



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0025749

(51)⁷ C12N 1/20; C12R 1/125; A23K 1/16 (13) B

(21) 1-2014-03687

(22) 04/04/2013

(86) PCT/KR2013/002827 04/04/2013

(87) WO/2013/151362 10/10/2013

(30) 10-2012-0035289 05/04/2012 KR

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/03/2015 324A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

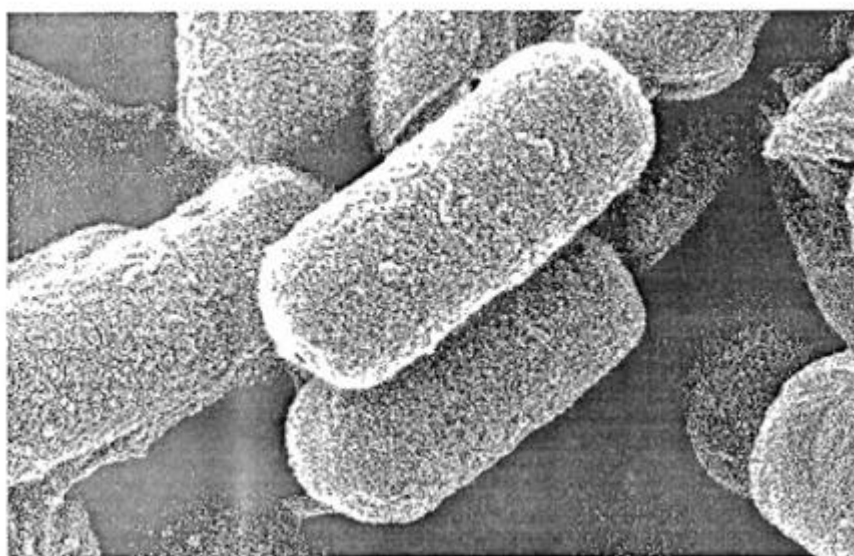
500, Namdaemunro 5-ga, Jung-gu, Seoul 100-749, Republic of Korea

(72) BACK, Seung Hee (KR); YANG, Si Yong (KR); WOO, Seo Hyung (KR); SEO, Hyo Seel (KR).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) CHỦNG BACILLUS SUBTILIS CJMPB957, SẢN PHẨM NUÔI CẤY CỦA CHỦNG NÀY, CHẾ PHẨM LỢI KHUẨN, PHỤ GIA THỨC ĂN CHĂN NUÔI VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI CHỨA CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) mới, chế phẩm lợi khuẩn, và sản phẩm nuôi cấy, phụ gia thức ăn chăn nuôi, thức ăn chăn nuôi chứa chủng này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) mới, chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng này, và phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ở vật nuôi bằng cách sử dụng chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhiễm trùng ở vật nuôi làm giảm đáng kể giá trị hàng hóa, ví dụ giảm trọng lượng ở vật nuôi, khởi phát nhiều hội chứng khác nhau, hoặc các tác động tương tự. Bệnh tiêu chảy do *Escherichia coli* sinh độc tố trong ruột (enterotoxigenic *Escherichia coli* - ETEC) gây ra, bệnh trực khuẩn coli do *Escherichia coli* gây bệnh ở chim gây ra (avian pathogenic *Escherichia coli* - APEC), nhiễm khuẩn huyết, bệnh viêm ruột cấp/mạn tính do nhiễm salmonella, viêm ruột hoại thư do *Clostridium* Sp., và các bệnh khác tương tự là những ví dụ về các bệnh nhiễm khuẩn ở vật nuôi.

Ngoài ra, bệnh nấm aspergillus do *Aspergillus* sp. gây ra, thường lây truyền trong các hạt dùng làm nguyên liệu thô cho thức ăn chăn nuôi, là bệnh nấm gây mất cảm giác thèm ăn, sốt, khó thở, tiêu chảy, chứng loạn thần kinh chức năng như chứng chuột rút, hoặc các triệu chứng tương tự khác, trong trường hợp bệnh nấm aspergillus cấp tính.

Nhiều kháng sinh đã được phát triển để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh nêu trên. Tuy nhiên, do tần suất vi khuẩn kháng kháng sinh ngày càng tăng do việc lạm dụng kháng sinh, nên việc sử dụng kháng sinh bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để phòng ngừa bệnh và thúc đẩy sự tăng trưởng đã bị cấm hoàn toàn hoặc được quy định chỉ để điều trị bệnh. Do việc sử dụng kháng sinh đã được quy định chặt chẽ như nêu

trên, nên sản lượng vật nuôi có thể bị giảm, và tỷ lệ chết có thể tăng. Do đó, việc phát triển các phương pháp thay thế cho kháng sinh có khả năng giải quyết các vấn đề này cấp bách này.

Gần đây, theo xu hướng này, các nghiên cứu về việc phát triển lợi khuẩn có khả năng thay thế kháng sinh đã được tiến hành. Giải pháp đã biết liên quan đến các lợi khuẩn bao gồm:

Lactobacillus fermentum BLAB19 có tác dụng ức chế *E.coli* và *Salmonella* để phòng ngừa bệnh tiêu chảy ở bò cái đã được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 2010-0076263.

Bacillus amyloliquefaciens K37 ức chế sự phát triển của *Edwardsiella tarda*, *E. coli*, hoặc *Staphylococcus epidermidis*, mà là các vi sinh vật gây bệnh kháng kháng sinh hoặc vi sinh vật gây bệnh ở ruột, đã được bộc lộ trong patent Hàn Quốc số 10-0878799.

Lactobacillus fermentum 12-1 (KACC91135) ức chế *E. coli* gây bệnh tiêu chảy ở lợn con đã được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 2006-0026371.

Tuy nhiên, chỉ có các chủng có hoạt động như một chất kháng sinh kháng *E. coli*, *Salmonella*, hoặc *Clostridium* gây ra các vấn đề cho gia cầm và lợn là được bộc lộ trong các giải pháp đã biết, còn các chủng có hoạt tính kháng nấm chống lại sự lây lan *Aspergillus* ở hạt dùng làm nguyên liệu thô trong thức ăn chăn nuôi, gây ra bệnh nấm aspergillus hoặc bệnh tương tự, chưa được bộc lộ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) có hoạt tính kháng nấm và hoạt tính kháng sinh tốt, có khả năng sản xuất enzym tiêu hóa phức hợp, chịu được axit, và bền với mật.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất sản phẩm nuôi cấy của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P).

