



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

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

(11)



2-0004530

(51) **C12N 1/20; C12R 1/00**
2006.01

(13) **Y**

(21) 2-2025-00404

(22) 23/02/2023

(67) 1-2023-01103

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/05/2023 422A

(73) 1. Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh (VN)
244 Điện Biên Phủ, phường Võ Thị Sáu, quận 3, thành phố Hồ Chí Minh
2. Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Hoàng Phương Hà (VN); Nguyễn Thị Minh (VN); Chu Nhật Huy (VN).

(54) **CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS VELEZENSIS BS THUẦN KHIẾT VỀ MẶT
SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SỬ DỤNG PREBIOTIC TRONG KHÔ ĐẬU NÀNH,
PHÂN HỦY CHẤT ỨC CHẾ TRIPSIN VÀ KHÁNG VI KHUẨN VIBRIO
PARAHAEMOLYTICUS GÂY BỆNH CHO TÔM**

(21) 2-2025-00404

(57) Chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS thuần khiết về mặt sinh học được phân lập trực tiếp từ môi trường nuôi tôm nước lợ ở Việt Nam có đặc tính sản sinh các enzym tiêu hóa xenlulaza, proteaza, α -amylaza; sử dụng khô đậu nành như một prebiotic, có chỉ số prebiotic Ipreb = 15,4, chỉ số hoạt động prebiotic Apreb = 0,85; có khả năng phân hủy 80 % chất ức chế tripsin trong khô đậu nành sau lên men; có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh cho tôm, trong đó chủng này mang trình tự vùng gen 16S rADN được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS thuần khiết về mặt sinh học, sử dụng prebiotic trong khô đậu nành khi lên men tạo sản phẩm dưới dạng synbiotic, phân hủy được chất ức chế tripsin trong sản phẩm synbiotic này, đồng thời có khả năng sinh enzym tiêu hóa (xenlulaza, proteaza, α -amylaza) và ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh gan tụy cấp và bệnh đường ruột trên tôm. Chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS này được phân lập từ môi trường nuôi tôm nước lợ của Việt Nam.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Ngành nuôi trồng thủy sản toàn cầu sản xuất ra hơn 45% tổng sản lượng thực phẩm thủy sản được tiêu thụ và đã trở thành một hoạt động kinh tế quan trọng ở nhiều quốc gia. Tuy nhiên, sự phát triển nhanh chóng của nuôi trồng thủy sản sẽ đi kèm với nguy cơ về bùng phát bệnh dịch. Để giải quyết vấn đề này nhiều loại hóa chất và chất kháng sinh khác nhau thường được người nông dân sử dụng một cách thiếu kiểm soát. Đây là nguyên nhân dẫn tới tồn dư kháng sinh trong thực phẩm, ảnh hưởng đến khu hệ vi sinh vật có lợi trong môi trường, gây tổn kém cho người nuôi (Miranda và cộng sự, 2018). Sản phẩm thủy sản tạo thành có chất lượng kém, không đáp ứng được chỉ tiêu an toàn cho xuất khẩu quốc tế. Do đó, hiện nay bổ sung các sản phẩm sinh học như probiotic, prebiotic (chất xơ) hoặc synbiotic vào chế độ ăn của động vật thủy sản nhằm kích thích sinh trưởng, nâng cao miễn dịch đã nhận được sự chú ý cao (Cerezuela và cộng sự, 2011). Đây là hướng đi bền vững nhằm tăng năng suất và chất lượng thủy sản, hạn chế được việc sử dụng kháng sinh và hóa chất trong sản xuất.

Synbiotic là một khái niệm mới trong nuôi trồng thủy sản, trong đó có chứa đồng thời các vi sinh vật và chất xơ. Trong sản phẩm này, lợi khuẩn đóng vai trò sản sinh các enzym tiêu hóa như xenlulaza, proteaza, α -amylaza giúp hỗ trợ tiêu hóa cho vật nuôi (Silva và cộng sự, 2012). Thành phần chất xơ trong synbiotic không được cơ thể hấp thụ nhưng nó là nguồn cơ chất cho sinh trưởng của hệ vi khuẩn có lợi ở đại trực tràng (Figuerola-González và cộng sự, 2019). Đồng thời, đối với hệ thống tiêu hóa, các nghiên cứu đã chứng minh các chất prebiotic có khả năng ức chế sự xâm chiếm của các tác nhân gây bệnh khác (Dawood và Koshio, 2016). Chính vì vậy, ứng dụng của sản phẩm synbiotic vào chế độ ăn đã cho thấy hiệu quả tích cực trong việc tăng khả năng chuyển hóa thức ăn thành các axit béo chuỗi ngắn nhờ quá trình lên men của probiotic, làm giảm pH của ruột kết do đó ức chế sự phát triển của một số vi khuẩn gây bệnh đồng thời kích thích sự phát triển của vi khuẩn có lợi (Mussatto và Mancilha, 2007).

Hiện nay, một số prebiotic có thể sử dụng trong nuôi trồng thủy sản gồm: fructo-oligosaccarit (FOS), gluco-oligosaccarit (GOS), mana-oligosaccarit (MOS),...(Okey I. B. và

cộng sự., 2018). Nhưng các hoạt chất này đều ở dạng đã được chiết suất, là sản phẩm ngoại nhập có giá thành cao. Vì vậy, khó áp dụng rộng rãi trong các mô hình nuôi tôm ngoài thực tế tại Việt Nam. Trong khi đó, khô đậu nành là phụ phẩm nông nghiệp sẵn có, rẻ tiền. Nguyên liệu này rất giàu protein (48%) và chất xơ (2,5 - 4,5%) nên có thể được sử dụng làm nguồn bổ sung dinh dưỡng trong thức ăn cho động vật thủy sản. Tuy nhiên, khô đậu nành lại chứa thành phần chất ức chế tiêu hóa điển hình như chất ức chế trypsin. Chất ức chế này gắn vào enzym trypsin và chymotrypsine làm suy yếu chức năng chuyển hóa protein, gây hiện tượng khó tiêu (Anna và cộng sự, 2021), (Adeyemo và Onilude, 2013). Do đó, lựa chọn phương thức sử dụng khô đậu nành trong thức ăn phù hợp là vấn đề cần quan tâm để có thể tận dụng được nguồn phụ phẩm nông nghiệp trong hoạt động nuôi trồng thủy sản.

Trên thế giới, một số nghiên cứu đã chứng minh các chất ức trypsin sẽ được phân hủy nhờ quá trình lên men của một số loài vi sinh vật có lợi. Quá trình lên men đậu nành này cũng có thể phân giải protein và cacbohydrat thành các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp và hòa tan trong nước, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tiêu hóa chất dinh dưỡng (Cheng và cộng sự, 2019).

Nhưng, cho đến nay chưa có nghiên cứu trong nước được tiến hành đề cập đến lợi khuẩn có khả năng sử dụng prebiotic trong khô đậu nành, cũng như tác dụng của chúng trong phân hủy chất ức chế trypsin thông qua quá trình lên men xốp. Do vậy, việc cần thiết là phân lập, chọn lọc chủng vi khuẩn probiotic bản địa có các đặc tính này. Ngoài ra, chủng vi khuẩn probiotic còn cần có khả năng sinh các enzym tiêu hóa, kháng một số vi sinh vật gây bệnh. Như vậy với đặc tính lợi khuẩn, thể hiện được rất nhiều vai trò tích cực và lợi thế như đã nêu ở trên chủng vi khuẩn probiotic phân lập được sẽ phù hợp cho việc lên men khô đậu nành sử dụng làm chế phẩm sinh học dưới dạng synbiotic để bổ sung vào thức ăn nuôi thủy sản. Từ đó, phát huy toàn giá trị dinh dưỡng có trong khô đậu nành mà không phải thông qua quá trình tách chiết nhiều công đoạn chất xơ từ khô đậu nành. Đây là điểm mới, đổi mới sáng tạo trong việc tạo chế phẩm sinh học synbiotic bổ sung vào thức ăn nuôi thủy sản tại Việt nam.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của sang chế là đề xuất giải pháp để giải quyết vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích đó, giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ môi trường nước trong đầm nuôi tôm nước lợ ở Bạc Liêu, Việt Nam. Chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1502 bp như nêu trong SEQ ID NO:1 và được đăng ký trên GenBank với mã số OK398227. Các đặc điểm sinh học nổi bật của chủng BS đáp ứng yêu cầu của giải pháp hữu ích gồm:

- Phân hủy được 80 % hàm lượng chất ức chế trypsin có trong khô đậu nành sau quá trình lên men xốp so với khô đậu nành chưa lên men;;
- Có khả năng sử dụng prebiotic Xylooligosaccharit (XOS) 1% cũng như như một cơ chất cho sinh trưởng.

