến 90%, 75% đến 85%, hoặc 80% đến 85% peptit có trọng lượng phân tử 30 kDa trở xuống.

Ngoài ra, sản phẩm đậu nành lên men có thể chứa tối thiểu 15% peptit có trọng lượng phân tử 10 kDa trở xuống. Cụ thể hơn, sản phẩm đậu nành lên men có thể chứa 15% đến 80%, 20% đến 70%, 30% đến 65%, 40% đến 65% hoặc 50% đến 60% peptit có trọng lượng phân tử 10 kDa trở xuống. Tỷ lệ % có thể đề cập đến tỷ lệ phần trăm của phần diện tích biểu thị cho phạm vi trọng lượng phân tử cụ thể trên tổng diện tích phân bố trọng lượng phân tử protein đo bởi GPC. Theo một phương án, sản phẩm đậu nành lên men được điều chế từ chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có thể có hàm lượng protein tăng so với trước khi lên men. Điều này chỉ ra rằng thời gian lên men có thể được rút ngắn bằng cách tăng hàm lượng protein trong một khoảng thời gian ngắn hơn ngay cả khi so sánh với các sản phẩm đậu nành lên men được lên men với chủng thông thường đã được biết đến. Tức là, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* theo sáng chế có thể cải thiện chất lượng thức ăn chăn nuôi bằng cách tăng đáng kể hàm lượng peptit trọng lượng phân tử thấp trong sản phẩm đậu nành lên men và có thể rút ngắn thời gian lên men bằng cách tăng hàm lượng protein nhanh hơn.

16S rARN của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 của sáng chế đã được phân tích, và kết quả là, nó cho thấy có mối quan hệ gần với *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* FZB42T (CP000560) là giống chuẩn và sự tương đồng trình tự gen 16S rARN được xác nhận là 99,93% (1507 bp/1508 bp). Do đó, chủng đột biến CJ24-34 theo sáng chế được đặt tên là *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* CJ24-34 và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 15 tháng 6 năm 2017, theo Hiệp ước Budapest và được chỉ định số đăng ký KCCM12038P.

Theo một phương án, phương pháp điều chế sản phẩm đậu nành lên men có thể còn bao gồm các bước kiểm soát độ ẩm của bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc và xử lý nhiệt và làm lạnh trước khi cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc. Tốt hơn là tiến hành xử lý nhiệt trong một thời gian xác định trước sau khi kiểm soát độ ẩm của bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc là nguyên liệu thô, bằng cách phun trực tiếp hoặc trộn lượng nước thích hợp trước khi lên men rắn. Cụ thể, độ ẩm có thể được kiểm soát đối với hàm lượng các protein hoặc peptit trọng lượng phân tử thấp của sản phẩm đậu nành lên men mong muốn hoặc cho mục đích thiết lập thời gian lên men. Ngoài ra, mục đích của xử lý nhiệt là tiêu diệt các loại vi trùng khác nhau trong nguyên liệu thô và làm biến tính protein bằng cách phá hủy thành tế bào của nguyên liệu thô, từ đó cung cấp môi trường trong đó vi sinh vật

mong muốn có thể sinh trưởng mạnh mẽ. Phương pháp xử lý nhiệt có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau được biết đến rộng rãi trong kỹ thuật mà không bị giới hạn. Cụ thể, nó có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hơi nước hoặc hơi quá nhiệt.

Theo một phương án, bã đậu nành hoặc protein cô đặc của sáng chế có thể được điều chế bằng cách kiểm soát độ ẩm trong khoảng từ 30% (v/w) đến 80% (v/w) và thực hiện xử lý nhiệt trong 10 phút đến 30 phút trong khi kiểm soát nhiệt độ xử lý nhiệt đến 70°C đến 130°C, sau đó làm mát đến 30°C đến 50°C. Dung dịch nuôi cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 của sáng chế có thể được cấy chuyển 10% trọng lượng dựa trên trọng lượng của từng bã đậu nành và protein đậu nành cô đặc và lên men ở 20°C đến 50°C trong 8 giờ đến 72 giờ.

Cụ thể hơn, độ ẩm được kiểm soát (v/w) của bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc có thể nằm trong khoảng từ 30% đến 80%, 30% đến 70%, 30% đến 60%, 30% đến 50%, 30% đến 40%, 40% đến 80%, 40% đến 70%, 40% đến 60%, hoặc 40% đến 50%. Độ ẩm của bã đậu nành có thể được kiểm soát thích hợp ở điều kiện độ ẩm thấp hoặc điều kiện độ ẩm cao đối với hàm lượng các protein hoặc peptit trọng lượng phân tử thấp của bã đậu nành lên men mong muốn hoặc cho mục đích thiết lập thời gian lên men.

Theo một phương án, khi nhiệt độ xử lý nhiệt thấp hoặc thời gian xử lý ngắn, vấn đề được đặt ra là tác dụng diệt khuẩn của vi trùng có thể giảm đi và quá trình lên men tiếp theo có thể không được thực hiện trôi chảy. Ngược lại, khi nhiệt độ xử lý nhiệt cao hoặc thời gian xử lý dài, khả năng tiêu hóa bị giảm do sự biến tính của protein trong bã đậu nành, và do đó chất lượng của sản phẩm cuối cùng bị suy giảm. Theo đó, tốt hơn là lựa chọn nhiệt độ xử lý nhiệt hoặc thời gian xử lý trong phạm vi trên để tránh xảy ra những vấn đề nêu trên. Thông qua quá trình xử lý nhiệt, tác dụng tạo ra môi trường hóa học tại đó các chất gây ô nhiễm có trong bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc gần như bị tiêu diệt và quá trình lên men rắn tiếp theo được thực hiện trôi chảy. Ngoài ra, hy vọng rằng các chất kháng dinh dưỡng như chất ức chế trypsin (TI) làm giảm khả năng tiêu hóa có thể giảm nhẹ.

Cụ thể hơn, nhiệt độ xử lý nhiệt có thể nằm trong khoảng từ 70°C đến 120°C, 70°C đến 110°C, 70°C đến 100°C, 80°C đến 130°C, 80°C đến 120°C, 80°C đến 110°C, 80°C

đến 100°C, 90°C đến 130°C, 90°C đến 120°C, 90°C đến 110°C, hoặc 90°C đến 100°C. Hơn nữa, thời gian xử lý nhiệt có thể cụ thể hơn là từ 10 phút đến 30 phút hoặc 20 phút đến 30 phút.

Bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc được xử lý nhiệt như mô tả bên trên có thể được làm mát đến nhiệt độ có thể lên men rắn. Quá trình làm mát có thể được thực hiện thông qua quá trình vận chuyển sử dụng bộ làm mát không khí kiểu băng tải. Cụ thể hơn, nó có thể được thực hiện cho đến khi nhiệt độ của bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc đạt 30°C đến 50°C, 35°C đến 45°C, hoặc 35°C đến 40°C.

Nhiệt độ nuôi cấy cho quá trình lên men có thể là 20°C đến 50°C, cụ thể hơn là 30°C đến 50°C, 40°C đến 50°C, 30°C đến 40°C, hoặc 20°C đến 40°C, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây và có thể thay đổi theo chất lượng của sản phẩm đậu nành lên men mong muốn. Ngoài ra, thời gian nuôi cấy cho quá trình lên men có thể là 8 giờ đến 72 giờ, cụ thể hơn là, 10 giờ đến 70 giờ, 10 giờ đến 60 giờ, 10 giờ đến 50 giờ, 10 giờ đến 40 giờ, 10 giờ đến 30 giờ, 10 giờ đến 20 giờ, hoặc 8 giờ đến 18 giờ, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây và có thể thay đổi tùy theo chất lượng của sản phẩm đậu nành lên men mong muốn.

Theo một phương án của sáng chế, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 theo sáng chế có thể được cấy chuyển vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc với lượng 10^5 CFU/g đến 10^9 CFU/g, 10^5 CFU/g đến 10^8 CFU/g, 10^6 CFU/g đến 10^9 CFU/g, hoặc 10^6 CFU/g đến 10^8 CFU/g. Lượng chủng được cấy chuyển có thể là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình lên men rắn của bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc. Khi lượng chủng được cấy chuyển nhỏ, có thể mất nhiều thời gian để điều chế sản phẩm lên men, và do đó, thời gian lên men kéo dài và có khả năng cao bị tạp nhiễm bởi các vi sinh vật khác. Ngược lại, khi lượng chủng được cấy chuyển quá cao, thời gian lên men có thể được rút ngắn, nhưng có thể khó duy trì môi trường lên men thích hợp. Cụ thể, vì hiệu suất lên men có thể phụ thuộc phần lớn vào đặc tính sinh trưởng của chủng lên men và loại thiết bị lên men, tốt hơn là lựa chọn lượng cấy chuyển thích hợp dựa vào các đặc điểm của chủng trong giai đoạn sản xuất.

Theo một phương án của sáng chế, sản phẩm đậu nành lên men có thể thu được bằng cách cấy chuyển chủng *Bacillus amyloliquefaciens* theo sáng chế vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc, sau đó lên men rắn. Ví dụ, thiết bị lên men đóng gói có

thể được sử dụng trong quá trình lên men. Thiết bị lên men đóng gói có thể bao gồm nhiều loại khác nhau, như thiết bị nuôi cấy thông khí theo mẻ, thiết bị nuôi cấy kiểu kín, thiết bị nuôi cấy thông khí kiểu liên tục hoặc tương tự, và bất kỳ loại nào có thể được sử dụng trong phương pháp của sáng chế không giới hạn miễn là nó có thể được sử dụng để điều chế các sản phẩm đậu nành lên men, và thiết bị thích hợp có thể được lựa chọn và sử dụng theo quy mô sản xuất. Ví dụ, bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc được cấy chủng có thể được đặt trong thiết bị lên men đóng gói ở độ dày 5 cm đến 50 cm và lên men ở 20°C đến 50°C trong 8 giờ đến 72 giờ.