Ngoài ra, theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm lợi khuẩn, phụ gia thức ăn chăn nuôi, và thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó).

Hơn thế nữa, theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh do nấm hoặc vi khuẩn ở vật nuôi bằng cách cho vật nuôi sử dụng chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó.

[Giải pháp kỹ thuật]

Sáng chế đề xuất chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) mới, chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng này, và mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ở vật nuôi bằng cách sử dụng chủng này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) mới có hoạt tính kháng nấm và hoạt tính kháng sinh, có khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức hợp, chịu được axit, và bền với mật.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất sản phẩm nuôi cấy của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) như được mô tả trên đây.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) như được mô tả trên đây hoặc sản phẩm nuôi cấy của chủng như được mô tả trên đây.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) như được mô tả trên đây, sản phẩm nuôi cấy của chủng như được mô tả trên đây hoặc chế phẩm lợi khuẩn như được mô tả trên đây.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) như được mô tả trên đây, sản phẩm nuôi cấy của chủng như được mô tả trên đây, chế phẩm lợi khuẩn như được mô tả trên đây

hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi như được mô tả trên đây.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh do nấm hoặc vi khuẩn ở vật nuôi bao gồm cho vật nuôi sử dụng một hoặc nhiều sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm chế phẩm lợi khuẩn, phụ gia thức ăn chăn nuôi và thức ăn chăn nuôi.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm lợi khuẩn, phụ gia thức ăn chăn nuôi, và thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) có hoạt tính kháng nấm và hoạt tính kháng sinh tốt, khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức hợp, chịu được axit, và bền với mật hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó. Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh do nấm hoặc vi khuẩn ở vật nuôi bao gồm cho vật nuôi sử dụng chế phẩm lợi khuẩn, phụ gia thức ăn chăn nuôi, và thức ăn chăn nuôi như được mô tả trên đây, sao cho có thể kiểm soát được bệnh ở vật nuôi, cải thiện khả năng tiêu hóa của vật nuôi và cải thiện hiệu quả của thức ăn chăn nuôi cho vật nuôi nhờ cân bằng hệ vi khuẩn đường ruột, theo đó có thể góp phần phát triển ngành chăn nuôi.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 thể hiện ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) theo sáng chế.

FIG.2A là biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng sinh của 3 chủng dự tuyển nêu trong ví dụ 2 kháng *E. coli* O122 sinh độc tố trong ruột.

FIG.2B là biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng sinh *in vitro* của 3 chủng dự tuyển nêu trong ví dụ 2 kháng *E. coli* O149 sinh độc tố trong ruột.

FIG.3 là ảnh thể hiện hoạt tính kháng sinh của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) theo sáng chế.

FIG.4 là ảnh thể hiện hoạt tính kháng nấm của chủng *Bacillus subtilis*

CJMPB957 (KCCM11271P) theo sáng chế kháng *Aspergillus flavus*.

FIG.5 là ảnh thể hiện hoạt tính enzym tiêu hóa phức hợp của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) theo sáng chế.

FIG.6 là ảnh thể hiện tỷ lệ sống sót khi chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) theo sáng chế được xử lý bằng dịch vị nhân tạo hoặc dịch mật nhân tạo.

FIG.7 là ảnh thể hiện không có hiện tượng tiêu máu khi dùng chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) theo sáng chế.

FIG.8 thể hiện trình tự nucleotit 16s rADN của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 (KCCM11271P) theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết. Do các nội dung mà không được thể hiện trong bản mô tả sáng chế có thể được hiểu và suy luận ra một cách đầy đủ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc lĩnh vực tương tự, nên phần mô tả của chúng được lược bỏ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 mới phân lập được (KCCM11271P, dưới đây cũng được gọi là ‘CJMPB957’).

CJMPB957 có hình thái tương tự với *Bacillus* gram dương (xem FIG.1) và theo kết quả của việc phân tích trình tự nucleotit 16s rADN (SEQ ID No: 1, FIG.8), CJMPB957 là chủng có mức tương đồng 98% với *Bacillus subtilis*.

CJMPB957 được lưu trữ ở Trung tâm Chủng vi sinh vật Hàn Quốc (địa chỉ 361-221, Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul) với số đăng ký KCCM11271P vào ngày 22/3/2012.

CJMPB957 có hoạt tính kháng nấm và kháng sinh phức hợp.

Ví dụ về các vi sinh vật đích của CJMPB957 có hoạt tính kháng sinh hoặc kháng nấm có thể bao gồm *Aspergillus* sp. và cũng bao gồm một hoặc nhiều vi sinh

vật được chọn từ nhóm bao gồm *Escherichia coli* sinh độc tố trong ruột (ETEC), *Escherichia coli* gây bệnh ở chim (APEC), *Salmonella* sp., và *Clostridium* sp.

Cụ thể, CJMPB957 có thể có hoạt tính kháng sinh hoặc kháng nấm kháng lại tất cả các vi sinh vật trong số *Aspergillus* sp., *Escherichia coli* sinh độc tố trong ruột (ETEC), *Escherichia coli* gây bệnh ở chim (APEC), *Salmonella* sp., và *Clostridium* sp.

CJMPB957 có khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức hợp.

Ví dụ về enzym tiêu hóa có khả năng được tổng hợp bởi CJMPB957 bao gồm một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm proteaza, xenlulaza, amylaza, xylanaza, mananaza, lipaza, và phytaza.

Cụ thể, CJMPB957 có thể tổng hợp tất cả các enzym proteaza, xenlulaza, amylaza, xylanaza, mananaza, lipaza, và phytaza.

CJMPB957 có khả năng chịu nhiệt tốt.

Cụ thể, tỷ lệ tạo thành nội bào tử của CJMPB957, được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ và được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 95°C trong 10 phút, có thể bằng 95% hoặc cao hơn và cụ thể bằng 100%.

