



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

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

(11)



1-0025097

(51)<sup>7</sup> C12N 1/20; A23L 19/20; C12R 1/01;  
A23L 29/00; A23L 11/00; A23L 2/52

(13) B

(21) 1-2017-05364

(22) 14/07/2017

(86) PCT/KR2017/007615 14/07/2017

(87) WO2018/012941A2 18/01/2018

(30) 10-2016-0090284 15/07/2016 KR

(45) 25/08/2020 389

(43) 26/03/2018 360A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

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

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHỦNG LEUCONOSTOC MESENTEROIDES CJLM119 TẠO RA LƯỢNG KHÍ GIẢM, CHẾ PHẨM KHỞI ĐỘNG LÊN MEN CHỨA CHỦNG NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP CHẾ BIẾN KIM CHI BẰNG CÁCH SỬ DỤNG CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) tạo lượng khí giảm, chế phẩm khởi động lên men chứa chủng này và phương pháp chế biến kim chi bằng cách sử dụng chủng này.

**Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

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

**Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

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

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

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

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

Các tài liệu liên quan đến giải pháp kỹ thuật đã biết

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: KR 10-1999-0078725 A (05/11/1999);

Tài liệu sáng chế 2: KR 20-2013-0002058 A (02/04/2013).

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

#### Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là cung cấp chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) tạo ra lượng khí giảm.

Mục đích khác của sáng chế là cung cấp chế phẩm khởi động lên men chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119.

Mục đích khác nữa của sáng chế là cung cấp kim chi chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 hoặc chế phẩm khởi động lên men theo sáng chế.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là cung cấp phương pháp chế biến kim chi, bao gồm bước cho chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 hoặc chế phẩm khởi động lên men theo sáng chế tiếp xúc với nguyên liệu cần lên men.

#### Giải pháp kỹ thuật

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

Để đạt được các mục đích của sáng chế, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) tạo lượng khí giảm.

Theo các phương án khác của sáng chế, chủng theo sáng chế có thể là chủng tạo lượng axit giảm. Cụ thể, axit theo sáng chế có thể là axit lactic. Do đó, khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng chủng theo sáng chế, chất lượng vị giác của kim chi có thể được duy trì bằng cách ngăn chặn sự gia tăng vị chua so với khi kim chi được chế biến bằng các chủng *Leuconostoc mesenteroides* khác.

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

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, chủng theo sáng chế thể hiện kết quả

âm tính trong các thử nghiệm hóa lỏng gelatin, tạo ra chất chuyển hóa có độc tính (ví dụ, amoniac), tạo ra phenylalanin deaminaza, và tiêu huyết, cho thấy rằng chủng này an toàn khi được ứng dụng trong thực phẩm (xem ví dụ 5).

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

Chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 theo sáng chế có thể bao gồm mảnh thành tế bào, tế bào sống hoặc tế bào đã làm khô của chủng này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm khởi động lên men chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) hoặc sản phẩm nuôi cấy chủng này.

Chế phẩm khởi động lên men theo sáng chế có thể chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) theo sáng chế với nồng độ  $10^7$  cfu/ml hoặc cao hơn, cụ thể là,  $10^7$  cfu/ml đến  $10^{13}$  cfu/ml, hoặc  $10^9$  cfu/ml đến  $10^{12}$  cfu/ml.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “sản phẩm nuôi cấy” nghĩa là vật liệu thu được từ việc nuôi cấy chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) theo sáng chế sau khi cấy vào môi trường. Cụ thể, sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế có thể bao gồm bản thân sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy chủng theo sáng chế (tức là, sản phẩm nuôi cấy có thể bao gồm chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) theo sáng chế, môi trường hoặc sản phẩm chuyển hóa của chủng này), dịch lọc (ví dụ, dịch nổi sau ly tâm) thu được bằng cách lọc hoặc ly tâm để loại bỏ chủng này, hoặc tương tự. Ngoài ra, sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế có thể bao gồm sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách làm khô (ví dụ, đông khô) và nghiền bột sản phẩm nuôi cấy.