- Khả năng sử dụng prebiotic trong khô đậu nành của chủng BS được chứng minh qua chỉ số prebiotic cao nhất $I_{\text{preb}} = 15,4$ khi cùng so sánh với một số lợi khuẩn khác, ngoài ra chỉ số hoạt động prebiotic trong khô đậu nành có giá trị $A_{\text{preb}} = 0,85$ đã khẳng định thêm khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn này khi sử dụng prebiotic trong khô đậu nành cao hơn nguồn cacbonhydrat đối chứng (là glucoza). Đồng thời sự phát triển của chủng vi khuẩn BS này cao hơn so với vi khuẩn gây bệnh thử nghiệm (như *E.coli*) do có chỉ số A_{preb} lớn hơn 0;

- Sinh các enzym tiêu hóa ngoại bào (α -amylaza, xenlulaza, proteaza), có khả năng tạo màng sinh học tốt làm tăng khả năng bám dính vào thành ruột và kháng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS được nuôi cấy trên môi trường MPA.

Fig. 2 thể hiện vị trí phân loại của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS. A. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân lên từ ADN tổng số của chủng *Bacillus velezensis* BS bởi cặp mồi 27f, 1527r. M: Marker 1 kb; 1-BS; 2-BSHC; 3-HU; 4-LB; B. Cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS.

Fig. 3 thể hiện khả năng kháng khuẩn của chủng *Bacillus velezensis* BS đối với chủng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus* cho tôm.

Fig. 4 thể hiện khả năng sử dụng prebiotic trong khô đậu nành của chủng *Bacillus velezensis* BS thông qua chỉ số prebiotic (I_{preb}) và điểm hoạt động $A_{\text{prebiotic}}$.

Fig. 5 thể hiện khả năng phân hủy chất ức chế tripsin trong khô đậu nành của *Bacillus velezensis* BS

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Theo giải pháp hữu ích, mẫu nước dùng để phân lập chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS và các môi trường được sử dụng như sau:

- Mẫu nước nuôi tôm ở ngày thứ 50 tại đầm nuôi tôm của tỉnh Bạc Liêu, Việt Nam. Mẫu nước được bảo quản trong chai chuyên dụng sao cho không ảnh hưởng đến chất lượng nước trong thời gian chuyển mẫu về phòng thí nghiệm. Tiến hành phân lập vi khuẩn trên môi trường MPA.

- Môi trường MPA dùng trong quá trình phân lập và kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn: NaCl (5 g/L); Cao thịt (3 g/L); Pepton (10 g/L); pH 7-7,2.

- Môi trường MRS để tiến hành so sánh. Môi trường MRS (g/L): Pepton (10), Cao thịt (10), cao nấm men (5), glucoza (20), K_2HPO_4 (2), NH_4Cl (2), CH_3COONa (5), $MgSO_4$ (0,2), Triamoni citrate (5), Tween (80-100 μ l), pH 6,5 - 7. Môi trường MPA hay MRS khử trùng ở 121°C trong 20 phút.

1. Phân lập và định danh chủng *Bacillus velezensis* BS

a) Phân lập: Từ mẫu nước, tiến hành phân lập và nuôi cấy trên môi trường MPA thạch, sau 48 giờ, các khuẩn lạc được hình thành riêng rẽ, từ đó thu được các chủng vi khuẩn thuần khiết. Quan sát khuẩn lạc cho thấy: Khuẩn lạc tròn, lồi, rìa có mép răng cưa, màu nâu nhạt, không nhân, bề mặt không nhăn, đường kính 3,5 – 4 mm (Fig.1)

Đánh giá khả năng sinh bào tử của chủng BS thông qua sốc nhiệt ở 80°C trong 15 phút, sau đó cấy trải trên môi trường nuôi MPA, kết quả sau 24 giờ chủng vi khuẩn này vẫn sinh trưởng bình thường trên đĩa thạch tức là chúng có khả năng sinh bào tử, kết quả thử nghiệm này cũng được so sánh với có đối chứng dương (sinh bào tử) là chủng *Bacillus subtilis* và đối chứng âm (không sinh bào tử) là chủng *Escherichia coli*. Khả năng sinh bào tử của chủng BS đã sơ bộ phân loại chúng thuộc chi *Bacillus*.

b) Định danh

- Định danh chủng vi khuẩn BS bằng kit sinh hóa API 50 CHB: Quá trình được tiến hành bằng cách: Cấy vi khuẩn BS trên môi trường MPA để tạo khuẩn lạc, lấy 1 - 4 khuẩn lạc đồng nhất tạo huyền phù vi khuẩn và hút vào ống chứa 10ml môi trường API 50 CHB, phủ một lớp dầu khoáng (2-3 giọt). Ủ kit ở nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của chủng vi khuẩn BS. Sau 24h và 48h lấy kit ủ ra, đọc kết quả: mỗi ống sẽ cho kết quả (+) hoặc (-) hoặc không chắc chắn (?) và ghi lại trên bảng kết quả. Kết quả tổng hợp 49 phản ứng được đối chiếu với danh sách phân loại bằng phần mềm do nhà sản xuất cung cấp cho phép xác định tên loài. Kết quả đã cho thấy chủng BS gần với loài *Bacillus velezensis*.

- Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử: tiến hành xác định gen 16S rARN theo Pukall và cộng sự (1999). Sử dụng cặp mồi 27f (xuôi) và 1527r (ngược) với trình tự 5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'; 5 - AAAGGAGGTGATCCAGCC - 3'.

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng bộ Kit AccuPrep PCR Purification, Bioneer (Fig. 2) được sử dụng làm khuôn trong phản ứng đọc trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3.100 Avant genetic Analyzer theo phương pháp của Sanger. Trình tự nucleotit của BS được xử lý bằng phần mềm ABI PRISM 3.100 Avant Data Collection v 1.0 và sử dụng phần mềm Blastn để so sánh trình tự ADN này được với trình tự các đoạn gen khác đã được công bố trong NCBI. Các trình tự gen sau đó được xử lý bằng các phần mềm Bioedit, Clusal X và Mega4 để xây dựng cây phát sinh chủng loại (Fig. 2) và được đăng ký trên NCBI với mã số OK398227. Kết quả xác định vị trí phân loại của chủng BS cho thấy nó có độ tương đồng 99,47 % với chủng *Bacillus velezensis* KKLW (mã số CP054714.1). Như vậy, dựa trên một số đặc điểm sinh học, định danh bằng kit sinh hóa API 50 CHB cũng như so sánh trình tự gen 16S rARN thì chủng BS thuộc chi *Bacillus* và được đặt tên *Bacillus velezensis* BS phân lập tại Bạc Liêu, Việt nam. Chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1502 bp như nêu trong SEQ ID NO:1.