Vì nội bào tử có khả năng chịu được môi trường khắc nghiệt như tia tử ngoại, nhiệt độ thấp, điều kiện khô và/hoặc áp suất cao cũng như điều kiện nhiệt độ cao, nên tỷ lệ tạo thành nội bào tử càng cao thì tỷ lệ sống sót của chủng này càng lớn.

CJMPB957 có khả năng chịu axit tốt.

Cụ thể, tỷ lệ sống sót của chủng CJMPB957 được nuôi cấy trong môi trường chứa dịch vị nhân tạo được tạo ra bằng cách bổ sung 1% (trọng lượng/thể tích) pepsin vào dung dịch được điều chỉnh đến pH = 2,5 trong 3 giờ có thể bằng 95% hoặc cao hơn, và cụ thể bằng 100%.

CJMPB957 có độ bền với mật tốt.

Cụ thể là, tỷ lệ sống sót của CJMPB957 được nuôi cấy trong môi trường chứa dịch mật nhân tạo chứa 1% (trọng lượng/thể tích) pancreatin trong 3 giờ có thể bằng 95% hoặc cao hơn, cụ thể bằng 100%.

Chúng mới phân lập được, CJMPB957 theo sáng chế có thể được nuôi cấy bằng phương pháp chung dùng để nuôi cấy chủng *Bacillus*. Cụ thể, chủng CJMPB957 có thể được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy nằm trong khoảng từ 20 đến 40°C trong khoảng thời gian từ 12 giờ đến 4 ngày.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm nuôi cấy của chủng CJMPB957.

Sản phẩm nuôi cấy là một khái niệm bao gồm môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch nuôi cấy trong đó chủng CJMPB957 được nuôi cấy và chủng nuôi cấy thu được trong môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch nuôi cấy. Ngoài ra, sản phẩm nuôi cấy có thể chứa hoặc không chứa chủng CJMPB957.

Sản phẩm nuôi cấy không bị giới hạn ở một loại cụ thể, nhưng có thể là loại thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Ví dụ, sản phẩm nuôi cấy có thể là chất lỏng hoặc chất rắn, đặc biệt là có thể ở trạng thái ban đầu của sản phẩm nuôi cấy, hoặc dạng được cô đặc hoặc sấy khô của nó.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường tự nhiên hoặc môi trường tổng hợp có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy chủng CJMPB957 theo sáng chế.

Nguồn cacbon của môi trường không bị giới hạn ở một nguồn cụ thể, và mọi nguồn cacbon đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn phạm vi về nguồn cacbon có thể bao gồm glucoza, sucroza, dextrin, glyxerol, tinh bột, hoặc các nguồn tương tự khác. Một hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai trong số chúng có thể được sử dụng.

Nguồn nitơ của môi trường không bị giới hạn ở một nguồn cụ thể, và mọi nguồn nitơ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn phạm vi về nguồn nitơ có thể bao gồm pepton, dịch chiết thịt, dịch chiết nấm men, nấm men khô, đậu tương, muối amoni, nitrat, các hợp chất hữu cơ hoặc vô cơ khác chứa nitơ, hoặc các nguồn nitơ tương tự khác. Một hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai trong số chúng

có thể được sử dụng.

Muối vô cơ chứa trong môi trường không bị giới hạn ở một muối cụ thể, và mọi muối vô cơ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn phạm vi về muối vô cơ có thể bao gồm magie, mangan, canxi, sắt, kali, và nguồn tương tự. Một hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai nguồn trong số chúng có thể được sử dụng.

Axit amin, vitamin, axit nucleic, và/hoặc các thành phần khác có thể thường được chứa trong môi trường nuôi cấy được bổ sung thêm vào môi trường để nuôi cấy chủng CJMPB957 theo sáng chế.

Dung dịch nuôi cấy

Dung dịch nuôi cấy chủng CJMPB957 theo sáng chế có thể là dung dịch nuôi cấy hoặc dung dịch thu được bằng cách loại bỏ dịch nổi nuôi cấy khỏi dung dịch nuôi cấy và/hoặc cô đặc dung dịch nuôi cấy. Chủng CJMPB957 có thể được chứa trong dung dịch nuôi cấy.

Thành phần của dung dịch nuôi cấy không bị giới hạn ở một dạng cụ thể, nhưng có thể chứa thêm thành phần có tác dụng hiệp đồng đến sự phát triển của *Bacillus* cũng như là thành phần thường được biết đến là cần để nuôi cấy chủng *Bacillus*. Thành phần này có thể dễ dàng được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Dung dịch nuôi cấy có thể ở trạng thái lỏng hoặc trạng thái sấy khô.

Phương pháp sấy dung dịch nuôi cấy không bị giới hạn ở một dạng cụ thể, và các phương pháp sấy thường được sử dụng trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn phạm vi về phương pháp sấy bao gồm phương pháp sấy bằng không khí, phương pháp sấy tự nhiên, phương pháp sấy phun, phương pháp đông khô hoặc phương pháp tương tự. Có thể sử dụng một phương pháp hoặc kết hợp hai hoặc nhiều hơn hai phương pháp với nhau.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng

CJMPB957 hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó.

Lợi khuẩn chỉ vi khuẩn hoặc một thành phần của nó có tác dụng có lợi đến sức khỏe của vật chủ như người, động vật hoặc các loài tương tự. Các lợi khuẩn này được biết là cư trú ở thành ruột trong đường tiêu hóa của vật chủ đóng vai trò ngăn cản sự cư trú của vi khuẩn có hại hoặc sự lan truyền vi khuẩn gây bệnh, và các enzym tiêu hóa có lợi được tổng hợp bởi lợi khuẩn hỗ trợ cho việc hấp thu và sử dụng các chất dinh dưỡng.

Chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế có thể chứa chủng CJMPB957 và/hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó.

Chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế có thể chứa chủng CJMPB957 với lượng nằm trong khoảng từ 5×10^4 đến 5×10^{10} CFU/ml, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^9 CFU/ml.

Chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế có thể còn chứa chất mang được dụng và được phối chế cùng với chất mang này.