Theo một phương án, phương pháp của sáng chế có thể còn bao gồm các bước sấy khô và nghiền thành bột sản phẩm đậu nành lên men thu được sau bước lên men ở nhiệt độ thấp và độ ẩm thấp. Độ ẩm còn lại của sản phẩm đậu nành lên men ngay sau khi lên men có thể là 20% (v/w) đến 50% (v/w). Quá trình sấy có thể được bổ sung để điều chế sản phẩm cuối cùng của sản phẩm đậu nành lên men có độ ẩm từ 10% (v/w) đến 12% (v/w). Sau khi hoàn thành quá trình lên men, có thể bổ sung quá trình nghiền sau quá trình sấy để tạo kích thước hạt đồng đều của sản phẩm đậu nành lên men, vì trong sản phẩm đậu nành lên men có thể đã bị vón cục. Quá trình sấy khô và nghiền có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau được biết đến trong kỹ thuật tương ứng. Tuy nhiên, nếu quá trình sấy được thực hiện ở nhiệt độ quá cao, vi khuẩn sống trong sản phẩm đậu nành lên men có thể bị tiêu diệt, và do đó, quá trình sấy tốt nhất là được thực hiện ở nhiệt độ thấp. Ngoài ra, quá trình nghiền có thể được thực hiện để có các kích cỡ khác nhau tùy thuộc vào mục đích sử dụng của sản phẩm đậu nành lên men; ví dụ, máy nghiền búa có thể được sử dụng.

Sản phẩm đậu nành lên men được điều chế bằng cách sử dụng chủng *amyloliquefaciens* theo sáng chế có thể cải thiện tỷ lệ hấp thụ tiêu hóa của động vật do hàm lượng cao peptit trọng lượng phân tử thấp và do đó tính ứng dụng cao làm nguyên liệu thức ăn protein chất lượng cao, có thể thay thế protein động vật do hàm lượng protein cao.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P), môi trường nuôi cấy chủng, môi trường nuôi cấy cô đặc, hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường nuôi cấy. Như đã mô tả bên trên, chủng này là chủng mới, và sản phẩm đậu nành lên men được điều chế bằng chủng này có hàm lượng chất nhầy

thấp nhưng có hàm lượng peptit trọng lượng phân tử thấp và thể hiện hoạt tính kháng khuẩn.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng khuẩn chứa chủng *Bacillus amyloliquefaciens*, môi trường nuôi cấy chủng, môi trường nuôi cấy cô đặc hoặc sản phẩm nuôi sấy khô và có hoạt tính kháng khuẩn chống lại ít nhất một mầm bệnh được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella typhimurium*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium damsela*, *Listonella anguillarum*, và *Edwardsiella tarda*. Để hiểu rõ hơn chi tiết liên quan đến vấn đề trên, có thể tham khảo nội dung được mô tả bên trên và các ví dụ.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa các sản phẩm đậu nành lên men được điều chế bằng phương pháp trên. Hàm lượng của sản phẩm đậu nành lên men trong chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được kiểm soát hợp lý tùy thuộc vào loại và độ tuổi của vật nuôi được sử dụng, hình thức sử dụng, các hiệu quả mong muốn hoặc tương tự. Ví dụ, nó có thể được sử dụng với số lượng từ 1% trọng lượng đến 99% trọng lượng, cụ thể hơn là 10% trọng lượng đến 90% trọng lượng và 20% trọng lượng đến 80% trọng lượng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Để sử dụng, chế phẩm thức ăn chăn nuôi của sáng chế ngoài các sản phẩm đậu nành lên men có thể còn bao gồm hỗn hợp của ít nhất một loại axit hữu cơ như axit xitric, axit fumaric, axit adipic, axit lactic chất chống oxy hóa tự nhiên như polyphenol, catechin, tocopherol, vitamin C, chiết xuất trà xanh, chitosan, axit tannic, hoặc tương tự. Nếu cần thiết, chất phụ gia điển hình khác như chất chống cúm, chất đệm, tác nhân kìm hãm vi khuẩn hoặc chất tương tự có thể được bổ sung vào. Ngoài ra, chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính hoặc chất bôi trơn có thể được bổ sung vào để tạo thành chế phẩm dạng tiêm như dung dịch nước, huyền phù, nhũ tương hoặc tương tự, viên nang, hạt, hoặc dạng viên.

Ngoài ra, chế phẩm thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể được sử dụng cùng với các chất bổ trợ khác nhau như các axit amin, muối vô cơ, vitamin, chất chống oxy hóa, chất chống nấm, chất kháng khuẩn hoặc tương tự, và chất bổ sung dinh dưỡng, chất tăng tốc độ sinh trưởng, chất tăng tốc hấp thụ tiêu hóa, và chất phòng bệnh, ngoài các thành phần chính bao gồm thức ăn chăn nuôi protein thực vật như lúa mì bột hoặc lúa mì vỡ, lúa mạch, ngô, hoặc tương tự, thức ăn protein động vật như bột máu, bột thịt, bột cá,

hoặc các loại tương tự, mỡ động vật, và dầu thực vật.

Khi chế phẩm thức ăn chăn nuôi của sáng chế được sử dụng làm phụ gia thức ăn chăn nuôi, chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể được bổ sung vào hoặc được sử dụng cùng với các chế phẩm khác, và có thể được sử dụng thích hợp theo phương pháp phổ biến. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể được điều chế ở dạng sử dụng theo công thức phóng thích ngay lập tức hoặc công thức phóng thích từ từ, kết hợp với các chất mang được dụng không độc hại. Các chất mang ăn được có thể là tinh bột ngô, lactoza, sucroza hoặc propylen glycol. Chất mang rắn có thể sử dụng ở dạng viên nén, bột, viên ngậm đệt hoặc tương tự, và chất mang lỏng có thể sử dụng ở dạng xi-rô, huyền phù lỏng, nhũ tương, dung dịch hoặc tương tự. Ngoài ra, chất được sử dụng có thể bao gồm chất bảo quản, chất bôi trơn, chất tăng tốc độ dung dịch hoặc chất ổn định và cũng có thể bao gồm các chất khác để cải thiện các bệnh viêm nhiễm và chất hữu ích để phòng chống vi rút.

Chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được áp dụng cho chế độ ăn của động vật, tức là thức ăn cho nhiều động vật bao gồm động vật có vú, gia cầm, cá và động vật giáp xác. Nó có thể được sử dụng cho các động vật có vú quan trọng về mặt thương mại như lợn, trâu bò, dê hoặc tương tự, động vật trong vườn thú như voi, lạc đà, hoặc các loại tương tự, hoặc vật nuôi như chó, mèo, v.v. Gia cầm quan trọng về mặt thương mại có thể bao gồm gà, vịt, ngỗng, hoặc tương tự, và cá và động vật giáp xác được nuôi thương mại như cá hồi và tôm cũng có thể được bao gồm.

Chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được trộn lượng khoảng 10 g đến 500 g, tốt nhất là 10 g đến 100 g mỗi 1 kg trọng lượng khô của thức ăn chăn nuôi. Sau khi được trộn hoàn toàn, chế phẩm thức ăn chăn nuôi tốt nhất có thể được cung cấp dưới dạng nghiền hoặc tiếp tục được ép viên, mở rộng hoặc ép đùn.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 theo sáng chế đề xuất để điều chế sản phẩm đậu nành lên men.

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 mới, phương pháp điều chế sản phẩm đậu nành lên men bằng cách sử dụng chủng này, và sản phẩm lên men của chúng. Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ và ví dụ thực nghiệm. Tuy nhiên, những ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ và ví dụ thực nghiệm.

Ví dụ 1: Phân lập chủng *Bacillus amyloliquefaciens* mới

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* (sau đây gọi là chủng “CJ2323”, tham chiếu Patent Hàn Quốc số 10-1517326) đã được biết là được sử dụng phổ biến để lên men bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc, đã được điều chế, và sau đó, quá trình cải thiện chủng đã được thực hiện theo cách sau.