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

Môi trường được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn và có thể là môi trường bất kỳ đã biết dùng cho vi khuẩn axit lactic. Cụ thể, môi trường được dùng theo sáng chế có thể bao gồm nguồn cacbon và nguồn nitơ. Cụ thể hơn, nguồn cacbon có thể là một hoặc nhiều nguồn được chọn từ nhóm bao gồm sacaroza, glucoza và fructoza, và nguồn nitơ có thể là một hoặc nhiều nguồn được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết nấm men, pepton, chất chiết thịt bò, chất chiết mầm đại mạch, dịch chiết ngô, amoni xitrat, amoni sulfat, amoni clorua,

amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat. Môi trường được sử dụng theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều môi trường được chọn từ nhóm bao gồm Tween 80, natri xitrat, kali phosphat, natri axetat, mangan sulfat, magie sulfat và nước cất.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "tác nhân khởi động lên men" nghĩa là tác nhân được đưa một cách không tự nhiên lên nguyên liệu cần lên men để hỗ trợ việc khởi đầu lên men.

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

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

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

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kim chi chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) theo sáng chế hoặc chế phẩm khởi động lên men theo sáng chế.

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

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

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến kim chi, bao gồm bước cho chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) theo sáng chế hoặc chế phẩm khởi động lên men theo sáng chế tiếp xúc với nguyên liệu cần lên men.

Theo các phương án khác của sáng chế, chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) theo sáng chế hoặc chế phẩm khởi động lên men theo sáng chế có thể được cho tiếp xúc với nguyên liệu cần lên men với lượng từ 0,01 đến 3% khối lượng, 0,1 đến 3% khối lượng, 0,5 đến 3% khối lượng, hoặc 0,5% khối lượng đến 2% khối lượng, dựa trên tổng khối lượng của nguyên liệu cần lên men.

Ngoài ra, việc tiếp xúc theo sáng chế có thể được thực hiện ở nhiệt độ từ 3 đến 10°C hoặc từ 5 đến 10°C trong 1 đến 90 ngày, 10 đến 90 ngày, 10 đến 60 ngày, 20 đến 60 ngày, hoặc 20 đến 40 ngày.

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

Hiệu quả của sáng chế

Chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) theo sáng chế tạo ra lượng khí giảm. Do đó, khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng chủng này hoặc sản phẩm nuôi cấy chủng này làm men, sự tạo khí trong quá trình phân phối kim chi có thể giảm, và do đó các vấn đề như hư hỏng bao bì do khí sinh ra có thể được ngăn chặn, nhờ đó làm ổn định chất lượng kim chi khi phân phối. Hơn nữa, chủng theo sáng chế tạo ra lượng axit giảm, và do đó duy trì độ axit không đổi. Ngoài ra, chủng theo sáng chế có khả năng tạo manitol tuyệt vời, và do đó hữu hiệu trong việc cải thiện chất lượng vị giác của kim chi.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

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

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

#### 1-1) Phân lập và nhận dạng chủng

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

#### 1-2) Chọn chủng tạo lượng khí giảm

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

#### 1-3) Chọn chủng tạo lượng axit giảm

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

#### 1-4) Chọn chủng tạo lượng manitol tăng

Mỗi khuẩn lạc của chủng đã chọn trong ví dụ 1-3 trên đây được cấy vào 10ml môi trường tối thiểu (10g bacto pepton, 20g fructoza, 1g Tween 80, 2g amoni xitrat, 2g kali phosphat dibazơ, 5g natri axetat, 0,1g mangan sulfat, 0,05g magie sulfat, và 1L nước cất) chứa 2% fructoza, và nuôi cấy tĩnh ở 25°C trong 24 giờ, sau đó đo lượng manitol được tạo ra.

Lượng manitol được tạo ra được xác định bằng phương pháp HPLC, và chủng thể hiện mức độ sản sinh manitol 16.000mg/L hoặc cao hơn được chọn.

#### 1-5) Nhận dạng chủng đã chọn

Chủng đã chọn trong ví dụ 1-4 trên đây được đặt tên là “CJLM119”, và trình tự nucleotit của rARN 16S của chủng này (SEQ ID NO: 1) được phân tích. Kết quả là, có thể thấy rằng trình tự nucleotit của rARN 16S của chủng CJLM119 tương đồng 99% với trình tự nucleotit của rARN 16S của *Leuconostoc mesenteroides* NRIC 1517 (SEQ ID NO: 2). Theo đó, chủng CJLM119 được đặt tên là "*Leuconostoc mesenteroides* CJLM119", và lưu trữ trong Korean Collection for Type Cultures tại Korea Research Institute of Bioscience và Biotechnology vào ngày 10/06/2016 với số truy cập KCTC 13043BP.