Chủng *Bacillus velezensis* BS thuần khiết về mặt sinh học được phân lập này được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

c) Thử nghiệm khả năng sử dụng Xylooligosaccharit (XOS) 1 % như một prebiotic cho sinh trưởng. Kết quả khả năng sinh trưởng của chủng *Bacillus velezensis* BS ngang với sinh trưởng trên môi trường giàu dinh dưỡng MRS. Sau đó, thử nghiệm khả năng sinh trưởng của vi khuẩn này trên môi trường chứa khô đậu nành, kết quả vi khuẩn sinh trưởng tốt nhất trong môi trường chứa khô đậu nành 1% sau 24 giờ;

d) Thử nghiệm đánh giá chỉ số prebiotic khi vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS sử dụng prebiotic trong khô đậu nành. Kết quả chỉ số prebiotic cao nhất $I_{\text{preb}} = 15,4$ khi cùng so sánh với một số lợi khuẩn khác, ngoài ra chỉ số hoạt động prebiotic trong khô đậu nành có giá trị $A_{\text{preb}} = 0,85$ đã khẳng định thêm khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn này khi sử dụng prebiotic trong khô đậu nành cao hơn nguồn cacbonhydrat đối chứng (là glucoza) và đồng thời sự phát triển của chủng vi khuẩn này cao hơn so với chủng vi khuẩn gây bệnh thử nghiệm (như *E.coli*) do chỉ số này lớn hơn 0;

e) Thử nghiệm đánh giá khả năng phân hủy chất ức chế tripsin có trong khô đậu nành. Kết quả sau lên men với chủng *Bacillus velezensis* BS đã làm giảm được 80 % hàm lượng chất ức chế tripsin so với khô đậu nành chưa lên men; và

f) Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*. Kết quả, chủng *Bacillus velezensis* BS ức chế được sinh trưởng của chủng vi khuẩn gây bệnh này.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

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

Ví dụ 1. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn BS

1. Phân lập

Mẫu nước nuôi tôm ở ngày thứ 50 tại đầm nuôi tôm của tỉnh Bạc Liêu, Việt Nam. Mẫu nước được bảo quản trong chai chuyên dụng sao cho không ảnh hưởng đến chất lượng nước trong thời gian chuyển mẫu về phòng thí nghiệm. Mẫu sau khi được tăng sinh vi khuẩn thông qua quá trình làm giàu, tiến hành pha loãng đến các nồng độ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Vi khuẩn được phân lập bằng phương pháp cấy trải trên các đĩa petri chứa môi trường MPA aga. Các đĩa petri sau đó được ủ ở 30°C trong 2-3 ngày. Khuẩn lạc đơn được tách có hình thái đặc trưng là tròn, lồi, rìa có mép răng cưa, màu nâu nhạt, không nhân, bề mặt không nhăn, đường kính 3,5 – 4 mm (Fig.1). Tiếp tục cấy chuyển nhiều lần để thu được dòng thuần có một dạng khuẩn lạc đồng nhất. Chọn khuẩn lạc riêng lẻ của chủng *Bacillus velezensis* BS cấy vào các ống thạch nghiêng chứa môi trường thạch MPA và ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 giờ để vi sinh vật phát triển, sau đó chuyển vào tủ lạnh để bảo quản và lưu chủng cho phân định danh và sử dụng.

2. Định danh

- Bảng kit sinh hóa API 50 CHB:

Dựa vào một số đặc điểm sinh học về hình thái khuẩn lạc, khả năng sinh bào tử của chủng BS đã sơ bộ phân loại chúng thuộc chi *Bacillus* (Theo khóa phân loại của Bergey và cộng sự, 2015). Ngoài ra, chủng vi khuẩn này còn được phân loại bằng kit sinh hóa API 50 CHB. Kết quả tra cứu thể hiện Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân loại chủng vi khuẩn theo kit API 50 CHB

TT	Cơ chất	BS
1	Glyxerin	+
2	Erythritol	-
3	D- Arabinoza	-
4	L-Arabinoza	+
5	Riboza	+
6	D-Xyloza	+
7	L-Xyloza	-
8	Adonitol	-
9	β -Methyl-Xyloza	-
10	Galactoza	-
11	Glucoaz	+
12	Fructoza	+
13	Mannoza	+
14	Sorboza	-
15	Rhamnoza	-
16	Dulcitol	-
17	Inositol	+
18	Mannitol	+
19	Sorbitol	+
20	α -Methyl-D-Mannosit	-
21	α -Methyl-D-Glucosit	-
22	N-acetyl-Glucosamin	-
23	Amidaglin	+
24	Arbutin	+
25	Esculin	+
26	Salicin	+
27	Celiobioza	+
28	Maltoza	+
29	Lactoza	+
30	Melibioza	+
31	Sucroza	+
32	Trehaloza	+
33	Inulin	-
34	Melezitoza	-
35	Rafinoza	+

36	Tinh bột	-
37	Glycogen	+
38	Xylitol	-
39	Gentiobioza	-
40	Turanoza	-
41	D-Lyxzoza	-
42	D-Tagatoza	-
43	D-Fucoza	-
44	L-Fucoza	-
45	D-Arabitol	-
46	L-Arabitol	-
47	Gluconat	-
48	2 Keto-Gluconat	-
49	5 Keto-Gluconat	-

Thông qua kết quả nghiên cứu các đặc điểm hình thái kết hợp với bộ kit API 50 CHB so sánh với các đặc điểm phân loại các nhóm vi khuẩn Gr+ theo khóa phân loại của Bergey's. Kết quả tổng hợp 49 phản ứng được đối chiếu với danh sách phân loại bằng phần mềm do nhà sản xuất cung cấp cho phép xác định chủng BS gần với loài *Bacillus velezensis*.

- Bảng sinh học phân tử

Từ chủng BS phân lập được ở trên, thực hiện tách chiết ADN và thực hiện nhân gen sử dụng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) theo hướng dẫn của nhà sản xuất cặp mồi với cặp mồi 27F/1527R được thiết kế dựa vào trình tự có tính bảo thủ cao của gen 16S rARN ở sinh vật nhân sơ (Srinivasan và cộng sự., 2015).

Mồi xuôi 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' và mồi ngược 1527R: 5'-ACGGCTACCTTGTACGACT -3'.

ADN thu được từ chủng vi khuẩn được thực hiện nhân gen 16S rARN bằng phương pháp PCR. Sản phẩm PCR nhân đoạn gen 16S rARN từ ADN tổng số của chủng BS đã được kiểm tra trên gel agarosa 1%, nhuộm etidium bromit và sau đó soi bản gel dưới tia tử ngoại. Độ dài của sản phẩm PCR có kích thước đúng như lý thuyết và được thể hiện trên Fig. 2.

Sản phẩm nhân đoạn gen 16S rARN được tinh sạch bằng kit Gel Purification (hãng Bioneer, Hàn Quốc) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và kiểm tra độ tinh sạch của mẫu trên máy quang phổ khả biến ở các bước sóng 260nm và 280nm cho tỷ lệ tinh sạch là OD260/OD280 > 1,8. Từ đó, xác nhận sản phẩm PCR đã đạt độ tinh sạch như yêu cầu. Sau đó được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI, Mỹ. Sử dụng các phần mềm Bioedit, Clustal X và Mega4 để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn BS.

Trình tự gen của chủng BS có kích thước khoảng 1502 nucleotit và được đăng ký trên GenBank với mã số truy cập OK398227.

Trình tự gen của chủng BS có mức độ tương đồng 99,47 % với trình tự tương ứng của chủng *Bacillus velezensis* KKLW (CP054714). Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng BS với một số chủng vi khuẩn đã được xây dựng và kết quả được thể hiện ở Fig. 2.

Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào và so sánh trình tự gen 16S rARN thì chủng BS thuộc chi *Bacillus* và được đặt tên là *Bacillus velezensis* BS.