Trước tiên, chủng CJ823 được kích hoạt bằng cách nuôi cấy trong môi trường tấm canh TSB (thành phần môi trường: 17,0 g enzym thoái biến casein, 3,0 g enzym thoái biến bã đậu nành, 5,0 g natri clorua (NaCl), 2,5 g kali phosphat, 2,5 g dextroza, 15,0 g thạch, nhiệt độ 25°C, độ pH cuối cùng: $7,3 \pm 0,2$) ở nhiệt độ 37°C trong 12 giờ. Chủng được kích hoạt được sử dụng nuôi cấy giống bằng cách tạo huyền phù khoảng 2 bạch kim (pha loãng đến độ hấp thụ khoảng 0,2 ở bước sóng 660 nm) trong 9 ml dung dịch khử trùng NaCl 0,8%. 50 ml TSB được điều chế trước đó được cấy với huyền phù nuôi cấy giống ở mức 1% và sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C với tốc độ 180 vòng/phút cho đến khi độ hấp thụ ở bước sóng 660 nm đạt khoảng 4,0 đến 5,0. Sau khi nuôi cấy giống, dung dịch nuôi cấy được ly tâm (8000 vòng/phút, nhiệt độ 4°C, 10 phút) để phân lập các tế bào khỏi phần nổi phía trên. Các tế bào phân lập được rửa hai lần bằng dung dịch khử trùng NaCl 0,8% cùng lượng với dung dịch nuôi cấy. 20 ml dung dịch khử trùng NaCl 0,8% được trộn với các tế bào sao cho nồng độ tế bào đạt được độ hấp thụ khoảng 0,8 ở bước sóng 660 nm và 15 ml hỗn hợp được áp dụng cho đĩa petri vô trùng. Tiếp theo, các tia UV được chiếu vào các tế bào ở độ cao khoảng 50 cm với bước sóng 254 nm bằng đèn UV (VIBER LOURMAT, 115 V, 60 Hz). Việc chiếu xạ UV được thực hiện trong một khoảng thời gian cho đến khi tỷ lệ tử vong của chủng vi khuẩn hoang dại đạt 99,99% theo thời gian chiếu xạ UV. Sau đó, 0,1 ml hỗn hợp chiếu xạ UV đã được bổ sung vào môi trường tấm canh TSA (thành phần môi trường: thạch đậu nành tryptic, 15 g enzym thoái biến casein, 5 g enzym thoái biến bã đậu nành, 5 g NaCl, 15 g thạch, nhiệt độ 25°C, độ pH cuối cùng: $7,3 \pm 0,2$) ở nhiệt độ 37°C trong 12 giờ và chỉ các chủng đột biến hình thành các khuẩn lạc được phân lập và thu được.

Ví dụ 2: Đo khả năng phân giải protein và hoạt tính kháng khuẩn của *Bacillus amyloliquefaciens*

Khả năng phân giải protein và hoạt tính kháng khuẩn của từng chủng đột biến thu được khi phân lập theo ví dụ 1 đã được xác nhận bằng phương pháp sau. *Bacillus subtilis* (số đăng ký KCCM11438P) và *Bacillus amyloliquefaciens* (chủng CJ823) được biết đến trong kỹ thuật được sử dụng làm chủng đối chứng, (sau đây gọi là các chủng đối chứng 1 và đối chứng 2).

1) Khả năng phân giải protein

Để đo khả năng phân giải protein của các chủng đột biến thu được trong ví dụ 1, các chủng được nuôi cấy bằng cách cấy trong môi trường thạch YM (3,0 g chiết xuất nấm men, 3,0 g chiết xuất mạch nha, 10,0 g pepton, 20,0 g thạch) chứa 2% (w/v) sữa tách béo (Difco, Hoa Kỳ) và kích thước của vòng vô khuẩn (C) được hình thành do sự thoái biến của cơ chất được đo cùng lúc trong khi đo đường kính của khuẩn lạc được hình thành (sinh trưởng (G)).

Cụ thể hơn, từng chủng đột biến được nuôi cấy trong môi trường TSB (thành phần môi trường: 17,0 g enzym thoái biến casein, 3,0 g enzym thoái biến bã đậu nành, 5,0 g NaCl, 2,5 g đikali phosphat, 2,5 g dextroza, độ pH cuối cùng: $7,3 \pm 0,2$ ở nhiệt độ 25°C) ở nhiệt độ 37°C trong 12 giờ với tốc độ khuấy 200 vòng/phút. Sau đó, 1,0 μL dung dịch nuôi cấy cho từng chủng đột biến được chia nhỏ vào môi trường thạch YM có chứa sữa tách béo và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, đường kính (G) của các khuẩn lạc được hình thành trên môi trường nuôi cấy và kích thước (C) của vòng vô khuẩn đã được đo.

2) Hoạt tính kháng khuẩn chống lại *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium (ATCC14028) là mầm bệnh phổ biến có khả năng gây bệnh cho vật nuôi, được sử dụng để đo hoạt tính kháng khuẩn của các chủng đột biến thu được trong ví dụ 1 bên trên. Cụ thể hơn, từng chủng đột biến được nuôi cấy trong môi trường GYP (thành phần môi trường: 10 g glucoza, 8 g chiết xuất nấm men, 2 g polypepton, độ pH: 7,0) ở nhiệt độ 37°C trong 12 giờ với tốc độ khuấy 180 vòng/phút. 1,5 μL dung dịch nuôi cấy cho từng chủng đột biến được chia nhỏ vào môi trường thạch GYP (thành phần môi trường: 10 g glucoza, 8 g chiết xuất nấm men, 2 g polypepton, 15 g thạch, độ pH: 7,0) được bổ sung 1×10^5 CFU/mL *Salmonella typhimurium* và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, kích thước của vòng vô khuẩn được hình thành xung quanh các khuẩn lạc của các chủng đột biến đã được đo và

hiệu giá kháng thể của hoạt tính kháng khuẩn được đo.

Bảng 1

Tên chủng	C	G	C/G	C-G	Hoạt tính kháng khuẩn
Đối chứng 1	6,6	6,6	1,00	0,00	++
Đối chứng 2	12,46	8,31	1,50	4,15	++++
CJ24-1	13,02	7,05	1,85	5,97	+++++
CJ24-3	13,91	6,78	2,05	7,13	+++++
CJ24-4	14	6,76	2,07	7,24	+++++
CJ24-5	14,06	7,02	2,00	7,04	+++++
CJ24-6	13,79	6,78	2,03	7,01	+++++
CJ24-7	13,56	6,57	2,06	6,99	+++++
CJ24-9	13,45	6,34	2,12	7,11	+++++
CJ24-10	13,15	6,46	2,04	6,69	+++++
CJ24-11	13,5	6,82	1,98	6,68	+++++
CJ24-12	13,31	6,68	1,99	6,63	+++++
CJ24-13	13,76	6,62	2,08	7,14	+++++
CJ24-14	13,6	7,23	1,88	6,37	-
CJ24-15	14,15	6,94	2,04	7,21	+++++
CJ24-16	13,26	5,92	2,24	7,34	+++++
CJ24-17	13,27	6,07	2,19	7,20	+++++
CJ24-18	13,37	5,95	2,25	7,42	+++++
CJ24-19	13,7	6,94	1,97	6,76	+++++
CJ24-20	13,94	7,38	1,89	6,56	+++++
CJ24-21	13,18	6,86	1,92	6,32	+++++
CJ24-22	13,26	6,35	2,09	6,91	++++
CJ24-23	13,73	6,69	2,05	7,04	+++++
CJ24-24	13,79	7,5	1,84	6,29	+++++
CJ24-25	13,4	6,45	2,08	6,95	+++++
CJ24-26	14,08	7,23	1,95	6,85	+++++
CJ24-27	13,9	7,93	1,75	5,97	++
CJ24-28	13,82	5,92	2,33	7,90	+++++
CJ24-29	13,93	5,87	2,37	8,06	+++++
CJ24-30	13,55	5,99	2,26	7,56	+++++
CJ24-31	13,22	5,91	2,24	7,31	++++
CJ24-32	13,64	5,81	2,35	7,83	+++
CJ24-33	13,91	6,11	2,28	7,80	++++

CJ24-34	14,13	6,21	2,28	7,92	+++++
CJ24-35	15,11	7,13	2,12	7,98	+
CJ24-36	12,91	5,11	2,53	7,80	+++

Bảng 1 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn thông qua các phép đo kích thước của vòng vô khuẩn (C), đường kính của khuẩn lạc (G), tỷ lệ của chúng (C/G), sự khác biệt kích thước của chúng (C-G) và kích thước của vòng vô khuẩn được đo sau khi nuôi cấy các chủng đã hoàn thành.

Theo bảng 1, trong số các chủng đột biến CJ24-28, CJ24-29, CJ24-32, CJ24-33, CJ24-34, và CJ24-36 có tỷ lệ kích thước của vòng vô khuẩn so với kích thước của các khuẩn lạc được hình thành (C/G) (2,28-2,53) cao hơn, trong đó CJ24-28, CJ24-29 và CJ24-34 có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất (tất cả +++++). Ngược lại, đối chứng 1 có giá trị C/G thấp nhất và đối chứng 2 có giá trị C/G thấp thứ hai (tương ứng là 1,00 và 1,50) và các hoạt tính kháng khuẩn của chúng chỉ tương ứng là ++ và +++. Tức là, đã xác nhận rằng các chủng đột biến đã tăng cường khả năng phân giải protein và hoạt tính kháng khuẩn so với chủng *Bacillus subtilis* và *Bacillus amyloliquefaciens* thông thường được biết đến. Do đó, khi các chủng được áp dụng cho protein đậu nành cô đặc hoặc bã đậu nành để điều chế sản phẩm đậu nành lên men, có thể dự tính rằng sản phẩm đậu nành lên men sẽ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn.