#### Ví dụ 2: So sánh mức tạo khí

Để so sánh mức độ tạo khí bởi *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 được chọn trong ví dụ 1 với các chủng khác trong số các chủng *Leuconostoc mesenteroides*, các chủng *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3100 và KCTC3722, là các chủng *Leuconostoc mesenteroides* chuẩn được sử dụng làm chủng đối chứng để xác định mức độ tạo khí. Mỗi chủng được cấy vào 10ml môi trường lỏng MRS trong ống nghiệm chứa ống Durham dài 30mm, và được nuôi cấy ở 25°C trong 24 giờ, sau đó chiều cao cột khí được bẫy trong ống Durham được đo và mức độ tạo khí được so sánh. Mức độ tạo khí được đánh giá theo các tiêu chuẩn sau: “-” = không tạo khí; “+” = chiều cao cột khí bẫy trong ống Durham là từ 1 đến 5mm; “++” = chiều cao cột khí từ 6 đến 10mm; “+++” = chiều cao cột khí từ 11 đến 15mm; “++++” = chiều cao cột khí từ 16 đến 25mm; và “+++++” = chiều cao cột khí trên 25mm.

Kết quả là, thử nghiệm đã cho thấy rằng mức độ tạo khí của *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 là “++”, thấp hơn đáng kể so với mức độ tạo khí của các chủng đối chứng (“++++” hoặc “+++”) (bảng 1).

Bảng 1

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CJLM119	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3722
Mức độ tạo khí	++	++++	+++



## Ví dụ 3: So sánh mức tạo axit

Mức độ tạo axit bởi *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 được chọn trong ví dụ 1 được so sánh với mức độ tạo axit của *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3100 và KCTC3722, là các chủng đối chứng. Mỗi chủng được cấy vào 10ml môi trường lỏng MRS. Để xác định mức độ tạo axit, mỗi chủng được nuôi cấy tĩnh ở 25°C trong 24 giờ, và sau đó đo độ pH bằng cách sử dụng máy đo pH (SevenCompact/Ion S220, Mettler Toledo).

Kết quả là, thử nghiệm đã cho thấy rằng mức độ tạo axit của *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 là thấp hơn đáng kể so với mức độ tạo axit của các chủng đối chứng (bảng 2).

Bảng 2

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CJLM119	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3722
pH	4,44	4,33	4,37

## Ví dụ 4: So sánh mức tạo manitol

Mức độ tạo manitol bởi *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 được chọn trong ví dụ 1 được so sánh với mức độ tạo manitol của *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3100 và KCTC3722 là các chủng đối chứng. Mỗi chủng được cấy vào 10ml môi trường tối thiểu (10g bacto pepton, 20g fructoza, 1g Tween 80, 2g amoni xitrat, 2g kali phosphat dibazo, 5g natri axetat, 0,1g mangan sulfat, 0,05g magie sulfat, và 1L nước cất) chứa 2% fructoza, và nuôi cấy ở 25°C trong 24 giờ, sau đó hàm lượng manitol trong dịch nổi được xác định bằng phương pháp HPLC.

Kết quả là, thử nghiệm đã cho thấy rằng mức độ tạo manitol bởi *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 tăng lần lượt 147% và 187% so với mức độ tạo manitol của các chủng đối chứng (bảng 3).

Bảng 3

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CJLM119	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3722
Mức độ tạo manitol (mg/L)	16516,28	11224,70	8815,10

#### Ví dụ 5: Đánh giá độ an toàn của chủng

Để kiểm tra xem *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 được chọn trong ví dụ 1 có thể sử dụng được làm tác nhân khởi động trong chế biến kim chi hay không, độ an toàn của chủng này được phân tích. Cụ thể, theo các phương pháp thử nghiệm đánh giá độ an toàn được đề xuất trong tài liệu Korean Bio Venture Association Standards, các thử nghiệm tiêu huyết, hóa lỏng gelatin, tạo chất chuyển hóa có độc tính (amoniac) và phenylalanin deaminaza được tiến hành.