Chủng *Bacillus velezensis* BS thuần khiết về mặt sinh học được phân lập này được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Ví dụ 2: Đánh giá ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của chủng BS

Chủng BS được đặc biệt lưu ý cho việc sử dụng để lên men khô đậu nành và bổ sung vào thức ăn cho động vật thủy sản, nên yếu tố pH được xem là một tính chất khá quan trọng khi chúng được vào đến dạ dày có ảnh hưởng đến chức năng chuyển hóa thức ăn hay không. Đánh giá ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của chủng BS trong 24 giờ trong dịch môi trường MPA bằng cách bổ sung 1% sinh khối vi khuẩn vào môi trường nuôi có các giá trị pH khác nhau, sau đó nuôi trong tủ lắc ở 37°C trong 24 giờ. Xác định mật độ sinh khối tế bào vi khuẩn tại thời điểm 0 giờ và 24 giờ tại bước sóng 600 nm trên máy quang phổ kế, từ đó tính ΔOD .

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của chủng BS

pH	pH 2	pH 4	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
BS	0,1	0,15	2,1	2,3	2,2	1,88	0,6
(ΔOD_{600})	(+ 0,02)	(+ 0,05)	(+ 0,02)	(+ 0,03)	(+ 0,03)	(+ 0,05)	(+ 0,02)

Kết quả cho thấy, chủng BS có khả năng sinh trưởng tốt nhất tại giá trị pH 6-9, ở giá trị pH 2, 4 và 10 vẫn sinh trưởng tuy chậm hơn ở pH 6-9. Nhưng kết quả này vẫn khẳng định khả năng sinh trưởng của chúng trong dịch dạ dày khi ở pH axit hoặc pH kiềm khi gặp điều kiện bất lợi.

Ví dụ 3: Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của chủng BS

Dải nhiệt độ 5; 10; 15; 20; 25; 30; 37; 40 và 45 °C được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của chúng lên khả năng sinh trưởng của chủng BS trên môi trường MPA sau 2 ngày nuôi cấy. Mật độ sinh khối tế bào vi khuẩn được đánh giá tại thời điểm 0 giờ và 48 giờ ở bước sóng 600 nm trên máy quang phổ kế, từ đó tính ΔOD .

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của chủng BS

T°	5	10	15	20	25	30	37	40	45
	0,5	0,6	0,8	1,25	1,5	1,68	1,75	1,55	1,5
ΔOD_{600} BS	($\pm 0,01$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,03$)	($\pm 0,04$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,02$)
ĐC	0,09	0,09	0,095	0,098	0,095	0,09	0,09	0,09	0,09

Chủng BS nghiên cứu có thể sinh trưởng được ở dải nhiệt độ 5°C - 45°C, nhưng yếu nhất ở 5°C và 10°C sau 48 giờ. Khoảng nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng là 30 - 37°C, đặc biệt chúng sinh trưởng khá tốt ở 45°C. Đây chính là tính chất rất quan trọng khi sử dụng các chủng này trong nuôi trồng thủy sản tại các vùng miền có khí hậu thay đổi khác nhau.

Ví dụ 4: Đánh giá khả năng chịu mặn của chủng BS

Nồng độ NaCl từ 0, 10, 20, 30 và 40 ‰ trong môi trường MPA được sử dụng để đánh giá khả năng chịu mặn để sinh trưởng của BS. Sau 48 giờ xác định sinh khối tế bào trên máy quang phổ kế ở bước sóng 600 nm.

Bảng 4. Ảnh hưởng của NaCl đến sinh trưởng của chủng BS

Nồng độ NaCl	0 ‰	1 ‰	2 ‰	3 ‰	4 ‰
BS(ΔOD_{600})	1,5	1,68	1,56	1,55	1,3
	($\pm 0,02$)	($\pm 0,03$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,04$)

Kết quả cho thấy, nồng độ muối NaCl thay đổi từ 0-40 ‰ không ảnh hưởng nhiều đến sinh trưởng của chủng BS lựa chọn. Kết quả còn cho thấy chủng vi khuẩn này hoàn toàn có thể sử dụng trong các môi trường nuôi tôm nước ngọt, nước lợ, thậm chí nước biển (NaCl 40 ‰) mà không ảnh hưởng đến sinh trưởng của chúng.

Ví dụ 5: Đánh giá khả năng sinh các enzym tiêu hóa của chủng vi khuẩn BS

Các enzym như α -amylaza, enzym xenlulaza, enzym proteaza là những enzym hỗ trợ tiêu hóa, tăng khả năng chuyển hóa thức ăn. Để xác định chủng BS có sinh các enzym này hay không, tiến hành định tính enzym theo phương pháp bán định lượng (khuyếch tán trên đĩa thạch) (Ślizewska và cộng sự, 2021).

Nguyên liệu và Hóa chất: tinh bột tan; carboxymetyl xenlulaza (CMC); casein; đệm phosphat natri 0,1M, pH 7,0; thuốc thử Logol (5 mM I₂ trong 5 mM KI); đệm phosphat sorensen 0,1M, pH 7,6; amido đen 10B; metanol; axit axetic; đĩa thạch; Dung dịch enzym xenlulaza; enzym α - amylaza; dung dịch enzym casein.

Đĩa thạch 1% chứa cơ chất tinh bột tan 1 % pha trong đệm phosphat natri (pH = 7) 0,1M để xác định enzym α -amylaza; đĩa thạch 1% chứa cơ chất CMC 1 % pha trong đệm phosphat natri (pH = 7) 0,1M để xác định enzym xenlulaza; đĩa thạch 1% chứa cơ chất casein 0,1% pha trong đệm phosphat Sorensen 0,1M pH 7,6 hoặc đệm Britton 0,04M, chứa chất diệt khuẩn (NaN₃ 0,02 %).

Tiến hành xác định enzym α -amylaza hoặc enzym xenlulaza: đĩa thạch chứa môi trường có bổ sung các loại cơ chất khác nhau tương ứng các enzym, sau khi đục lỗ thạch tiến hành tra mẫu, trong đó giếng chứa enzym được coi là đối chứng dương, dung dịch môi trường là đối chứng âm, các giếng còn lại là dịch vi khuẩn nghiên cứu. Mỗi giếng được bổ sung 100 μ l. Sau 16 giờ nuôi tĩnh ở nhiệt độ phòng (25 °C), đổ dung dịch thuốc thử lugol sao cho ngập kín mặt đĩa thạch. Sau 1 giờ, rửa lại mẫu bằng nước cất rồi quan sát enzym α -amylaza hoặc enzym xenlulaza sẽ phân giải cơ chất tạo nên các vòng sáng màu trên nền thạch chứa cơ chất bắt màu xanh. Đường kính (D-d = mm) của vòng phân giải thể hiện hoạt độ của enzym.

Tiến hành xác định enzym proteaza: Tiến hành như xác định enzym xenlulaza và amylaza rồi để ở nhiệt độ (30- 40 °C) trong 24 giờ. Sau đó, ngừng phản ứng enzym và nhuộm màu thạch bằng dung dịch amido đen 10B 0,1 % pha trong dung dịch metanol, axit axetic, nước cất theo tỷ lệ 3:1:6, hoặc trong axit axetic 7 %. Các enzym phân giải protein (nếu có) sẽ phân giải cơ chất tạo nên các vòng sáng màu trên nền thạch chứa cơ chất bắt màu xanh nâu. Đường kính (D-d = mm) của vòng phân giải thể hiện hoạt độ của enzym.

Kết quả đánh giá như được thể hiện trong bảng 5 sau đây cho thấy chủng BS có khả năng sinh cả 3 enzym hỗ trợ tiêu hóa này.