Ví dụ 3: Đo hoạt tính kháng khuẩn của chủng CJ24-34

Thí nghiệm đã được tiến hành thêm để xác nhận chủng CJ24-34 có khả năng phân giải protein tối ưu hay không vì kích thước lớn nhất của vòng vô khuẩn (C) và đường kính của khuẩn lạc (G) trong số các chủng (CJ24-28, CJ24 -29 và CJ24-34) được chọn có hoạt tính kháng khuẩn tối ưu trong ví dụ 2, có hoạt tính kháng khuẩn chống lại các vi sinh vật gây bệnh khác ngoài *Salmonella*. Để xác nhận hoạt tính kháng khuẩn, các vi sinh vật gây bệnh như *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium damsela*, *Listonella anguillarum*, *Lactococcus garvieae*, và *Edwardsiella tarda* đã được sử dụng và chúng được biết là gây bệnh ở cá nuôi như nhiễm trùng huyết, *Vibrio cholerae*, vibriosis ở tôm, pasteurellosis ở cá cam, streptococcosis ở cá bơn và bệnh edwardsiellosis ở cá bơn. Trong số các vi sinh vật gây bệnh, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium damsela*, và *Lactococcus garvieae* là các chủng thu được từ Bộ sưu tập nuôi cấy mầm bệnh quốc gia thuộc chi nhánh Đại học Quốc gia

Gyeongsang, và *Listonella anguillarum* và *Edwardsiella tarda* thu được từ KCTC. Từng vi sinh vật gây bệnh được nuôi cấy trong môi trường và nhiệt độ tương ứng theo bảng 2 bên dưới. Sau đó, các khuẩn lạc đơn lẻ được chọn, và chúng được chuyển vào ống nghiệm và được nuôi cấy trước trong môi trường chất lỏng tương ứng qua đêm. Dung dịch tiền nuôi cấy được cấy chuyển 0,1% lại vào 100 mL môi trường chất lỏng tương ứng cho từng vi khuẩn gây bệnh và nuôi cấy trong khoảng 12 giờ. Dung dịch nuôi cấy được sử dụng để điều chế môi trường thạch cho từng vi khuẩn gây bệnh để kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn.

Bảng 2

Vi khuẩn gây bệnh	Bệnh gây ra	Số đăng ký	Điều kiện nuôi cấy		
			Môi trường thạch	Môi trường lỏng	Nhiệt độ (°C)
<i>Vibrio vulnificus</i>	Vibriosis ở tôm	P4710	Thạch Marine (BD Difco)	Canh Marine (BD Difco)	30
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vibriosis ở tôm	P4712	Thạch Marine (BD Difco)	Canh Marine (BD Difco)	30
<i>Photobacterium damsela</i>	Pasteurellosis ở cá cam	P4482	Thạch Marine (BD Difco)	Canh Marine (BD Difco)	30
<i>Listonella anguillarum</i>	Vibriosis ở cá cam	KCTC 2711	Thạch MRS (BD Difco)	Canh MRS (BD Difco)	30
<i>Lactococcus garvieae</i>	Streptococcosis ở cá bơn	P4737	Thạch Marine (BD Difco)	Canh Marine (BD Difco)	30
<i>Edwardsiella tarda</i>	Edwardsiellosis ở cá bơn	KCTC 12267	Canh dinh dưỡng (BD Difco) + 0,2% thạch	Canh dinh dưỡng (BD Difco)	37

Các khuẩn lạc đơn thu được bằng cách nuôi cấy chủng CJ24-34 của sáng chế trong môi trường thạch GYP (1% glucoza, 0,8% chiết xuất nấm men, 0,2% pepton, 0,2% thạch) được cấy chuyển vào ống nghiệm chứa 3 ml môi trường GYP (1% glucoza, 0,8% chiết xuất nấm men, 0,2% pepton) và được nuôi cấy trước qua đêm ở nhiệt độ 37°C với tốc độ 180 vòng/phút. Dung dịch tiền nuôi cấy được cấy chuyển ở mức 0,1% vào 100 mL môi trường GYP và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C với tốc độ 180 vòng/phút. Tiếp theo, các dung dịch nuôi cấy sau 16 giờ và 20 giờ nuôi cấy được cố định và 10 ml mỗi dung dịch nuôi cấy được ly tâm với tốc độ 8.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C để thu

hồi phần nổi trên bề mặt. Phần nổi trên bề mặt được lọc lại qua đầu lọc ống tiêm 0,2 mm để điều chế dịch lọc.

Để kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của các chất kháng khuẩn được tiết ra từ chủng CJ24-34 trong môi trường thạch, môi trường thạch tương ứng với điều kiện nuôi cấy của từng vi khuẩn gây bệnh đã được điều chế và khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Môi trường thạch được làm lạnh và dung dịch nuôi cấy của từng vi khuẩn gây bệnh đã được điều chế trước khi môi trường thạch đã đông cứng được bổ sung vào môi trường thạch ở mức 1% và trộn, sau đó hỗn hợp này được chuyển vào đĩa vuông để hóa rắn môi trường thạch cấy từng vi khuẩn gây bệnh. Cốc xi lanh peni được đặt trên đĩa môi trường thạch đã đông rắn hoàn toàn và 300 μ L mỗi dịch lọc chủng CJ24-34 (16 giờ, 20 giờ) đã điều chế trước đã được nạp vào mỗi cốc, và vi khuẩn tương ứng được nuôi cấy theo các điều kiện nuôi cấy của từng loại vi khuẩn gây bệnh. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, đo kích thước của vòng vô khuẩn xuất hiện trong môi trường thạch được nuôi cấy với từng vi khuẩn gây bệnh. Tại thời điểm này, kích thước của cốc xi lanh peni là 7 mm và kích thước của vòng vô khuẩn được so sánh bằng cách đo đường kính của điểm bao gồm vòng vô khuẩn được tạo ra bởi chất kháng khuẩn. Sự tăng kích thước của vòng vô khuẩn cho thấy rằng vi khuẩn gây bệnh không thể sinh trưởng do các chất kháng khuẩn được tiết ra bởi chủng CJ24-34. Ngoài ra, trong thí nghiệm này, vòng vô khuẩn được tạo ra bên trong cốc xi lanh peni được hiểu là chỉ số hoạt tính kháng khuẩn, nhưng kích thước của chúng không được đo bằng vòng vô khuẩn được tạo ra bên ngoài cốc xi lanh peni.

Bảng 3

Vi khuẩn gây bệnh	Bệnh gây ra	Số đăng ký	Kích thước của vòng vô khuẩn theo thời gian nuôi cấy (mm) * kích thước của cốc xi lanh peni: 7 mm	
			16 giờ	20 giờ
<i>Vibrio vulnificus</i>	Vibriosis ở tôm	P4710	9	10
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vibriosis ở tôm	P4712	7 (vòng vô khuẩn bên trong được tạo ra)	7 (vòng vô khuẩn bên trong được tạo ra)
<i>Photobacterium damsela</i>	Pasteurellosis ở tôm	P4482	15	15
<i>Listonella anguillarum</i>	Vibriosis ở tôm	KCTC 2711	14	14

<i>Lactococcus garviae</i>	Streptococcus ở cá bon	P4737	Không có vòng vô khuẩn	Không có vòng vô khuẩn
<i>Edwardsiella tarda</i>	Edwardsiella ở cá bon	KCTC 12267	25	25

Liên quan đến kích thước của vòng vô khuẩn được thể hiện trong bảng 3, đã xác nhận rằng chủng CJ24-34 của sáng chế tiết ra các chất kháng khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn chống lại loại vi khuẩn gây bệnh cụ thể. Kích thước của cốc xi lanh peni là 7 mm, và dựa trên điều này, đã xác nhận rằng các chất kháng khuẩn của chủng CJ24-34 đã ức chế sự phát triển của *Vibrio vulnificus*, *Photobacterium damsel*, *Listonella anguillarum*, và *Edwardsiella tarda*. Trong khi đó, khi đo kích thước của vòng vô khuẩn bên ngoài, kích thước vòng vô khuẩn của *Vibrio parahaemolyticus* là 7 mm, tương đương với kích thước của cốc xi lanh peni và nó có thể được đánh giá là không có hoạt tính kháng khuẩn. Tuy nhiên, đã xác nhận rằng vòng vô khuẩn tồn tại một phần bên trong cốc xi lanh peni khi nhìn thực chất trên đĩa, và do đó, có thể suy ra rằng có một số hoạt tính kháng khuẩn chống lại mầm bệnh này. Tức là, chủng CJ24-34 cho thấy hoạt tính kháng khuẩn chống lại 5 loại vi khuẩn gây bệnh (*Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium damsel*, *Listonella anguillarum*, và *Edwardsiella tarda*) trong số 6 loại vi khuẩn gây bệnh được thử nghiệm trong thí nghiệm này. Do đó, khi chủng CJ24-34 của sáng chế được áp dụng cho protein đậu nành cô đặc hoặc bã đậu nành, hy vọng rằng sản phẩm đậu nành lên men ngăn chặn sự tăng sinh của vi khuẩn gây bệnh và chế phẩm thức ăn chăn nuôi có chứa sản phẩm này có thể được điều chế.

Ví dụ 4: Đo khả năng sản xuất chất nhầy của *Bacillus amyloliquefaciens*

Để xác nhận khả năng sản xuất chất nhầy của các chủng đột biến CJ24-28, CJ24-29 và CJ24-34, đã được chọn có khả năng phân giải protein và hoạt tính kháng khuẩn tối ưu trong ví dụ 2, các chủng được tiếp tục nuôi cấy trong môi trường thạch GYP, và kiểu hình của từng khuẩn lạc được quan sát chặt chẽ. Đối chứng 2 (*Bacillus amyloliquefaciens*, chủng CJ823) là nhóm đối chứng được mô tả trong ví dụ 2 đã được sử dụng.

Theo kết quả của thí nghiệm, khuẩn lạc của chủng đối chứng 2 được quan sát là có độ nhớt và bóng, điều này đã xác nhận việc sản xuất chất nhầy, trong khi ở các khuẩn lạc của các chủng đột biến CJ24-28, CJ24-29 và CJ24-34 được chọn trong ví dụ 2, đã được xác nhận rằng sản xuất chất nhầy đã bị ức chế vì không quan sát thấy độ bóng hoặc

độ nhớt.