Kết quả là, thử nghiệm đã cho thấy rằng chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 thể hiện kết quả âm tính trong tất cả các thử nghiệm tiêu huyết, hóa lỏng gelatin, tạo ra chất chuyển hóa có độc tính (amoniac) và phenylalanin deaminaza, cho thấy chủng này là chủng an toàn mà có thể được sử dụng cho cơ thể người và có thể dùng trong chế biến thực phẩm (bảng 4).

Bảng 4

Thử nghiệm hóa lỏng gelatin	Thử nghiệm phenylalanin deaminaza	Thử nghiệm tiêu huyết	Thử nghiệm tạo amoniac
Âm tính	Âm tính	$\gamma$	Âm tính

\* $\gamma$  (tiêu huyết gama): không tiêu huyết.

#### Ví dụ 6: Chế biến kim chi

##### 6-1) Chế biến kim chi bằng cách sử dụng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119

Môi trường được chuẩn bị bằng cách trộn 2,5g sacaroza, 1,0g trinatri xitrat, 1,5g pepton, 1,0g glucoza, 1,0g chất chiết nấm men, 0,5g fructoza, 0,5g natri axetat và 1L nước cất, tiếp theo là khử trùng. Khoảng  $10^9$  CFU/ml chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 được cấy vào môi trường với lượng 1% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của môi trường, và nuôi cấy ở 25°C trong 24 giờ, nhờ đó tạo ra sản phẩm nuôi cấy của chủng. Tiếp theo, sản phẩm nuôi cấy của chủng đã chuẩn bị được bổ sung vào gia vị kim chi nói chung (thu được bằng cách trộn bột ớt (2,5% khối lượng), tỏi (2% khối lượng), gừng (0,4% khối lượng), hành lá (1% khối lượng), rau cải bẹ xanh (18% khối lượng) và nước mắm cá (5% khối lượng)) với lượng 0,1% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của kim chi để chuẩn bị gia vị. Sau đó, gia vị đã chuẩn bị được trộn với cải thảo ướp muối, nhờ đó tạo ra kim chi (ví dụ thử nghiệm 1).

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

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

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

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

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

#### 7-1) So sánh mức tạo axit

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

Kết quả là, có thể thấy rằng mức độ tạo axit lactic trong kim chi của ví dụ thử nghiệm 1 là 65 đến 67% so với mức độ tạo axit lactic trong từng kim chi theo ví dụ so sánh 3, được chế biến không sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng, và của các mẫu kim chi theo ví dụ so sánh 1 và 2, được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy của các chủng chuẩn. Điều này cho thấy rằng khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119, sự tăng vị chua được ngăn chặn để duy trì chất lượng vị giác của kim chi (bảng 5).

Bảng 5

	Ví dụ thử nghiệm 1	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ so sánh 3
Mức độ tạo axit lactic (mg/L)	4819,4	7379,2	7198,2	7585,4

#### 7-2) So sánh mức độ tạo khí

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

Kết quả là, mức độ tạo khí của kim chi theo ví dụ thử nghiệm 1 là 57 đến 62% so với mức độ tạo khí của kim chi theo ví dụ so sánh 1 và 2, được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy các chủng chuẩn, và thấp hơn so với kim chi theo ví dụ so sánh 3, được chế biến mà không sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng bất kỳ. Điều này cho thấy rằng khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119, mức độ tạo khí của kim chi có thể giảm đáng kể để nhờ đó tăng mức thuận tiện khi phân phối kim chi (bảng 6).

Bảng 6

	Ví dụ thử nghiệm 1	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ so sánh 3
Mức độ tạo khí (cc/g)	1,44	2,54	2,33	2,02

## 7-3) So sánh mức tạo manitol

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

Kết quả là, có thể thấy rằng mức độ tạo manitol trong kim chi của ví dụ thử nghiệm 1 là 167 đến 199% so với mức độ tạo manitol trong từng kim chi theo ví dụ so sánh 3, được chế biến không sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng bất kỳ, và của các kim chi theo ví dụ so sánh 1 và 2, được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy của các chủng chuẩn. Điều này cho thấy rằng khi kim chi được chế biến bằng cách sử dụng sản phẩm nuôi cấy của chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119, kim chi được chế biến có thể chứa lượng lớn manitol, và do đó có độ ổn định bảo quản và chất lượng vị giác tuyệt vời (bảng 7).