Thuật ngữ “chất mang được dụng” như được sử dụng ở đây chỉ chất mang hoặc chất pha loãng mà không kích thích sinh vật sống cũng không ức chế hoạt tính sinh học và các đặc tính của hợp chất được sử dụng.

Chất mang có khả năng được sử dụng trong chế phẩm lợi khuẩn được phối chế thành dung dịch pha loãng, ví dụ về chất mang được vô trùng hoặc thích hợp cho cơ thể sống có thể bao gồm dung dịch nước muối thông thường, nước vô trùng, dung dịch nước muối được đệm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, hoặc chất mang tương tự. Có thể sử dụng một chất mang hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai chất mang, và nếu cần có thể bổ sung các tá dược thông thường khác như chất chống oxy hóa, dung dịch đệm, chất kìm khuẩn, và/hoặc tá dược tương tự.

Ngoài ra, chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính,

và/hoặc chất làm trơn được bổ sung thêm vào, sao cho sản phẩm lợi khuẩn có thể được phối chế thành dung dịch tiêm như dung dịch nước, hỗn dịch, nhũ tương, hoặc dạng tương tự, viên tròn, viên nang, cốm hoặc viên nén.

Chế phẩm dùng qua đường miệng chứa chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế làm hoạt chất không bị giới hạn cụ thể, và các chế phẩm dùng qua đường miệng đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Viên nén, viên ngậm dẹp, viên ngậm, hỗn dịch chứa nước hoặc chứa dầu, bột hoặc cốm được phối chế, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, siro, cốm ngọt, hoặc dạng tương tự là ví dụ không giới hạn phạm vi về chế phẩm dùng qua đường miệng.

Để phối chế chế phẩm lợi khuẩn thành viên nén, viên nang, hoặc dạng tương tự, chế phẩm này có thể còn chứa chất kết dính như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza, hoặc gelatin, tá dược như dicanxi phosphat, chất phân tán như tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang, chất làm trơn như magie stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, hoặc sáp polyetylen glycol, hoặc dạng tương tự. Trong trường hợp chế phẩm ở dạng viên nang, thì chế phẩm này có thể chứa thêm chất mang dạng lỏng như dầu béo.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm lợi khuẩn.

Chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng CJMPB957 theo sáng chế và/hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó có thể được phối chế ở dạng phụ gia thức ăn chăn nuôi và sau đó được trộn với thức ăn chăn nuôi cho vật nuôi hoặc được bổ sung trực tiếp vào thức ăn chăn nuôi.

Loại phụ gia thức ăn chăn nuôi không bị giới hạn cụ thể, nhưng phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể ở trạng thái lỏng hoặc trạng thái sấy khô, và cụ thể hơn là ở dạng bột sấy khô.

Phương pháp sấy không bị giới hạn cụ thể, và phương pháp sấy đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn phạm vi về phương pháp sấy

bao gồm phương pháp sấy bằng không khí, phương pháp sấy tự nhiên, phương pháp sấy phun, phương pháp đông khô hoặc phương pháp tương tự. Có thể sử dụng một phương pháp hoặc kết hợp hai hoặc nhiều phương pháp sấy trong số các phương pháp sấy nêu trên.

Phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể chứa thêm các chất phụ gia khác có khả năng cải thiện khả năng bảo quản của thức ăn chăn nuôi.

Chất phụ gia được bổ sung thêm vào phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và các chất phụ gia đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn phạm vi về chất phụ gia bao gồm chất kết dính, chất nhũ hóa, chất bảo quản, và chất tương tự mà được bổ sung để ngăn ngừa sự giảm chất lượng của phụ gia thức ăn chăn nuôi; axit amin, vitamin, enzym, chất điều vị, hợp chất nitơ không phải protein, silicat, dung dịch đệm, dịch chiết, oligosacarit, và hợp chất tương tự được bổ sung để làm tăng hiệu quả của phụ gia thức ăn chăn nuôi. Mặt khác, chất phụ gia này còn bao gồm chất trộn vào thức ăn chăn nuôi, hoặc chất tương tự. Có thể sử dụng một chất hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai chất trong số các chất nêu trên.

Chế phẩm lợi khuẩn hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được sử dụng một mình cho động vật hoặc có thể được kết hợp với các phụ gia thức ăn chăn nuôi khác trong chất mang ăn được. Ngoài việc phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được trộn trực tiếp với chất bổ sung bề mặt hoặc thức ăn chăn nuôi cho vật nuôi, thì nó còn có thể được sử dụng riêng rẽ với thức ăn chăn nuôi ở dạng chế phẩm dùng qua đường miệng, hoặc kết hợp với thành phần khác và sau đó sử dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thức ăn chăn nuôi chứa phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể chứa phụ gia thức ăn chăn nuôi với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10 phần trọng lượng, cụ thể hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 phần trọng lượng tính trên 100 phần trọng lượng của thức ăn chăn nuôi. Với lượng nằm trong khoảng nêu trên, thức ăn chăn nuôi có thể thúc đẩy

khả năng tiêu hóa ở vật nuôi một cách hiệu quả, nhờ đó có thể làm tăng hiệu quả thức ăn chăn nuôi.

Thành phần của thức ăn chăn nuôi theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể và có thể là thành phần đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ không giới hạn phạm vi về thành phần của thức ăn chăn nuôi bao gồm các thành phần có nguồn gốc thực vật như hạt, rễ và quả, các sản phẩm phụ của quá trình chế biến thực phẩm, tảo, chất xơ, chất béo, tinh bột, các cây bầu bí, sản phẩm phụ từ hạt, và thành phần tương tự, và thành phần có nguồn gốc động vật như protein, các nguyên liệu vô cơ, chất béo, chất khoáng, protein tế bào đơn, thành phần phiêu sinh động vật, hoặc thức ăn cho cá, và thành phần tương tự. Một thành phần hoặc hỗn hợp gồm ít nhất hai thành phần trong số các thành phần nêu trên có thể được sử dụng.