Bảng 5. Kích thước vòng phân giải các enzyme tiêu hóa của chủng BS

Tên chủng	Kích thước vòng phân giải D-d (mm)		
	<i>proteaza</i>	<i>xenlulaza</i>	<i>α - amylaza</i>
BS	32	38	19
enzym	23	25	22

Ví dụ 6. Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của BS

Để đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm của BS, tiến hành chuẩn bị đĩa thạch chứa môi trường MPA đã được khử trùng. Dịch sinh khối vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được trang trên đĩa thạch này, sau đó tiến hành đục lỗ thạch với đường kính khoảng 8mm. Nhỏ dịch sinh khối vi khuẩn BS vào các lỗ thạch, tiến hành tương tự với lỗ đối chứng (chỉ nhỏ môi trường không chứa dịch vi khuẩn BS). Nuôi tĩnh trong 24 giờ. Kiểm tra khả năng kháng khuẩn bằng cách nhìn thấy vòng phân giải ức chế sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh trên đĩa thạch, vòng càng lớn tỷ lệ ức chế càng cao. Kết quả được thể hiện ở Fig. 3 cho thấy, vòng phân giải thể hiện khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh có kích thước 20,5 mm. Như vậy chủng BS có khả năng tiết ra hợp chất bacteriocin kháng lại *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh gan tụy và bệnh phân trắng cho tôm thẻ chân trắng.

Ví dụ 7. Đánh giá khả năng sử dụng Xylooligosaccarit (XOS) 1 % như một prebiotic cho sinh trưởng

XOS là một prebiotic được lợi khuẩn sử dụng để làm tăng khả năng chuyển hóa thức ăn cũng ức chế sự xâm chiếm của các tác nhân gây bệnh, tăng cường các đáp ứng miễn dịch đồng thời tăng cường sự hấp thu canxi và chất khoáng cho động vật. Để đánh giá khả năng sử dụng prebiotic của các chủng BS, sự sinh trưởng của chủng BS được nuôi trong 2 loại môi trường: i) môi trường cơ bản (g/L): K_2HPO_4 (2), NH_4Cl (2), $MgSO_4$ (0,2), Tween (80-100 μ l), prebiotic-XOS (1%); và môi trường MRS (được sử dụng như đối chứng dương của thí nghiệm) để so sánh. Kết quả thể hiện ở Fig. 4 cho thấy, vi khuẩn có khả năng phát triển tốt khi môi trường chỉ được bổ sung một nguồn cơ chất duy nhất là XOS 1% sau 24 giờ nuôi, giá trị ΔOD_{600} thể hiện cho sự tăng sinh của BS đạt 1,03, còn khi sử dụng môi trường MRS thì ΔOD_{600} là 1,34. Điều này cho

thấy, khi chủng BS chỉ nuôi trên môi trường nghèo và sử dụng XOS 1% mà sinh trưởng thấp hơn không đáng kể so với khi nuôi trên môi trường giàu dinh dưỡng chứa các thành phần như cao nấm men, pepton, cao thịt,... Đối với môi trường cơ bản chỉ chứa các muối khoáng giúp cung cấp các chất vi lượng và ổn định pH môi trường nuôi, khi bổ sung XOS (1%) - được coi là thành phần dinh dưỡng duy nhất trong môi trường. Do đó, sự tăng của giá trị OD sinh trưởng sau 24 giờ là minh chứng cho khả năng sử dụng prebiotic của chủng BS.

Bảng 6. Khả năng sử dụng Xylooligosaccarit 1 % của chủng BS

	MT cơ bản + XOS (1%)	MRS
BS	1,037	1,348

Ví dụ 8. Đánh giá khả năng sử dụng prebiotic trong khô đậu nành của chủng BS

Trong khô đậu nành chứa khoảng 4,5 % chất xơ, chất sơ này được coi như một prebiotic để làm tăng thêm khả năng sinh trưởng của vi khuẩn bên cạnh nguồn dinh dưỡng có trong khô đậu nành. Qua thí nghiệm kiểm tra đã cho thấy với hàm lượng khô đậu nành 1% sẽ phù hợp cho vi khuẩn. Để đánh giá chính xác khả năng sử dụng khô đậu nành như một prebiotic thì chúng được thử nghiệm thông qua chỉ số prebiotic (P_{preb}). Cụ thể, tiến hành nuôi vi khuẩn BS, thu sinh khối rửa và hòa tan lại bằng nước cất khử trùng trước khi được chuyển riêng rẽ vào môi trường MT1 (môi trường cơ bản + Glucose 1%) và MT2 (môi trường cơ bản + Khô đậu nành 1%) với tỷ lệ 10% và nuôi lắc ở 35°C. Khả năng sinh trưởng của BS sau 24 giờ nuôi được xác định mật độ tế bào theo phương pháp của Nguyễn Lâm Dũng (1981) (*Một Số Phương Pháp Nghiên Cứu Vi Sinh Vật Học*). Chỉ số prebiotic được tính toán theo công thức:

$$I_{\text{preb}} = \frac{\text{Giá trị mật độ } \frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \text{ của probiotic trong MT2}}{\text{Giá trị mật độ } \frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \text{ của probiotic trong MT1}}$$

Theo Palframan và cộng sự (2003), chỉ số prebiotic lớn hơn 1 cho thấy nguồn prebiotic sử dụng có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của probiotic. Trái lại, chỉ số prebiotic có giá trị tương đương 1 thể hiện nguồn prebiotic nghiên cứu không có tác động rõ rệt đến sinh trưởng của probiotic (Palframan và cộng sự., 2003).

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy, chỉ số prebiotic của đậu nành được thể hiện ở Fig. 4, chủng BS đạt giá trị I_{preb} cao nhất là 15,40 khi so sánh với các lợi khuẩn khác ký hiệu: LB, HM và BSHC đạt giá trị I_{preb} tương ứng 4,00; 3,68 và 2,15. Như vậy, dựa trên kết quả thí nghiệm có thể kết luận rằng khô đậu nành có tác dụng kích thích tốt đến sinh trưởng của các chủng probiotic đặc biệt đối với chủng vi khuẩn BS.

Ví dụ 8. Đánh giá điểm hoạt động của BS khi sử dụng prebiotic trong khô đậu nành để sinh trưởng

Điểm hoạt động Prebiotic A của BS được xác định theo phương trình:

$$A_{\text{preb}} = \frac{(\text{Log} P_{24} - \text{Log} P_0)_{\text{MT2}}}{(\text{Log} P_{24} - \text{Log} P_0)_{\text{MT1}}} - \frac{(\text{Log} E_{24} - \text{Log} E_0)_{\text{MT2}}}{(\text{Log} E_{24} - \text{Log} E_0)_{\text{MT1}}}$$

Trong đó $\text{Log } P_{24}$ và $\text{Log } P_0$ là sự phát triển của vi khuẩn BS ở 0 và 24 giờ (CFU/ml) khi nuôi trên môi trường MT1 (môi trường cơ bản + khô đậu nành 1% được coi như một prebiotic) và MT2 (môi trường cơ bản + nguồn glucoza để so sánh). $\text{Log } E_{24}$ và $\text{Log } E_0$ là sự phát triển của vi khuẩn *E.coli* ở 0 và 24 giờ khi nuôi trên môi trường MT1 và MT2

Theo định nghĩa, prebiotic (có trong khô đậu nành) có điểm hoạt động prebiotic (A_{preb}) cao sẽ hỗ trợ sự phát triển tốt của vi khuẩn probiotic. Kết quả chỉ ra ở Fig. 4, chủng BS có chỉ số hoạt động A_{preb} cao nhất khi so sánh với một số chủng lợi khuẩn khác là LB, HM và BSHC. Chỉ số hoạt động của BS đạt 0,85, trong khi các chủng lợi khuẩn LB, HM và BSHC đạt 0,74, 0,64 và 0,57 tương ứng. Chỉ số hoạt động có giá trị dương thì sự sinh trưởng của probiotic thử nghiệm trên môi trường chứa prebiotic là cao hơn so với nguồn carbohydrate đối chứng (glucoza) và đồng thời với đó, sự phát triển của probiotic cao hơn so với vi khuẩn gây bệnh thử nghiệm (*E.coli*) (Huebner và cộng sự, 2007).