Ví dụ 5: Khả năng sản xuất chất nhầy và khả năng lên men của chủng CJ24-34 trong protein đậu nành cô đặc

Thí nghiệm đã được thực hiện để xác nhận khả năng sản xuất chất nhầy và lên men của các chủng khi chủng CJ24-34 được xác nhận là có khả năng phân giải protein và hoạt tính kháng khuẩn tối ưu giữa các chủng đột biến được chọn trong ví dụ 2 và ví dụ 3, được lên men bằng cách cấy chuyển vào protein đậu nành cô đặc. Chủng đối chứng 1 (*Bacillus subtilis* có số đăng ký KCCM11438P) và chủng đối chứng 2 (*Bacillus amyloliquefaciens*: CJ823) được đề cập trong ví dụ 2 đều được sử dụng làm nhóm đối chứng.

Chủng CJ24-34 được nuôi cấy trước trong môi trường GYP (thành phần môi trường: glucoza 10 g/L, chiết xuất nấm men 8 g/L, pepton đậu nành 2 g/L) và dung dịch nuôi cấy thu được từ quá trình tiền nuôi cấy đã được cấy chuyển lại vào môi trường GYP sao cho hàm lượng của chúng chiếm 1% và nuôi cấy cho đến khi độ hấp thụ ở bước sóng 660 nm tối thiểu là 6.

Nồng độ protein đậu nành đã được điều chế bằng cách kiểm soát độ ẩm khoảng 43% (v/w) và xử lý nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút, sau đó làm mát ở 30°C đến 50°C. 10% trọng lượng của dung dịch nuôi cấy dựa trên trọng lượng của protein cô đặc của chủng CJ24-34 được cấy chuyển vào protein đậu nành cô đặc tiền xử lý, và độ ẩm của dung dịch nuôi cấy được kiểm soát khoảng 46%.

Nồng độ protein đậu nành được lên men trong 16 giờ trong buồng với nhiệt độ và độ ẩm không đổi được duy trì ở nhiệt độ 37°C và độ ẩm 95%. Trước khi lên men, độ pH của protein đậu nành cô đặc là khoảng 6,8 và từng chủng được cấy chuyển với lượng khoảng 10⁷ CFU/g. Sau khi hoàn thành quá trình lên men, việc sản xuất chất nhầy đã được kiểm tra, và độ ẩm, số lượng tế bào sống và độ pH của sản phẩm lên men được đo lại.

Hàm lượng protein và hàm lượng protein tăng lên của sản phẩm lên men được đo dựa trên trọng lượng khô sau khi sấy sản phẩm lên men.

Fig.1 là hình ảnh thể hiện protein đậu nành cô đặc lên men được lên men bằng cách sử dụng chủng CJ24-34 và hai chủng đối chứng. Các Fig.1A và C là hình ảnh của

protein đậu nành cô đặc lên men được lên men với chủng đối chứng 1 (*Bacillus subtilis*) và CJ24-34 theo sáng chế, tương ứng, và đã được xác nhận rằng việc sản xuất chất nhầy đã bị ức chế vì không thấy nhót hoặc vón cục trong quá trình lên men các sản phẩm. Ngược lại, Fig.1B là hình ảnh của protein đậu nành cô đặc lên men được lên men với chủng đối chứng 2 (*Bacillus amyloliquefaciens*). Các sản phẩm lên men rất nhót và hình thành vón cục. Đó là do *Bacillus amyloliquefaciens* thông thường tạo ra lượng chất nhầy đáng kể trong quá trình lên men, trong khi *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 theo sáng chế hầu như không tạo ra chất nhầy, do đó xác nhận rằng nó có thể hữu ích cho việc sản xuất hàng loạt sản phẩm lên men.

Bảng 4

Tên chủng	Thời gian (giờ)	Độ ẩm (%)	Số lượng tế bào sống (CFU/g)	Độ pH	Hàm lượng protein (% trọng lượng khô)	Hàm lượng protein tăng (% trọng lượng khô)
Đối chứng 1 (<i>Bacillus subtilis</i>)	0	45,49	$1,1 \times 10^8$	6,84	63,3	
	16	38,94	$7,8 \times 10^9$	8,45	68,0	4,0
Đối chứng 2 (CJ823)	0	45,94	$1,6 \times 10^8$	6,76	63,9	
	16	39,19	$4,6 \times 10^9$	8,23	68,0	4,1
CJ24-34 của sáng chế	0	45,86	$6,1 \times 10^7$	6,83	64,2	
	16	37,73	$1,8 \times 10^9$	8,28	68,3	4,0

Để kiểm tra các đặc tính của sản phẩm lên men được điều chế bằng cách sử dụng chủng CJ24-34 của sáng chế, độ ẩm theo thời gian (0 giờ, 16 giờ), số lượng tế bào sống, độ pH, hàm lượng protein và hàm lượng protein tăng lên của protein đậu nành cô đặc lên men, trong đó từng chủng bao gồm các đối chứng đã được áp dụng, đã được xác nhận (bảng 4). Theo kết quả của thí nghiệm, protein đậu nành cô đặc lên men được lên men với CJ24-34 theo sáng chế có độ ẩm khoảng 37% đến 39%, độ pH tối thiểu là 8 và số lượng tế bào sống tối thiểu khoảng 10^9 CFU/g. Ngoài ra, hàm lượng protein đã tăng khoảng 4% so với hàm lượng protein của nguyên liệu thô, khẳng định khả năng lên men.

Ví dụ 6: Thoái biến protein và phân bố trọng lượng phân tử của protein đậu nành cô đặc lên men

Trong ví dụ này, sự thoái biến protein và phân bố trọng lượng phân tử của các protein đậu nành cô đặc lên men của ví dụ 5 đã được phân tích để xác nhận kích thước

và phân bố của các peptit có trong sản phẩm lên men. Chúng được đo tương ứng bằng SDS-PAGE và GPC.

1) SDS-PAGE (Điện di gel Polyacrylamit)

100 mg nguyên liệu thô (protein đậu nành cô đặc) và protein đậu nành cô đặc lên men (protein đậu nành cô đặc lên men của chủng CJ24-34 và protein đậu nành cô đặc lên men của chủng đối chứng 1) được điều chế theo ví dụ 5 được tạo huyền phù trong 5 mL dung môi ure 8 M, nghiền bằng sóng siêu âm, và sau đó ly tâm (ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 10 phút) để phân lập phần chất nổi bên trên. Phần chất nổi bên trên được định lượng là axit bicinchoninic và được nạp vào gel SDS-PAGE.

Fig.2 là hình ảnh hiển thị kết quả SDS-PAGE của protein đậu nành cô đặc lên men. Từ dải bên trái trên Fig.2, M biểu thị dấu ấn sinh học, 1 biểu thị sự phân bố protein của nguyên liệu thô (protein đậu nành cô đặc), 2 và 3 biểu thị sự phân bố protein của protein đậu nành cô đặc lên men của chủng CJ24-34 theo sáng chế, và 4 và 5 biểu thị sự phân bố protein của protein đậu nành cô đặc lên men của chủng đối chứng 1. Theo phân bố protein thể hiện trên Fig. 2, có thể khẳng định rằng nồng độ protein đậu nành cô đặc lên men của chủng CJ24-34 theo sáng chế hầu như không chứa polyme protein và chủ yếu bao gồm các peptit trọng lượng phân tử thấp, và do đó, có thể cải thiện tỷ lệ hấp thụ tiêu hóa khi chủng tương ứng được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi. Ngược lại, protein đậu nành cô đặc lên men của chủng đối chứng 1 vẫn chứa các polyme protein, xác nhận rằng các polyme protein không bị phân hủy đúng cách.

2) GPC (sắc ký thẩm thấu gel)

GPC là phương pháp để biết được sự phân bố protein trọng lượng phân tử trong mẫu cần đo, bằng cách phân tích các protein tiêu chuẩn có trọng lượng phân tử khác nhau để xác định thời gian lưu của từng protein, sau đó bằng cách tính đường cong chuẩn cho mối liên hệ giữa trọng lượng phân tử và thời gian lưu. Cụ thể hơn, sau thời gian lưu của protein có trọng lượng phân tử cụ thể được tính toán, sắc ký được chia thành các phần theo thời gian và tỷ lệ phần diện tích của từng phạm vi trọng lượng phân tử trong toàn bộ vùng sắc ký được tính toán.

100 mg nguyên liệu thô (protein đậu nành cô đặc) và protein đậu nành cô đặc lên men (protein đậu nành cô đặc lên men của chủng CJ24-34 và protein đậu nành cô đặc

lên men của chủng đối chứng 1) được điều chế theo ví dụ 5 được tạo huyền phù trong 5 mL dung môi urê 8 M, nghiền bằng sóng siêu âm, và sau đó ly tâm (ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 10 phút) để phân lập phần nổi bên trên. Sau đó, phần nổi bên trên được lọc qua đầu lọc ống tiêm 0,45 μ m, và dịch lọc được phân tích bởi GPC. Các kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5

MW (kDa)	Vật liệu thô (protein đậu nành cô đặc)	Protein cô đặc lên men của chủng CJ24-34 (1)	Protein cô đặc lên men của chủng CJ24-34 (2)	Protein cô đặc lên men của chủng đối chứng (1)	Protein cô đặc lên men của chủng đối chứng 1 (2)
>75	22,40	5,59	6,05	17,22	18,28
30–75	46,99	14,07	13,57	36,30	38,08
10–30	15,92	24,57	24,27	21,99	20,71
5–10	4,70	22,04	21,86	8,94	8,17
<5	9,98	33,73	34,26	15,54	14,76
Tổng	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Bảng 5 thể hiện các kết quả GPC của nguyên liệu thô và protein cô đặc lên men. Như thể hiện trong bảng 5, protein đậu nành cô đặc lên men (1) và (2) của chủng CJ24-34 theo sáng chế chứa khoảng 80% peptit có trọng lượng phân tử từ 30 kDa trở xuống và khoảng 55% peptit có trọng lượng phân tử từ 10 kDa trở xuống, xác nhận rằng chúng chủ yếu bao gồm các peptit trọng lượng phân tử thấp. Ngược lại, mặc dù các protein cô đặc lên men của chủng đối chứng 1 chứa nhiều peptit trọng lượng phân tử thấp hơn so với nguyên liệu thô, nhưng hàm lượng của các peptit có trọng lượng phân tử từ 10 kDa trở xuống chỉ khoảng 23% đến 24%, xác nhận rằng chúng chủ yếu bao gồm các peptit trọng lượng phân tử cao.