Ví dụ về vật nuôi trong đó chế phẩm lợi khuẩn, phụ gia thức ăn chăn nuôi, hoặc thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được sử dụng bao gồm các vật nuôi như bò thịt, bò sữa, bê, lợn, lợn con, cừu, dê, ngựa, thỏ, chó, mèo, và vật nuôi tương tự, và gia cầm như gà, gà đang đẻ trứng, gia cầm nội địa, gà trống, vịt, ngỗng, gà tây, chim cút, hoặc vật nuôi tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở chúng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh do nấm hoặc vi khuẩn ở vật nuôi bằng cách cho vật nuôi sử dụng một hoặc nhiều sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng CJMPB957 và/hoặc sản phẩm nuôi cấy của chủng này, phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm lợi khuẩn này, và thức ăn chăn nuôi chứa phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Thuật ngữ “phòng ngừa” như được sử dụng ở đây chỉ tất cả các hành động cung cấp chủng CJMPB957 và/hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó cho động vật đích ở dạng ăn được như dạng được phẩm, dạng phụ gia thức ăn chăn nuôi, hoặc dạng tương tự, để ức chế bệnh tương ứng hoặc làm chậm sự khởi phát bệnh.

Thuật ngữ “điều trị” như được sử dụng ở đây chỉ tất cả các hành động cung cấp chủng CJMPB957 và/hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó cho động vật đích ở dạng ăn

được như dạng dược phẩm, dạng phụ gia thức ăn chăn nuôi, hoặc dạng tương tự, để làm thuyên giảm tình trạng bệnh lý của bệnh tương ứng do sự lây nhiễm gây ra.

Ví dụ về bệnh nhiễm khuẩn có thể bao gồm bệnh tiêu chảy do *Escherichia coli* sinh độc tố trong ruột (ETEC), bệnh nhiễm khuẩn E.coli do *Escherichia coli* gây bệnh ở chim gây ra (APEC), nhiễm khuẩn huyết, bệnh nhiễm salmonella gây ra bệnh viêm ruột cấp/mạn tính, viêm ruột hoại thư do *Clostridium* Sp, và bệnh tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này.

Ví dụ về bệnh nấm có thể bao gồm bệnh nấm aspergillus do *Aspergillus* sp., mà gây mất cảm giác thèm ăn, sốt, khó thở, tiêu chảy, chứng chuột rút, hoặc chứng tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các triệu chứng này.

Chế phẩm lợi khuẩn có thể được sử dụng cho động vật ở dạng dược phẩm, hoặc được trộn với thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống của vật nuôi. Cụ thể, chế phẩm lợi khuẩn có thể được trộn với thức ăn chăn nuôi ở dạng phụ gia thức ăn chăn nuôi được sử dụng.

Ngoài ra, chế phẩm lợi khuẩn có thể được sử dụng bằng nhiều đường dùng khác nhau như đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa mà không giới hạn cụ thể miễn là chế phẩm lợi khuẩn có thể tới được cơ quan đích. Cụ thể, chế phẩm lợi khuẩn có thể được sử dụng bằng phương pháp chung như phương pháp sử dụng qua đường miệng, qua trực tràng, khu trú, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong bắp, trong động mạch, dưới da, sử dụng ở mũi, phương pháp xông hít và phương pháp tương tự.

Dưới đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ minh họa sáng chế, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phân lập chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957

(1) Chuẩn bị mẫu và phân lập chủng

Các mẫu thu được từ đậu tương đã lên men và các sản phẩm đậu tương khác đã lên men, một sản phẩm thực phẩm Hàn Quốc truyền thống, được chuẩn bị. Các mẫu đã chuẩn bị được pha loãng theo bậc, được trải lên trên môi trường thạch canh thang não tim (brain heart infusion-BHI) (Difco, Mỹ) chứa 3% natri clorua, và sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ.

Các chủng được phân lập từ mỗi trong số các mẫu này được phân loại tùy thuộc vào các kết quả thu được bằng cách quan sát khuẩn lạc. Khuẩn lạc được chọn được phân lập lại bằng phương pháp cấy chuyển và cấy khuẩn lạc đã chọn trong môi trường mới ba lần, và các chủng được nuôi cấy duy nhất được đặt trong môi trường chứa 20% glyxerol và được bảo quản ở nhiệt độ -70°C hoặc nhiệt độ thấp hơn.

(2) Chọn lọc chủng có hoạt tính kháng sinh phức hợp tốt

Để chọn lọc chủ yếu các chủng có hoạt tính kháng sinh kháng *E. coli* và *Salmonella*, các vi khuẩn gây bệnh tiêu biểu gây ra các vấn đề ở gia cầm và các trang trại lợn, hoạt tính kháng sinh của các chủng phân lập chống lại ba loại vi khuẩn, *Escherichia coli* sinh độc tố trong ruột (ETEC), *Escherichia coli* gây bệnh ở chim (APEC), và *Salmonella typhimurium* (ST), được đánh giá. Hoạt tính kháng sinh được đánh giá bằng cách phân tích vùng tròn sạch tương ứng với vi khuẩn gây bệnh.

Khi điều chế môi trường rắn YM (mạch nha nấm men, Difco, Mỹ), 0,4% các dung dịch nuôi cấy được lắc của 3 vi khuẩn gây bệnh được trộn, lần lượt, nhờ đó điều chế được môi trường đánh giá hoạt tính kháng sinh. 1,5µl dung dịch nuôi cấy của mỗi chủng trong số các chủng thu được từ sản phẩm đậu tương đã lên men được nhỏ lên môi trường đánh giá đã được điều chế và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ. Sau đó, sự có mặt hoặc không có mặt của vòng tròn sạch được tạo thành quanh chủng đã chọn được quan sát. Trong số các chủng vi khuẩn thu được từ sản phẩm đậu tương đã lên men, thì 13 chủng có hoạt tính kháng sinh chống lại ba vi khuẩn gây bệnh được chọn chủ yếu.