Ví dụ 9. Đánh giá khả năng phân hủy chất ức chế tripsin trong khô đậu nành của BS (Liu, 2019)

Để tiến hành đánh giá khả năng phân hủy chất ức chế tripsin có trong khô đậu nành, tiến hành nhân sinh khối chủng BS, khi mật độ đạt tới 10^8 /CFU/ml tiến hành lên men xộp khô đậu nành đã được khử trùng. Xác định chất ức chế tripsin có trong khô đậu nành trước và sau lên men. Phân tích chất ức chế tripsin theo phương pháp của tác giả Lui và cộng sự (2019), cụ thể:

Chuẩn bị các dung dịch: Dung dịch đệm (Tris 50 mM, pH 8,2, 20 mM CaCl_2) được ủ ở 37°C trước khi sử dụng. Hòa tan cơ chất BAPA đạt nồng độ 40 mg/mL trong dung dịch đệm này; Dung dịch HCl (1mM HCl, 5 mM CaCl_2). Pha dung dịch gốc tripsin (0,2 mg/mL): hòa tan 10 mg của tripsin trong 50 mL dung dịch HCl, pH khoảng 2,5, dung dịch này được giữ ở 5°C ; Dung dịch tripsin dung cho phản ứng (20 $\mu\text{g/mL}$): pha loãng 2,5 mL gốc tripsin dung dịch thành 25 mL bằng dung dịch HCl; Dung dịch axit axetic (30% v/v)

Tiến hành: Cân 0,2 g sản phẩm đã lên men cho vào 10 ml dung dịch đệm phosphat 0,1M. Hỗn hợp được ủ tại 25°C trong 1 giờ bằng máy lắc ổn nhiệt, sau đó tiến hành ly tâm dịch ở 5000 vòng/phút trong 5 phút.

Các hóa chất được bổ sung vào ống thí nghiệm và ống đối chứng chi tiết như trong Bảng 7. Toàn bộ thí nghiệm được diễn ra trong bể ổn nhiệt 37°C . Chính xác 10 phút sau khi dung dịch tripsin được bổ sung, phản ứng được dừng lại bằng cách cho thêm 1 ml axit axetic 30% vào các ống nghiệm.

Bảng. 7. Thành phần hóa chất sử dụng để xác định đơn vị chất ức chế tripsin trong khô đậu nành

Hóa chất	Thể tích bổ sung (mL)
----------	-----------------------

	Ống thí nghiệm	Ống đối chứng
Dịch chiết từ sản phẩm lên men	2	0
Nước cất	0	2
Dịch cơ chất BAPA	5	5
Dịch enzyme tripsin	2	2
Acid acetic 30%	1	1

Cơ chế xác định đơn vị chất ức chế tripsin trong mẫu: Thí nghiệm được tiến hành song song trên hai ống nghiệm (ống thí nghiệm chứa mẫu cần kiểm tra và ống đối chứng). Trong ống đối chứng, dịch chiết từ khô đậu nành chứa chất ức chế tripsin được thay thế tương ứng bằng thể tích nước cất. Do vậy, trong ống này không chứa chất ức chế tripsin, từ đó tạo điều kiện cho phản ứng phân giải cơ chất BAPA của enzyme tripsin được diễn ra và sự giải phóng của P-nitroanilin tạo thành sau phản ứng được đo ở bước sóng 410nm. Ngược lại, trong ống thí nghiệm chứa mẫu dịch, sự tồn tại của chất ức chế tripsin sẽ cản trở phản ứng phân giải BAPA diễn ra.

Một đơn vị hoạt độ tripsin được định nghĩa là: lượng enzyme cần thiết để tăng độ hấp thụ ở bước sóng 410 nm lên 0,01 đơn vị tại điều kiện phản ứng (là hiệu số của A410 của mẫu thử nghiệm chứa dịch chiết và A410 của mẫu đối chứng). Dựa trên định nghĩa này, giá trị đơn vị chất ức chế tripsin (TUI) được xác định theo công thức dưới đây.

$$\text{TUI/mg (chế phẩm)} = \frac{\{A_{410} (\text{ống đối chứng}) - A_{410} (\text{ống nghiệm chứa mẫu chiết})\} \times 100 \times \text{thể tích dịch chiết sử dụng}}{\text{mg mẫu chế phẩm có chứa trong 1 mL dịch chiết}}$$

Kết quả đánh giá khả năng phân giải chất ức chế tripsin được thể hiện ở Fig. 5. BS có khả năng làm giảm tới 80 % hàm lượng chất ức chế tripsin có trong khô đậu nành, dựa theo giá trị đơn vị chất ức chế TUI lúc đầu khi chưa lên men là 41,12, nhưng sau lên men chỉ số này chỉ còn 8,39.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS ngoài các đặc tính lợi khuẩn như sản sinh các enzyme tiêu hóa thì nó còn có đặc tính: sử dụng khô đậu nành như một prebiotic để đồng hóa hoặc sản xuất các axit béo chuỗi ngắn để phân hủy trong khô đậu nành. Chỉ số prebiotic cao nhất $I_{\text{preb}} = 15,4$ khi cùng so sánh với một số lợi khuẩn khác, chỉ số hoạt động prebiotic trong khô đậu nành có giá trị $A_{\text{preb}} = 0,85$; có khả năng phân hủy 80 % hàm lượng chất ức chế tripsin trong khô đậu nành sau lên men tạo sản phẩm bổ dưỡng dưới dạng synbiotic bổ sung vào thức ăn nuôi trồng thủy sản làm tăng cường lợi khuẩn đường ruột và hàm lượng protein; nó còn có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh gan tụy cấp và bệnh đường ruột trên tôm. Như vậy, chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS có giá trị và vai trò đặc biệt quan trọng để tạo chế phẩm synbiotic bổ sung vào thức ăn nuôi trồng thủy sản, gia súc, gia cầm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* BS thuần khiết về mặt sinh học được phân lập trực tiếp từ môi trường nuôi tôm nước lợ ở Việt Nam có đặc tính sản sinh các enzym tiêu hóa xenlulaza, proteaza và α -amylaza; sử dụng khô đậu nành như một prebiotic, có chỉ số prebiotic Ipreb = 15,4, chỉ số hoạt động prebiotic Apreb = 0,85; có khả năng phân hủy 80 % hàm lượng chất ức chế tripsin trong khô đậu nành sau lên men; có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh cho tôm, trong đó chủng này mang trình tự vùng gen 16S rADN được nêu trong SEQ ID NO: 1.

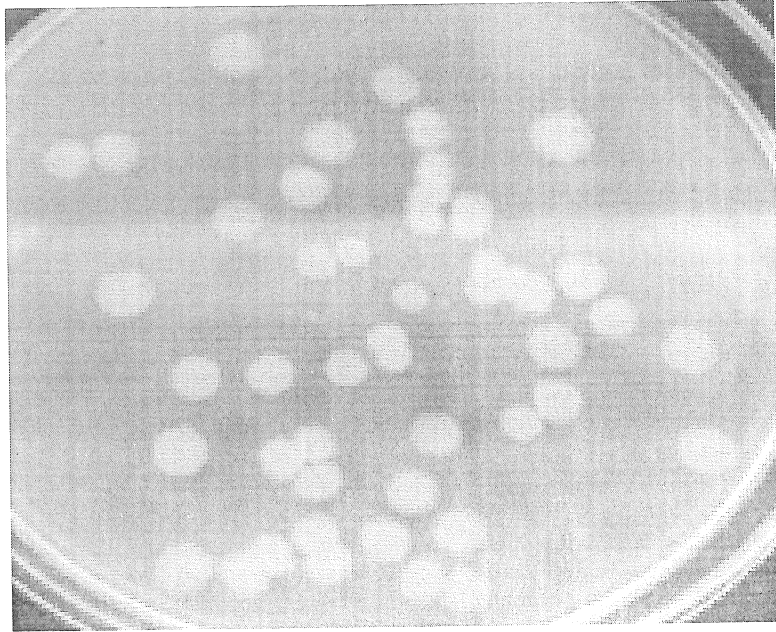


Fig. 1.