Ví dụ 7: Khả năng lên men bã đậu nành, thoái biến protein và phân bố trọng lượng phân tử của chủng CJ24-34

Để xác nhận chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 theo sáng chế có khả năng lên men tối ưu ngay cả khi áp dụng cho bã đậu nành hay không, hai loại *Bacillus amyloliquefaciens* (KCCM11471P và KCCM11906P) được sử dụng như chủng sản xuất bã đậu nành lên men, được sử dụng làm đối chứng, và khả năng lên men của chúng đã được xác nhận. KCCM11471P và KCCM11906P được đánh dấu tương ứng là chủng

đối chứng 3 và nhóm đối chứng 4.

Các chủng *Bacillus* được nuôi cấy trước trong môi trường GYP (thành phần môi trường: glucoza 10 g/L, chiết xuất nấm men 8 g/L, pepton đậu nành 2 g/L), và dung dịch nuôi cấy thu được từ quá trình nuôi cấy được cấy chuyển lại vào môi trường GYP ở mức 1% và nuôi cấy cho đến khi độ hấp thụ ở bước sóng 660 nm đạt tối thiểu là 6.

Bã đậu nành đã được điều chế bằng cách kiểm soát độ ẩm đến khoảng 43% (v/w) và xử lý nhiệt ở 100°C trong 30 phút, sau đó làm mát ở 30°C đến 50°C. 10% trọng lượng của các dung dịch nuôi cấy *Bacillus* trên trọng lượng của bã đậu nành được cấy chuyển vào bã đậu nành tiền xử lý, và độ ẩm của dung dịch nuôi cấy được kiểm soát khoảng 46%. Trước khi lên men, độ pH của bã đậu nành là khoảng 6,8 và từng chủng được cấy chuyển với lượng khoảng 10^7 CFU/g. Bã đậu nành được cấy chuyển với dung dịch nuôi cấy được lên men trong 18 giờ trong buồng nhiệt độ và độ ẩm không đổi được duy trì ở nhiệt độ 37°C và độ ẩm 95%. Bã đậu nành lên men sau 14, 16 và 18 giờ từ khi bắt đầu lên men đã được lấy mẫu và sự thay đổi hàm lượng protein theo thời gian được đo và kết quả được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6

Phân loại	Thời gian lên men (giờ)	Bã đậu nành lên men của chủng đối chứng 3	Bã đậu nành lên men của chủng đối chứng 4		Bã đậu nành lên men của chủng CJ24-34		
		1	1	2	1	2	3
Hàm lượng protein (% trọng lượng khô)	0	54,1	54,2	54,1	54,2	54,1	54,1
	14	58,9	59,5	59,6	59,9	59,9	60,0
	16	59,4	59,7	59,5	60,2	60,0	60,0
	18	59,4	59,6	59,8	60,8	60,5	60,1
Tăng hàm lượng protein (% trọng lượng khô)	14	4,7	5,3	5,5	5,7	5,8	5,9
	16	5,3	5,5	5,4	6	5,9	5,9
	18	5,2	5,4	5,6	6,6	6,3	5,9

Bảng 6 thể hiện hàm lượng protein và hàm lượng protein tăng lên trong bã đậu nành lên men. Như thể hiện trong bảng 6, hàm lượng protein và hàm lượng protein tăng lên của bã đậu nành lên men của chủng CJ24-34 cao hơn so với chủng đối chứng 3 hoặc chủng đối chứng 4. Cụ thể hơn, khi quá trình lên men được thực hiện trong cùng một khoảng thời gian, hàm lượng protein của bã đậu nành lên men của chủng CJ24-34 cao

hơn khoảng 1% so với chủng đối chứng 3 và trung bình cao hơn khoảng 0,5% so với đối chứng 4. Từ vấn đề kỹ thuật điều chế bã đậu nành lên men, vấn đề rất quan trọng là rút ngắn thời gian lên men bằng cách tăng nhanh hàm lượng protein, và do đó, *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 của sáng chế có lợi thế là nó có thể cải thiện năng suất của sản phẩm đậu nành lên men và giảm chi phí sản xuất.

Trong khi đó, để xác nhận kích thước của các peptit cấu thành lên bã đậu nành lên men, sự thoái biến protein và phân bố trọng lượng phân tử của bã đậu nành lên men được lên men với chủng CJ24-34 và nguyên liệu thô (bã đậu nành) đã được phân tích. Về vấn đề này, GPC đã được sử dụng theo cách tương tự như được mô tả trong ví dụ 6.

Fig.3 là hình ảnh thể hiện các kết quả SDS-PAGE của nguyên liệu thô (bã đậu nành) và bã đậu nành lên men được lên men với chủng CJ24-34. Từ dải bên trái trên Fig.3, M biểu thị dấu ấn sinh học, 1 biểu thị phân bố protein của nguyên liệu thô (bã đậu nành) và 2 biểu thị sự phân bố protein của bã đậu nành lên men được lên men với chủng CJ24-34 theo sáng chế. Như thể hiện trên Fig. 3, đã xác nhận rằng bã đậu nành lên men của chủng CJ24-34 theo sáng chế không chứa polyme protein và hầu hết bao gồm các peptit trọng lượng phân tử thấp, và do đó, có thể cải thiện tỷ lệ hấp thụ tiêu hóa khi chủng tương ứng đã được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi.

Bảng 7

MW (kDa)	Nguyên liệu thô (bã đậu nành)	Bã đậu nành lên men của CJ24-34
> 75	44,9%	8,1%
30–75	36,9%	10,0%
10–30	9,1%	23,5%
5–10	2,4%	22,5%
<5	6,7%	35,9%
Tổng	100,0%	100,0%

Bảng 7 thể hiện các kết quả GPC để kiểm tra thành phần peptit của nguyên liệu thô (bã đậu nành) và bã đậu nành lên men. Như thể hiện trong bảng 7, nguyên liệu thô (bã đậu nành) chứa khoảng 82% peptit có trọng lượng phân tử từ 30 kDa trở lên và chủ yếu bao gồm các peptit có trọng lượng phân tử cao.

Ngược lại, bã đậu nành lên men được lên men với chủng CJ24-34 theo sáng chế chứa khoảng 82% peptit có trọng lượng phân tử từ 30 kDa trở xuống và khoảng 58%

peptit có trọng lượng phân tử từ 10 kDa trở xuống, xác nhận rằng nó chủ yếu bao gồm các peptit trọng lượng phân tử thấp. Tức là, hầu hết các polyme protein có trong nguyên liệu thô đã bị thoái biến thành các peptit trọng lượng phân tử thấp, và do đó, có thể dự đoán rằng khả năng tiêu hóa có thể tăng lên khi chúng được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi.

Ví dụ 8: Khả năng lên men bã đậu nành của chủng CJ24-34 trong điều kiện độ ẩm thấp

Chủng CJ24-34 theo sáng chế đã được nuôi cấy trước trong môi trường GYP (thành phần môi trường: glucoza 10 g/L, chiết xuất nấm men 8 g/L, pepton đậu nành 2 g/L) và dung dịch nuôi cấy thu được từ quá trình tiền nuôi cấy được cấy chuyển lại vào môi trường GYP ở mức 1% và nuôi cấy cho đến khi độ hấp thụ ở bước sóng 660 nm đạt tối thiểu là 6.

Bã đậu nành đã được chuẩn bị bằng cách kiểm soát độ ẩm đến khoảng 31% (v/w) và xử lý nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút, sau đó làm lạnh ở 30°C đến 50°C. 10% trọng lượng của dung dịch nuôi cấy *Bacillus* dựa trên trọng lượng của bã đậu nành được cấy chuyển vào bã đậu nành tiền xử lý và độ ẩm của môi trường nuôi cấy được kiểm soát trong điều kiện độ ẩm thấp khoảng 36%. Bã đậu nành được cấy chuyển dung dịch nuôi cấy được lên men trong 12 giờ trong buồng nhiệt độ và độ ẩm không đổi được duy trì ở nhiệt độ 37°C và độ ẩm 95%. Bã đậu nành lên men ở 8, 10 và 12 giờ kể từ khi bắt đầu quá trình lên men đã được lấy mẫu, và tiến hành đo độ ẩm, số lượng tế bào sống, hàm lượng protein và sự tăng hàm lượng protein.