Hoạt tính kháng sinh của 13 chủng đã chọn đầu tiên có hoạt tính kháng sinh phức hợp tốt được đánh giá đối với ba loại của ETEC và *Clostridium perfringens*. Giống như ETEC, ETEC O149 sản sinh chất dính bám có dạng sợi lông bám chặt K88, ETEC O122 sản sinh chất dính bám có dạng sợi lông bám chặt K88 và 987p, và ETEC 2617 sản sinh chất dính bám có dạng sợi lông K99, được sử dụng. Hoạt tính kháng sinh chống lại *Clostridium perfringens*, được đánh giá bằng phương pháp giống như được mô tả trên đây ngoại trừ sử dụng dịch nổi nuôi cấy của chủng đã chọn và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong điều kiện kỵ khí.

Kết quả là, ba chủng (739, 823, và 957) có hoạt tính kháng sinh phức hợp tốt được chọn như được thể hiện trong bảng 1.

[Bảng 1]

	ETEC			APEC	ST	<i>Clostridium perfringens</i>
	0122	0149	2617			
739	+++	+++	++	+++++	+++++	-
823	+++	+++	++	++++	++++	++
957	+++	+++	++	+++	+++	+++

Ví dụ 2

Đánh giá hoạt tính kháng sinh *in vitro* chống lại ETEC

Ảnh hưởng của 3 chủng dự tuyển có hoạt tính kháng sinh phức hợp tốt đối với việc ức chế hoạt tính của hai loại ETEC được đánh giá *in vitro*.

Mỗi trong số ba chủng dự tuyển (0,1%) và mỗi trong số ETEC O122 và ETEC O149 (0,1%) lần lượt được nuôi cấy trong môi trường lỏng BHI và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 15 phút. Sau đó, một loại chủng dự tuyển và một loại ETEC được cấy đồng thời trong 1/2 môi trường lỏng BHI và được cấy ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút sao cho lượng của nó là khoảng 1×10^5 CFU/ml, tương ứng. Dung dịch nuôi cấy mỗi thời gian được trải lên trên môi trường thạch BHI và môi trường rắn MacConkey (Difco, Mỹ), và sau đó tế bào của chủng dự tuyển và ETEC được đếm.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 2 và FIG.2A và 2B dưới đây, và chủng

957 được khẳng định là có tác dụng ức chế sự phát triển của ETEC O122 và ETEC O149 tốt hơn trong 24 giờ hoặc hơn 24 giờ. Do đó, cuối cùng chủng 957 được chọn làm chủng có hoạt tính kháng sinh tốt và được gọi là CJMPB957.

[Bảng 2]

Chủng dự tuyển		Số đếm tế bào (CFU/ml) mỗi thời điểm			
		0 giờ	8 giờ	24 giờ	28 giờ
739	739	1,5E+05	1,0E+05	5,9E+06	4,5E+06
	ETEC0122	2,6E+04	1,1E+09	5,1E+06	1,0E+02
823	823	1,6E+04	2,3E+07	9,0E+06	8,5E+05
	ETEC0122	2,7E+04	8,8E+08	3,0E+05	-
957	957	2,1E+05	1,0E+06	2,9E+07	3,9E+07
	ETEC0122	3,2E+05	1,1E+09	-	-
Chủng dự tuyển		Số đếm tế bào (CFU/ml) mỗi thời điểm			
		0 giờ	8 giờ	24 giờ	
739	739	1,5E+05	1,0E+05	5,9E+06	
	ETEC0149	2,6E+04	1,1E+09	5,1E+06	
823	823	1,6E+04	2,3E+07	9,0E+06	
	ETEC0149	2,7E+04	8,8E+08	3,0E+05	
957	957	2,1E+05	1,0E+06	2,9E+07	
	ETEC0149	3,2E+05	1,1E+09	-	

CJMPB957 được chọn cuối cùng có hoạt tính kháng sinh tốt chống lại ETEC, APEC, *Salmonella typhimurium*, và *Clostridium perfringens*, và kết quả đánh giá hoạt tính kháng sinh được thể hiện trong FIG.3.

Ví dụ 3

Nghiên cứu các đặc tính hình thái và hóa sinh của chủng CJMPB957 và xác định nó

(1) Nghiên cứu các đặc tính hình thái và hóa sinh

Để xác định chủng CJMPB957 được chọn cuối cùng là chủng có hoạt tính enzym tiêu hóa phức hợp tốt, tiến hành nghiên cứu đặc tính hình thái và hóa sinh. Dựa vào đặc tính hình thái, chủng CJMPB957 được khẳng định là vi khuẩn bacillus gram dương (FIG.1). Ngoài ra, kiểu lên men đường của chủng CJMPB957 được phân tích bằng cách sử dụng hệ API 50 CHB (Biomerieux, Pháp) để phân tích các đặc tính hóa

sinh.

Bảng 3 dưới đây thể hiện kết quả phân tích kiểu lên men đường của chủng CJMPB957.

[Bảng 3]

Đối chứng	-	Esculin	+
Glyxerol	+	Salixin	+
Erythritol	-	Cellobioza	+
D-Araboza	-	Maltoza	+
L-Araboza	+	Lactoza	+
Riboza	+	Melibioza	-
D-Xyloza	+	Sacaroza	+
L-Xyloza	-	Trehaloza	+
Adonitol	-	Inulin	-
β -Metyl-Xylozit	-	Melezitoza	-
Galactoza	-	D-Rafinoza	+
D-Glucoza	+	Amidon	+
D-Frucoza	+	Glycogen	+
D-Manoza	+	Xylitol	-
L-Sorboza	-	β -Gentiobioza	-
Rhamnoza	-	D-Turanoza	-
Dulxitol	-	D-Lyxoza	-
Inositol	+	D-Tagatoza	-
Manitol	+	D-Fucoza	-
Sorbitol	+	L-Fucoza	-
α -Metyl-d-manozit	-	D-Arabitol	-
α -Metyl-Glucosit	+	L-Arabitol	-
N-Axetyl Glucosamin	-	Gluconat	-
Amygdalin	+	2-xeto-gluconat	-
Arbutin	+	5-xeto-gluconat	-

Trong bảng 3, ký hiệu '+' có nghĩa là dương tính, ký hiệu '-' có nghĩa là âm tính, và nhóm đối chứng là nhóm thử nghiệm mà không có cơ chất.