Bảng 7

	Ví dụ thử nghiệm 1	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ so sánh 3
Mức độ tạo manitol (mg/L)	16119,9	9418,8	9628,7	8099,8

Số truy cập

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

Số truy cập: KCTC 13043BP;

Ngày lưu trữ: 10/06/2016.

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

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

A. Các chỉ định đưa ra sau đây liên quan đến vi sinh vật được lưu trữ hoặc các vật liệu sinh học khác được đề cập đến trong phần mô tả trang <u>10</u> , dòng <u>1</u> .	
B. <b>NHẬN DẠNG MẪU LƯU TRỮ</b> Các mẫu lưu trữ khác được nhận dạng ở trang bổ sung <input type="checkbox"/>	
Tên viện lưu trữ <b>Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology</b>	
Địa chỉ viện lưu trữ ( <i>bao gồm mã bưu chính và nước</i> ) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 181 Ipsingil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do, 56212, Korea	
Ngày lưu trữ <b>10/06/2016</b>	Số truy cập <b>KCTC 13043BP</b>
C. <b>CÁC CHỈ ĐỊNH KHÁC</b> ( <i>bỏ trống nếu không áp dụng</i> ) Thông tin này được tiếp tục ở trang bổ sung <input type="checkbox"/>	
D. <b>CÁC QUỐC GIA ĐƯỢC CHỈ ĐỊNH</b> ( <i>nếu các chỉ định này không phải là cho mọi quốc gia được chỉ định</i> )	
E. <b>CUNG CẤP CHỈ ĐỊNH RIÊNG</b> ( <i>để trống nếu không áp dụng</i> ) Các chỉ định được liệt kê dưới đây sẽ được nộp cho Văn phòng quốc tế sau ( <i>ghi rõ bản chất chung của các chỉ định ví dụ, "Số truy cập của mẫu lưu trữ"</i> )	

Chỉ dành cho Văn phòng nhận đơn <input type="checkbox"/> Tờ khai này được nhận cùng với đơn quốc tế
Cán bộ có thẩm quyền

Chỉ dành cho Văn phòng quốc tế <input type="checkbox"/> Tờ khai này được nhận bởi Văn phòng quốc tế vào ngày:
Cán bộ có thẩm quyền

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

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) tạo lượng khí ít hơn so với chủng *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3100 hoặc chủng *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3722.
2. Chế phẩm khởi động lên men chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) hoặc sản phẩm nuôi cấy của chủng này.
3. Chế phẩm khởi động lên men theo điểm 2, trong đó chế phẩm này chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) với nồng độ  $10^7$  cfu/ml hoặc cao hơn.
4. Chế phẩm khởi động lên men theo điểm 2, trong đó chế phẩm này chứa thêm một hoặc nhiều chất bảo quản lạnh đông được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, trehaloza, maltodextrin, sữa bột tách béo và tinh bột.
5. Kim chi chứa chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) theo điểm 1 hoặc chế phẩm khởi động lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4.
6. Phương pháp chế biến kim chi bao gồm bước cho chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 (KCTC 13043BP) theo điểm 1 hoặc chế phẩm khởi động lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4 tiếp xúc với nguyên liệu cần lên men.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120>CHỨNG *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* CJLM119 TẠO RA LƯỢNG KHÍ GIẢM, CHẾ PHẨM KHỞI ĐỘNG LÊN MEN CHỨA CHỨNG NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP CHẾ BIẾN KIM CHI BẰNG CÁCH SỬ DỤNG CHỨNG NÀY