Bảng 8

Thời gian (giờ)	Độ ẩm (%)	Số lượng tế bào sống (CFU/g)	Hàm lượng protein (% trọng lượng khô)	Tăng hàm lượng protein (% trọng lượng khô)
0	37,1	$4,4 \times 10^8$	52,34	
8	35,15	$8,2 \times 10^9$	54,6	2,26
10	33,25	$7,6 \times 10^9$	55,93	3,59
12	31,55	$7,0 \times 10^9$	56,1	3,76

Như thể hiện trong bảng 8, khi thời gian lên men trôi qua, độ ẩm giảm dần và số lượng tế bào sống tăng lên $7,0 \times 10^9$ CFU/g. Ngoài ra, do hàm lượng đường của bã đậu nành được sử dụng trong quá trình sinh trưởng của *Bacillus*, đã xác nhận rằng hàm lượng

protein đã tăng khoảng 4% sau 12 giờ trong sản phẩm lên men. Tức là, đã xác nhận rằng chủng theo sáng chế có khả năng lên men ngay cả trong bã đậu nành trong điều kiện độ ẩm thấp. Để xác nhận thành phần kích thước của peptit trong bã đậu nành trong điều kiện độ ẩm thấp, SDS-PAGE và GPC đã được phân tích theo cách tương tự như được mô tả trong ví dụ 6 để xác nhận sự thoái biến protein và phân bố trọng lượng phân tử.

Fig.4 là hình ảnh thể hiện các kết quả SDS-PAGE của bã đậu nành lên men trong điều kiện độ ẩm thấp. Từ dải bên trái của Fig.4, M biểu thị dấu ấn sinh học, 1 biểu thị sự phân bố protein của nguyên liệu thô (bã đậu nành) và 2, 3 và 4 biểu thị sự phân bố protein của bã đậu nành lên men tương ứng được lên men trong 8 giờ, 10 giờ và 12 giờ. Như thể hiện trên Fig.4, vì các polyme protein của nguyên liệu bã đậu nành đã bị thoái biến trong quá trình lên men, hàm lượng peptit trọng lượng phân tử thấp tăng lên, do đó xác nhận rằng điều này có thể mang lại hiệu quả tăng khả năng tiêu hóa khi áp dụng cho thức ăn chăn nuôi.

Bảng 9

Trọng lượng phân tử (kDa)	Nguyên liệu thô (Bã đậu nành)	Bã đậu nành lên men sau 8 giờ	Bã đậu nành lên men sau 10 giờ	Bã đậu nành lên men sau 12 giờ
> 75	54,9	27,5	21,6	20,9
30–75	28,8	30,2	27,1	27,1
10–30	8,0	22,9	26,7	27,2
5–10	2,2	9,1	12,2	12,4
<5	6,1	10,3	12,5	12,4
Tổng	100,0	100,0	100,0	100,0

Bảng 9 thể hiện các kết quả GPC của bã đậu nành lên men trong điều kiện độ ẩm thấp theo nguyên liệu thô và thời gian lên men (8, 10, 12 giờ). Như thể hiện trong bảng 9, sản phẩm đậu nành lên men được lên men với chủng CJ24-34 theo sáng chế trong 12 giờ có khoảng 52% peptit có trọng lượng phân tử từ 30 kDa trở xuống và khoảng 24,8% peptit có trọng lượng phân tử từ 10 kDa trở xuống. Ngược lại, nguyên liệu thô (bã đậu nành) chủ yếu bao gồm các polyme peptit, chứa khoảng 16,3% peptit có trọng lượng phân tử từ 30 kDa trở xuống. Điều đó có thể xác nhận lượng đáng kể các polyme protein có trong nguyên liệu thô đã bị thoái biến thành các peptit có trọng lượng phân tử thấp, và do đó, có thể dự đoán rằng bã đậu nành được lên men với chủng CJ24-34 của

sáng chế có thể làm tăng tiêu hóa khi sử dụng cho thức ăn chăn nuôi do hàm lượng cao của các peptit trọng lượng phân tử thấp.

Ví dụ 9: Trình tự gen 16S rARN và phân tích phả hệ của chủng đột biến *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 của sáng chế

Để định danh chủng đột biến CJ24-34 của sáng chế, trình tự gen 16S rARN của chủng đã được phân tích bằng cách sử dụng các trình tự trong bảng 10 bên dưới.

Để định danh chủng bằng trình tự gen 16S rARN, chủng đã được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', SEQ ID NO. 1) và 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3', SEQ ID NO. 2) như là đoạn mồi chung, và sau đó được tinh chế. Để xác định các trình tự, 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3', SEQ ID NO. 3), 805R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3', SEQ ID NO. 4), và 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') đã được sử dụng để phân tích các trình tự 1508 bp. Các trình tự đã được giải trình tự bằng cách sử dụng các Kit giải trình tự chu kỳ BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems Inc., Hoa Kỳ) và được phân tích bởi ABI 3730XL ADN (Applied Biosystems, 3.850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404, USA).

Bảng 10

SEQ ID NO. 1	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
SEQ ID NO. 2	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'
SEQ ID NO. 3	5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'
SEQ ID NO. 4	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
SEQ ID NO. 5	Trình tự 16S rARN của chủng <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CJ24-34

Do kết quả phân tích các trình tự của 16S rARN, đã xác nhận rằng chủng đột biến CJ24-34 của sáng chế có chứa các trình tự 16S rARN của SEQ ID NO.5. Trình tự được đính kèm theo hình vẽ. Sự giống nhau của trình tự gen được xác định bằng cách so sánh với trình tự được đăng ký từ máy chủ EzTaxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) và GenBank/EMBL/DDBJ.

Sau khi thực hiện sắp xếp thẳng hàng nhiều trình tự bằng cách sử dụng các trình tự, cây phả hệ đã được tạo bằng chương trình MEGA 6 và vị trí phân loại đã được phân

tích (như thể hiện trên Fig.5).

Theo kết quả phân tích phả hệ, chủng đột biến gen CJ24-34 của sáng chế thể hiện mối quan hệ chặt chẽ với *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* FZB42T (CP000560), là chủng tiêu chuẩn và tương đồng trình tự gen 16S rARN được xác nhận là 99,93% (1507 bp/1508 bp).

Chủng đột biến CJ24-34 theo sáng chế được đặt tên là *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* CJ24-34 và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 15 tháng 6 năm 2017, theo Hiệp ước Budapest và được chỉ định số đăng ký KCCM12038P.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế có hiệu quả tối ưu trong việc đề xuất chủng *Bacillus amyloliquefaciens* mới có hoạt tính kháng khuẩn và khả năng phân giải protein tối ưu và khả năng sản xuất chất nhầy thấp, bã đậu nành lên men hoặc protein đậu nành cố đặc lên men của các peptit trọng lượng phân tử thấp trong đó khả năng tiêu hóa thức ăn chăn nuôi được cải thiện và phương pháp điều chế của chúng. Vì vậy, sáng chế rất hữu ích để ứng dụng cho ngành công nghiệp thức ăn chăn nuôi, thực phẩm và dược phẩm.

Số đăng ký

Cơ quan lưu chủng: Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (cơ quan lưu chủng quốc tế)

Số đăng ký lưu chủng: KCCM12038P

Ngày lưu chủng: 15/06/2017

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế sản phẩm đậu nành lên men bao gồm các bước:

cấy chuyển chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (có số đăng ký lưu chủng KCCM12038P) vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc; và

thu được bã đậu nành lên men hoặc protein đậu nành cô đặc lên men được lên men bằng cách nuôi cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens*.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sản phẩm đậu nành lên men có hoạt tính kháng khuẩn chống lại ít nhất một mầm bệnh được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella typhimurium*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium damsela*, *Listonella anguillarum*, và *Edwardsiella tarda*.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó sản phẩm đậu nành lên men bao gồm tối thiểu 40% peptit trọng lượng phân tử thấp có trọng lượng phân tử từ 30 kDa trở xuống.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ từ 1 đến 3, còn bao gồm bước kiểm soát độ ẩm của bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc và xử lý nhiệt trước khi cấy chuyển chủng vào bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó độ ẩm của bã đậu nành hoặc protein đậu nành cô đặc lên men được kiểm soát trong khoảng từ 30% (v/w) đến 80% (v/w), và xử lý nhiệt được thực hiện ở 70°C đến 130°C trong 10 phút đến 30 phút.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ từ 1 đến 5, trong đó chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P) được cấy chuyển với lượng tế bào 10^5 CFU/g đến 10^9 CFU/g.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ từ 1 đến 6, trong đó nuôi cấy được thực hiện ở 20°C đến 50°C trong 8 giờ đến 72 giờ.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ từ 1 đến 7, còn bao gồm việc sấy khô và nghiền bã đậu nành lên men hoặc protein đậu nành cô đặc lên men đã thu được.

9. Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (có số đăng ký lưu chủng KCCM12038P).

10. Chế phẩm kháng khuẩn chứa chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P), môi trường nuôi cấy chủng, môi trường nuôi cấy cô đặc hoặc sản phẩm nuôi cấy sấy khô và có hoạt tính kháng khuẩn chống lại ít nhất một mầm bệnh được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella typhimurium*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio*

parahaemolyticus, *Photobacterium damsel*, *Listonella anguillarum*, và *Edwardsiella tarda*.

11. Sản phẩm đậu nành lên men chứa chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CJ24-34 (KCCM12038P) được điều chế bằng phương pháp theo điểm bất kỳ từ 1 đến 8.
12. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa sản phẩm đậu nành lên men của điểm 11.