(2) Xác định chủng CJMPB957

Để xác định chính xác hơn chủng CJMPB957, phương pháp nghiên cứu quan hệ di truyền tiến hóa phân tử sử dụng trình tự nucleotit ADN được tiến hành.

Để phân tích trình tự nucleotit, gen 16s rADN được khuếch đại bằng cách sử dụng hỗn hợp trộn sẵn dùng cho phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction-PCR) (Bioneer, Hàn Quốc) và các cặp môi phổ biến 27F (5'

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3': SEQ ID No: 2) và 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT3': SEQ ID No: 3). Tổng lượng dung dịch phản ứng được để ở 20 μ l, và PCR được tiến hành trong 30 chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong 1 phút, 56°C trong 1 phút, và 72°C trong 1 phút. Sau đó, trình tự nucleotit ADN đã khuếch đại được phân tích. Trình tự nucleotit 16s rADN được phân tích được thể hiện bằng trình tự nêu trong SEQ ID No:1 (FIG.8).

Theo kết quả phân tích, chủng này được xác định là có mức tương đồng với *Bacillus subtilis* bằng 98%.

Chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957, mà là vi sinh vật mới theo sáng chế được xác định như được mô tả trên đây, được lưu trữ ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul) dưới số đăng ký KCCM11271P vào ngày 22/03/2012.

Ví dụ 4

Hoạt tính kháng nấm của chủng CJMPB957

Để đánh giá hoạt tính kháng nấm của chủng CJMPB957, hoạt tính kháng nấm chống lại *Aspergillus flavus*, mà gây ra các vấn đề ở thức ăn chăn nuôi được đánh giá.

Aspergillus được nuôi cấy tĩnh trong môi trường rắn PDA (thạch dextroza khoai tây, Difco, Mỹ) ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ. *Aspergillus* được cắt với kích thước 5mm \times 5mm (dài \times rộng) và được cấy ở giữa môi trường rắn PDA mới, sau đó được nuôi cấy trong 24 giờ.

Sau khi chấm 10 μ l CJMPB957 đã kích hoạt lên trên môi trường rắn trong đó *Aspergillus* được cấy và nuôi cấy CJMPB957 ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ, thì sự có mặt hoặc không có mặt của vùng tròn sạch được tạo thành tương ứng với *Aspergillus* được quan sát.

Như được thể hiện trong FIG.4, chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 được khẳng định là có hoạt tính kháng nấm, ức chế sự phát triển của *Aspergillus*.

Ví dụ 5

Hoạt tính enzym tiêu hóa của chủng CJMPB957

Để khẳng định rằng *Bacillus subtilis* CJMPB957 có thể tổng hợp được enzym tiêu hóa, thì hoạt tính enzym tiêu hóa của proteaza, xenlulaza, amylaza, xylanaza, mananaza, lipaza, và phytaza được đánh giá.

Đánh giá hoạt tính enzym được tiến hành bằng cách đo hoạt tính enzym tùy thuộc vào mức độ tạo thành vùng tròn sạch bằng cách sử dụng môi trường chứa cơ chất tương ứng với mỗi enzym.

1) Chiết dung dịch enzym thô

Sau khi nuôi cấy chủng CJMPB957 trong môi trường BHI trong 24 giờ và 48 giờ, các dịch nổi được chiết bằng cách ly tâm môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Mức độ phân hủy cơ chất được phân tích bằng cách sử dụng dung dịch nuôi cấy dưới dạng dung dịch enzym thô và môi trường chứa cơ chất tương ứng với mỗi enzym.

2) Hoạt tính proteaza

Môi trường mạch nha nấm men (dịch chiết nấm men 3g/l, dịch chiết mạch nha 3g/l, pepton 5g/l, dextroza 10g/l, thạch 20g/l; Difco, Mỹ, dưới đây, được gọi là “môi trường YM”) chứa 2% sữa tách béo (Sigma, USA) được điều chế. Sau khi chấm 1,5μl dung dịch enzym thô đã chiết lên môi trường cơ chất, tiến hành phản ứng ở nhiệt độ 30°C trong 15 giờ, và sau đó hoạt tính enzym được đo bằng mức độ tạo thành vùng tròn sạch.

3) Hoạt tính xenlulaza

Môi trường YM chứa 1% cơ chất carboxyl metyl xenluloza (CMC) được điều chế. Sau khi chấm 1,5μl dung dịch enzym thô đã chiết lên môi trường cơ chất, tiến hành phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ. Sau đó, chất phản ứng được nhuộm bằng cách sử dụng 0,2% dung dịch nước đỏ Congo trong 30 phút, và sau đó khử màu bằng cách sử dụng dung dịch nước NaCl 1M. Hoạt tính enzym được đánh giá bằng mức độ tạo thành vùng tròn sạch được tạo ra bởi sự phân hủy cơ chất quanh enzym thô.

4) Hoạt tính amylaza

Môi trường YM chứa 1% cơ chất tinh bột hòa tan được điều chế. Sau khi chấm 1,5µl dung dịch enzym thô đã chiết lên môi trường cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ. Chất phản ứng được nhuộm bằng cách sử dụng dung dịch nước chứa 0,1% I₂ và 2% KI, và sau đó hoạt tính enzym được đánh giá bằng mức độ tạo thành vùng tròn sạch được tạo ra bởi sự phân hủy cơ chất quanh enzym thô.

5) Hoạt tính xylanaza

Môi trường YM chứa 1% xylan được điều chế. Sau đó chấm 1,5µl dung dịch enzym thô lên môi trường cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ. Sau đó, chất phản ứng được nhuộm bằng cách sử dụng 0,2% dung dịch nước đỏ Congo trong 30 phút, và sau đó khử màu bằng cách sử dụng dung dịch nước NaCl 1M. Tiếp đó, hoạt tính enzym được đánh giá bằng mức độ tạo thành vùng tròn sạch.

6) Hoạt tính mananaza

Môi trường cơ chất (dịch chiết nấm men 3g/l, pepton 5g/l, KH₂PO₄ 1g/l, thạch 20g/l, pH=5) chứa 1% manan (gôm đậu locust, Sigma, Mỹ) được điều chế. Sau khi chấm 1,5µl dung dịch enzym thô đã chiết lên môi trường cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ, và sau đó hoạt tính enzym được đánh giá bằng mức độ tạo thành vùng tròn sạch.