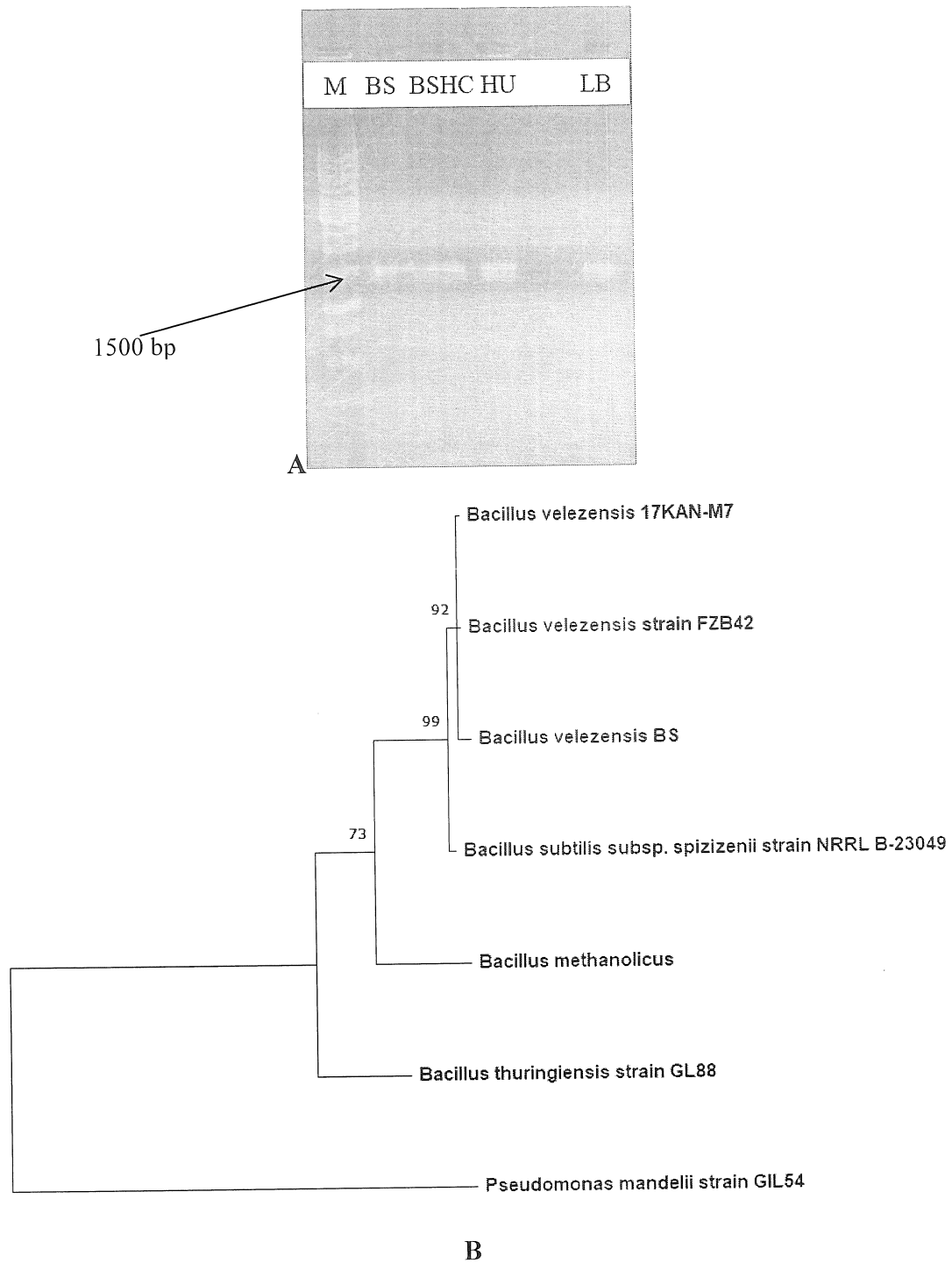


Fig. 2.