<130> PA17-0214

<150> KR 10-2016-0090284

<151> 2016-07-15

<160> 2

<170>KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 916

<212>ARN

<213>Chuabiết

<220>

<223>TrìnhtựARN 16s của*Leuconostocmesenteroides* CJLM119

<400> 1

```

cccttttgggcgcttttcccaggcggacacttaatgcgcttagcttcggcactaagaggcgg          60
aaacctcctaacacctagtgttcatcgtttacggtgtggactaccagggtatctaactct          120
gtttgctaccacacttttcgagcctcaacgtcagttgcagtccagtaagccgccttcgcc          180
actggtgtttcttccatatactacgcattccaccgctacacatggagttccacttacctc          240
tactgcactcaagttaaccagtttccaatgccattccggagttgagctccgggctttcac          300
atcagacttaataaaccgtctgcgctcgctttacgcccaataaatccggataacgctcgg          360
gacatacgtattaccgcggtgctggcacgtattagccgtccctttctggtatggtacc          420
gtcaaactaaaatcatttcctattctagctgttcttccatacaacagtgctttacgacc          480
cgaaagccttcatcacacacgcggcggttgctccatcaggctttcgcccattgtggaagat          540
tccctactgcagcctcccgtaggagtttgggccgtgtctcagtcccaatgtggccgatca          600
gtctctcaactcggctatgcatcattgtcttggtaggcctttacccaccaactaactaa          660
tgcaccgcggatccatctctaggtgacgccgaagcgccttttaactttgtgtcatgcgac          720
actaagttttattcggatttagcatctgtttccaaatggtatccccagccttgaggcagg          780
ttgtccacgtgttactcaccgcttcgccactcacttgaaaggtgcaagcacctttcgctg          840
tgcgcttcgacttgcatgtattaggcacgcccgccagcgttcatcctgagccatgatccaaa          900
ctctaaaagggggggg
916

```

<210> 2  
 <211> 1539  
 <212>ARN  
 <213>Chuabiết

<220>  
 <223>Trình tự rARN 16s của *Leuconostoc mesenteroides* NRIC 1517

<400> 2

```

tagagtttgatcatggctcaggatgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgaa      60
cgcacagcgaaaggtgcttgacctttcaagtgagtgggcgaacgggtgagtaacacgtgg      120
acaacctgcctcaaggctggggataacatttgaaacagatgctaataccgaataaaaact      180
tagtgcgcatgacacaaagttaaaggcgttcggcgtcacctagagatggatccgcgg      240
tgcattagttagttggtggggtaaaggcctaccaagacaatgatgcatagccgagttgag      300
agactgatcggccacattgggactgagacacggccaaaactcctacgggagggtgcagta      360
gggaatctccacaatgggcgaaagcctgatggagcaacgccgcgtgtgtgatgaaggct      420
ttcgggtcgtaaagcactgttgatgggaagaacagctagaataggaaatgattttagtt      480
tgacggtaccataccagaaagggacggctaaatacgtgccagcagccgcggtaatacgt      540
tgtcccgagcgttatccggatatttgggcgtaaagcgagcgcagacggtttattaagtc      600
tgatgtgaaagcccggagctcaactccggaatggcattggaaactggttaacttgagtgc      660
agtagaggtaagtggaactccatgtgtagcgggtggaatgcgtagatatatggaagaacac      720
cagtggcgaaggcggcttactggactgcaactgacggtgaggctcgaaagtgtgggtagc      780
aacaggattagataccctggtagtccacaccgtaaacgatgaacactaggtgttaggag      840
gtttccgcctcttagtgccgaagctaacgcattaagtgttccgcctggggagtaacgaccg      900
caaggttgaaactcaaaggaattgacggggacccgcacaagcgggtggagcatgtggttta      960
attcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggtcttgacatcctttgaagcttttagagata      1020
gaagtgttctcttcggagacaaagtgacagtggtgcatggtcgtcgtcagctcgtgtcg      1080
tgagatggtgggttaagtcccgcaacgagcgcgaacccttattgttagttgccagcattca      1140
gatgggcaactctagcgagactgccggtgacaaaccggaggaaggcggggacgacgtcaga      1200
tcatcatgccccttatgacctgggctacacacgtgctacaatggcgtatacaacgagttg      1260
ccaaccgcgaggggtgagctaattctttaaagtacgtctcagttcggattgtagtctgca      1320
actcgactacatgaagtcggaatcgctagtaatcgcggatcagcacgcccggtgaatac      1380
gttcccgggtcttgtaacacaccgccgtcacacatgggagtttgtaatgcccgaagccg      1440
gtggcctaaccttttaggaaggagccgtctaaggcaggacagatgactggggtgaagtcg      1500

```



25097

taacaaggtagccgtaggagAACCTGCGGTTGGATCACC  
1539