Fig.1

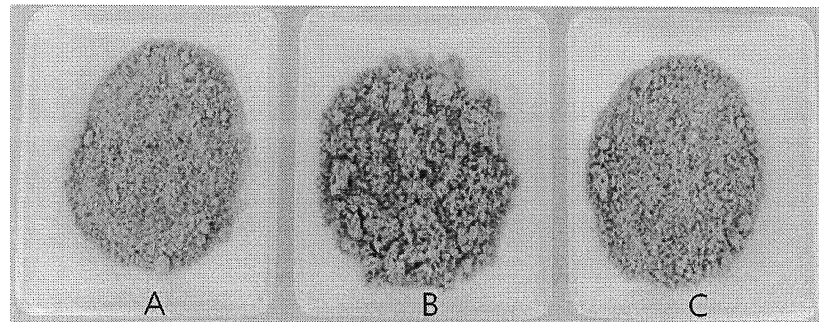


Fig.2

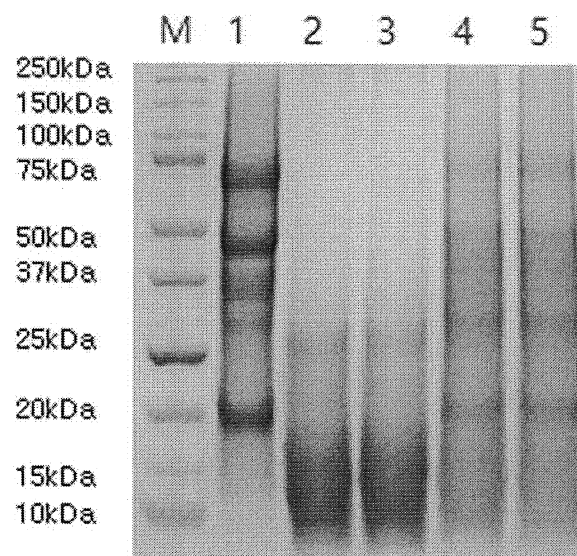


Fig.3

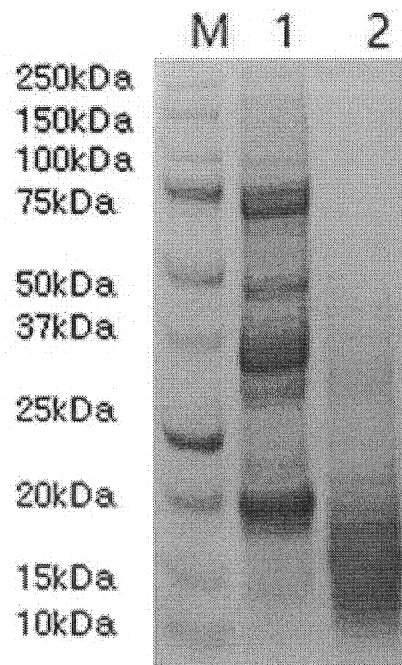


Fig.4

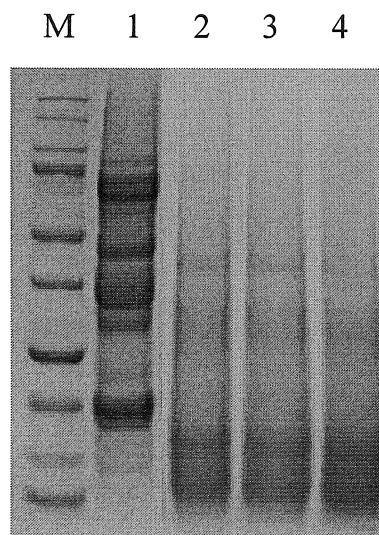
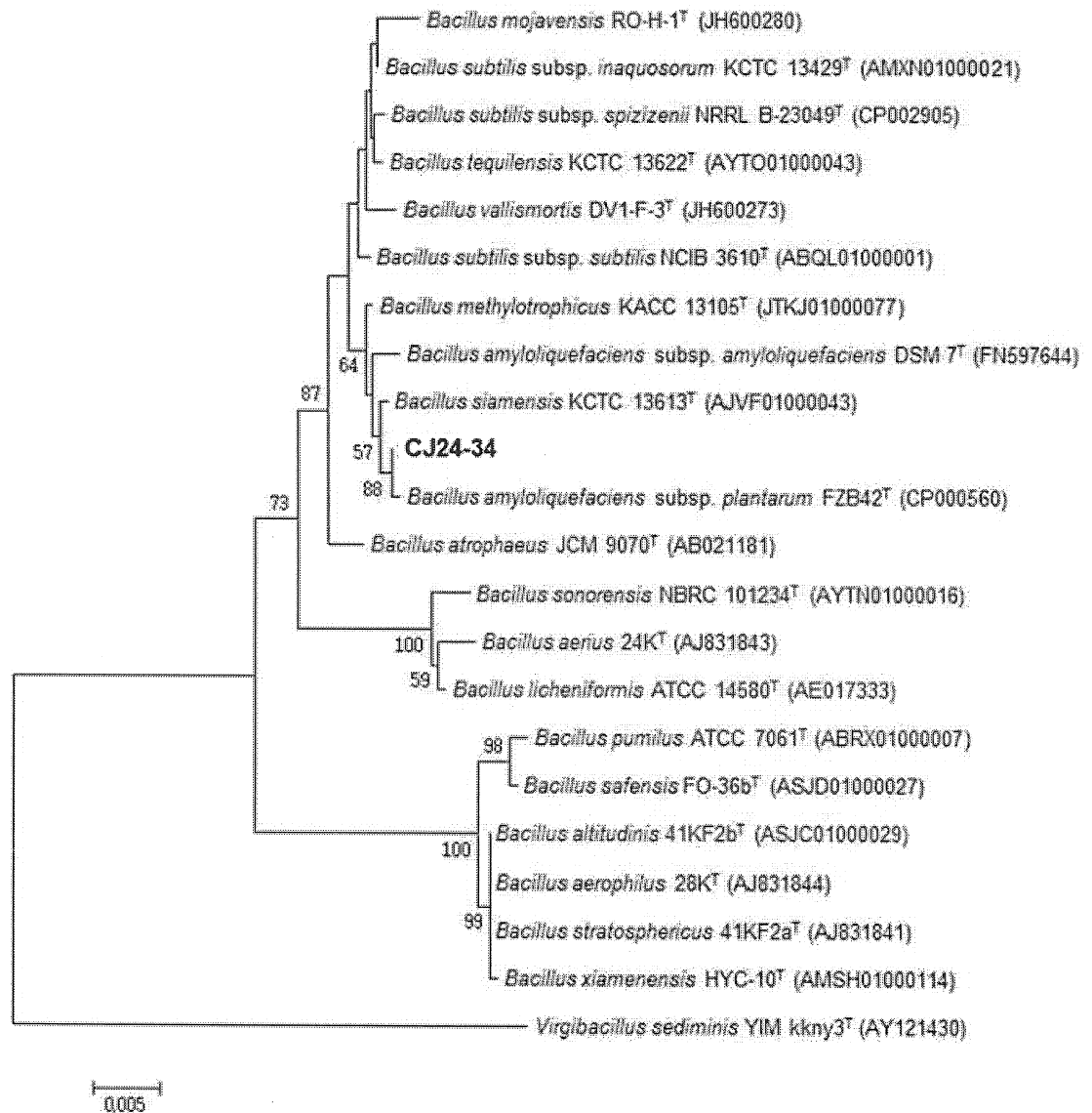


Fig.5



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> CJ Cheiljedang Corporation
- <120> PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ SẢN PHẨM ĐẬU NÀNH LÊN MEN SỬ DỤNG CHỦNG *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* VÀ SẢN PHẨM ĐẬU NÀNH LÊN MEN ĐƯỢC ĐIỀU CHẾ BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY
- <130> OPA18233
- <150> KR 10-2017-0111472
- <151> 2017-08-31
- <150> KR 10-2018-0054965
- <151> 2018-05-14
- <160> 5
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> đoạn mỗi chung cho 16S rARN để định danh-27F
- <400> 1
agagtttgat cctggctcag 20
- <210> 2
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> đoạn mỗi chung cho 16S rARN để định danh-1492R
- <400> 2
ggttaccttg ttacgactt 19
- <210> 3
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> đoạn mỗi chung cho 16S rARN để định danh-518R
- <400> 3
ccagcagccg cggtataatcg 20

<210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi chung cho 16S rARN để định danh-805R

<400> 4
 taccagggtg tctaattcc

18

<210> 5
 <211> 1508
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự 16S rARN của *Bacillus amyloliquefaciens* subsp.
 plantarum CJ24-34

<400> 5
 agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc 60
 ggacagatgg gagcttgctc cctgatgtta gcggcgagc ggtgagtaac acgtgggtaa 120
 cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat gggtgtctga 180
 accgcatggg tcagacataa aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg accgcggcgg 240
 cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag 300
 ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg 360
 gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggTTTT 420
 cggatcgtaa agctctgttg ttagggaaga acaagtgccg ttcaaataagg gcggcacctt 480
 gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag 540
 gtggcaagcg ttgtccggaa ttattgggcg taaagggctc gcaggcgggt tcttaagtct 600
 gatgtgaaag ccccgggctc aaccggggag ggtcattgga aactggggaa cttgagtgca 660
 gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaacacc 720
 agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag gagcgaaagc gtggggagcg 780
 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttaggggg 840
 tttccgcccc ttagtgctgc agctaacgca ttaagcactc cgctggggga gtacgggtcg 900
 aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttaa 960

ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc ctagagatag	1020
gacgtcccct tcgggggag agtgacaggt ggtgcatggt tgcgtcagc tcgtgtcgtg	1080
agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc agcattcagt	1140
tgggcactct aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc	1200
atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacagaaca aagggcagcg	1260
aaaccgagag gttaagccaa tcccacaaat ctgttctcag ttcggatcgc agtctgcaac	1320
tcgactgcgt gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt	1380
tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt	1440
gaggtaacct ttatggagcc agccgccgaa ggtgggacag atgattgggg tgaagtcgta	1500
acaaggta	1508