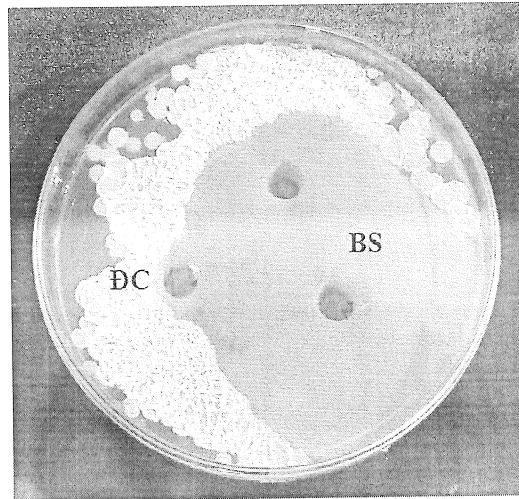


Fig. 3

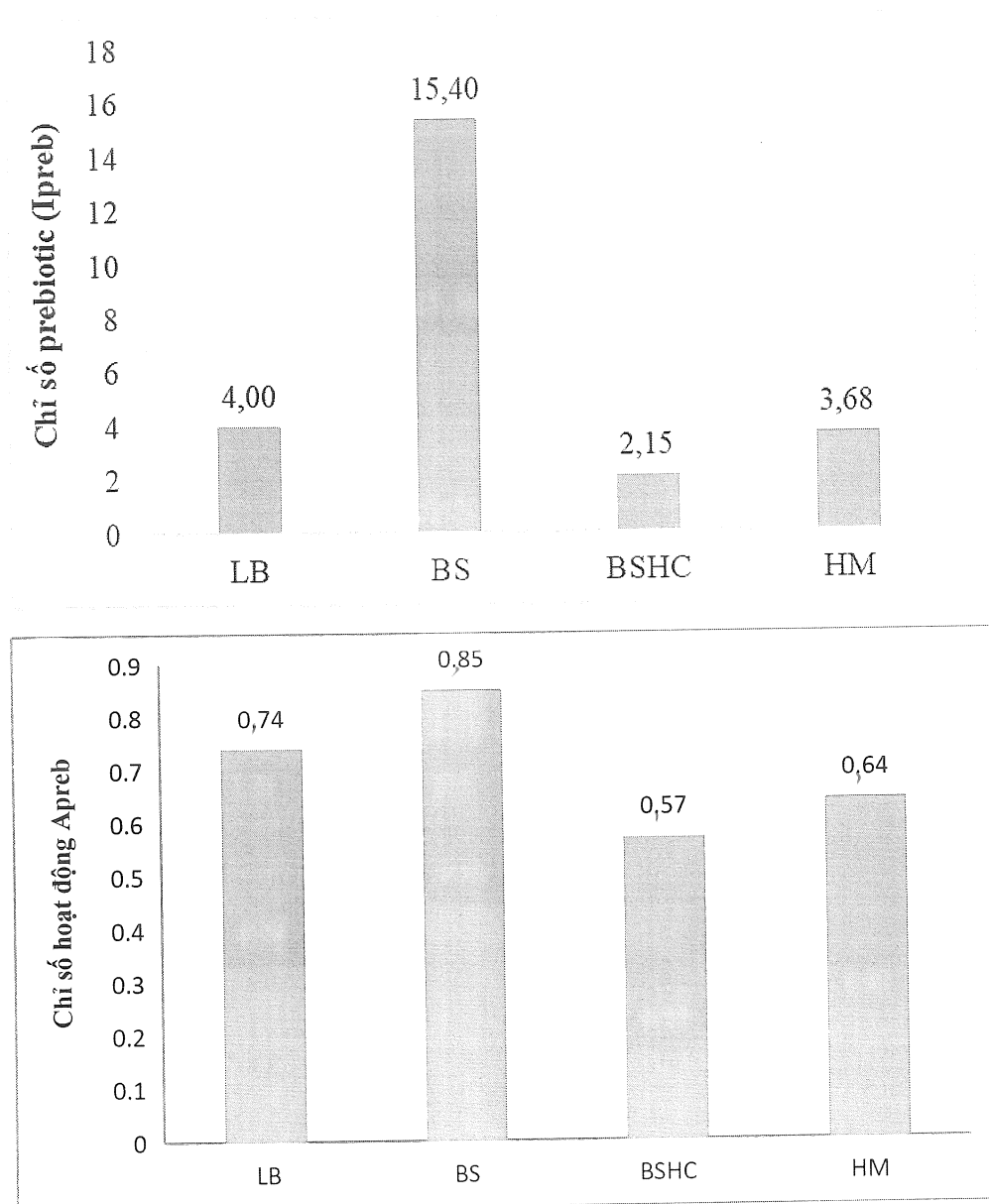


Fig. 4

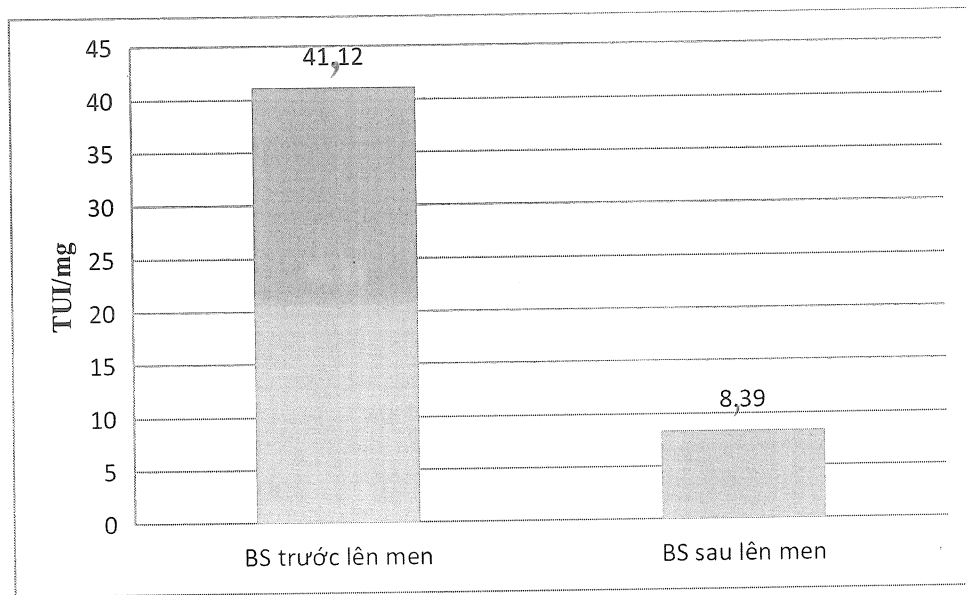


Fig. 5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (Việt Nam)

<120> CHỦNG VI KHUẨN BACILLUS VELEZENSIS BS CÓ KHẢ NĂNG SỬ DỤNG PREBIOTIC TRONG KHÔ ĐẬU NÀNH, PHÂN HỦY CHẤT ỨC CHẾ TRIPSIN VÀ KHÁNG VI KHUẨN VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS GÂY BỆNH CHO TÔM

<160> 1

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 1502

<212> ADN

<213> *Bacillus velezensis* BS

<400>

```

1  AGTTTGATCA  TGCCTCAGGA  CGAACGCTGG  CGGCGTGCCT  AATACATGCA  GTCGAGCGGA
61  CAGATCGGAG  CTTGCTCCCA  GATGTTAGCG  GCGGACGGGT  GAGTAACACG  TGGGTAACCT
121 GCCTGTAAGA  CTGGGATAAC  TCCCGGAAAC  CGGGGCTAAT  ACCGGATGGT  TGTCTGAACC
181 GCATGGTTCA  GACATAAAAG  GAGGCTTCGG  CTACCACTTA  CAGATGGACC  CGCGGCGCAT
241 TAGCTAGTTG  GTGAGGTAAC  GGCTCACCAA  GGCGACGATG  CGTAGCCGAC  CTGAGAGGGT
301 GATCGGCCAC  ACTGGGACTG  AGACACGGCC  CAGACTCCTA  CGGGAGGCAG  CAGTAGGGAA
361 TCTTCCGCAA  TGGACGAAAG  TCTGACGGAG  CAACGCCGCG  TGAGTGATGA  AGGTTTTTCGG
421 ATCGTAAAGC  TCTGTTGTTA  GGAAGAACA  AGTGCCGTTC  AAATAGGSG  GCACCTTGAC
481 GGTACCTAAC  CAGAAAGCCA  CGGCTAACTA  CGTGCCAGCA  GCCGCGGTAA  TACGTAGGTG
541 GCAAGCGTTG  TCCGGAATTA  TTGGGCGTAA  AGGGCTCGCA  GGCGGTTTCT  TAAGTCTGAT
601 GTGAAAGCCC  CCGGCTCAAC  CGGGGAGGGT  CATTGGAAAC  TGGGGAACCT  GAGTGCAGAA
661 GAGGAGAGTG  GAATTCCACG  TGTAGCGGTG  AAATGCGTAG  AGATGTGGAG  GAACACCAGT
721 GGCGAAGGCG  ACTCTCTGGT  CTGTAAGTGA  CGKTGAGGAG  CGAAAGCGTG  GGGAGCGAAC
781 AGGATTAGAT  ACCCTGGTAG  TCCACGCCGT  AAACGATGAG  TGCTAAGTGT  TAGGGGGTTT
841 CCGCCCCTTA  GTGCTGCAGC  TAACGCATTA  AGCACTCCGC  CTGGGGAGTA  CGGTCGCAAG
901 ACTGAACTC  AAAGGAATTG  ACGGGGGCCC  GCACAAGCGG  TGGAGCATGT  GGTTTAATTC
961 GAAGCAACGC  GAAGAACCTT  ACCAGGTCTT  GACATCCTCT  GACAATCCTA  GAGATAGGAC
1021 GTCCCCTTCG  GGGGCAGAGT  GACAGGTGGT  GCATGGTTGT  CGTCAGCTCG  TGTCGTCAGA
1081 TGTTGGGTTA  AGTCCCGCAA  CGAGCGCAAC  CCTTGATCTT  AGTTGCCAGC  ATTCAGTTGG
1141 GCACTCTAAG  GTGACAGCCG  GTGTCAAACC  GGAGGAAGGT  GGGGATGACG  TCAAAATCATC
1201 ATGCCCCTTA  TGACCTGGGC  TACAGACGTG  CTACAATGGA  CAGAACAAAG  GGCAGCGAAA
1261 CCGCGAGGTT  AAGCCAATCC  CACAAATCTG  TTCTCAGTTC  GGATCGCAGT  CTGCAACTCG
1321 ACTGCGTGAA  GCTGGAATCG  CTAGTAATCG  CGGATCAGCA  TGCCGCGGTG  AATACGTTCC
1381 CGGGCCTTGT  GCACACCGCC  CGTCACACCA  CAAGAGTTTG  TAACACCCGA  CGTCGGTCAG
1441 GTAACCTTTT  AGGAGCCAGC  CGCCGAAGGT  GGGACAGATG  ATTGGGGTGA  AGTCGTAACA
1501 AA

```