7) Hoạt tính lipaza

Môi trường YM chứa 1% tricaprylin được điều chế. Sau khi chấm 1,5µl dung dịch enzym thô đã chiết lên môi trường cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ, và sau đó hoạt tính enzym được đo bằng mức độ tạo thành vùng tròn sạch.

8) Hoạt tính phytaza

Môi trường cơ chất (glucoza 15g/l, NH₄NO₃ 5g/l, MgSO₄7H₂O 0,5g/l, KCl 0,5g/l, FeSO₄7H₂O 0,01g/l, MnSO₄4H₂O 0,01g/l, thạch 20µl, pH=5,5) chứa 1% axit phytic (Sigma, Mỹ) được điều chế. Sau khi chấm 1,5µl dung dịch enzym thô đã chiết

lên môi trường cơ chất, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ, và sau đó hoạt tính enzym được đo bằng mức độ tạo thành vùng tròn sạch.

Hoạt tính enzym tiêu hóa của CJMPB957 được thể hiện trong bảng 4 và FIG.5 dưới đây.

[Bảng 4]

	Proteaza	Xenlulaza	Amylaza	Xylanaza	Mananaza	Lipaza	Phytaza
CJMPB957	++	+++	++	++	+++++	+	+

Như được thể hiện trong bảng 4 và FIG.5, chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 được khẳng định là có hoạt tính enzym tiêu hóa phức hợp tốt cũng như là hoạt tính kháng sinh và kháng nấm.

Ví dụ 6

Khả năng hình thành nội bào tử của chủng CJMPB957

Bacillus tạo nội bào tử để sống sót trong các điều kiện khắc nghiệt như thiếu hụt một hoặc nhiều chất dinh dưỡng cần thiết, hoặc điều kiện tương tự. Vì nội bào tử có khả năng chống chịu được trong các điều kiện khắc nghiệt như tia tử ngoại, nhiệt độ cao, sấy ở nhiệt độ thấp và áp suất cao, hoặc điều kiện tương tự, sự tạo thành nội bào tử là quan trọng để duy trì tỷ lệ sống sót của bacillus. Do đó, chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 được nuôi cấy trong một thời gian dài, và khả năng tạo thành nội bào tử của chủng này được khẳng định.

Chủng này (0,1%) được cấy trong môi trường lỏng BHI và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 24 và 48 giờ. Dung dịch nuôi cấy ở mỗi thời điểm được trải lên trên môi trường thạch BHI, và đếm tổng số tế bào. Ngoài ra, dung dịch nuôi cấy được gia nhiệt ở nhiệt độ 95°C trong 10 phút và được trải lên môi trường thạch BHI, và số nội bào tử được đếm.

Bảng 5 dưới đây thể hiện các kết quả đếm số nội bào tử.

[Bảng 5]

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Tổng số đếm tế bào (CFU/ml)	Số nội bào tử (CFU/ml)	Tỷ lệ tạo thành nội bào tử (%)
24	$1,4 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	100

48	$1,9 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	100
----	-------------------	-------------------	-----

Như được thể hiện trong bảng 5, nếu CJMPB957 được nuôi cấy trong 24 giờ hoặc hơn 24 giờ, thì tỷ lệ tạo thành nội bào tử là 100%.

Do đó, vì *Bacillus subtilis* CJMPB957 theo sáng chế có khả năng tạo thành nội bào tử tốt nếu được nuôi cấy trong 24 giờ hoặc hơn 24 giờ, nên *Bacillus subtilis* CJMPB957 giống như lợi khuẩn có thể duy trì tỷ lệ sống sót cao ở các cơ quan tiêu hóa của động vật.

Ví dụ 7

Khả năng chịu được axit và bền với mật của chủng CJMPB957

Chủng lợi khuẩn cần có khả năng chống chịu được dịch vị và dịch mật mà là các axit mạnh để tới được ruột sau khi sử dụng qua đường miệng. Vì lý do này, để khẳng định liệu chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 có thể được dùng làm chủng lợi khuẩn hay không, khả năng chịu được axit và bền với mật được đánh giá.

(1) Khả năng chịu được axit và bền trong dịch vị nhân tạo

Dịch vị nhân tạo được điều chế bằng cách bổ sung 1% (trọng lượng/thể tích) pepsin (Sigma, Mỹ) vào dung dịch natri phosphat 0,05M được điều chỉnh ở pH=2,5 bằng cách sử dụng HCl.

Sau khi chủng CJMPB957 được nuôi cấy trong môi trường lỏng BHI ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ, tiến hành ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, sau khi dịch nổi được lấy ra và thành phần vi khuẩn được thu gom, thì dịch vị nhân tạo được bổ sung vào với lượng bằng lượng của dịch nổi lấy ra và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ. Sau khi nuôi cấy, chủng thu được được trải lên môi trường BHI và tế bào được đếm, sao cho khả năng chịu được axit và kháng dịch vị nhân tạo được đánh giá.

(2) Khả năng kháng dịch mật nhân tạo

Dịch mật nhân tạo được điều chế bằng cách bổ sung 1% (trọng lượng/thể tích) pancreatin (Sigma, Mỹ) vào dung dịch natri phosphat 0,05M và vô trùng. Sau đó, dung dịch oxagal 10%(trọng lượng/thể tích) vô trùng (Difco Co.) được bổ sung để thu được

hàm lượng trong môi trường bằng 1% (thể tích/thể tích), và dịch mật nhân tạo được điều chỉnh đến pH=6,8.

Sau khi được nuôi cấy trong dịch vị nhân tạo nêu trong mục (1) trong 3 giờ, chủng CJMPB957 được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Dịch nổi được lấy ra, và thành phần vi khuẩn được thu gom. Sau đó, dịch mật nhân tạo được bổ sung vào đó với lượng bằng lượng dịch nổi lấy ra và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy, chủng thu được được trải lên môi trường BHI và tế bào được đếm, sao cho khả năng chịu được axit và khả năng kháng dịch mật nhân tạo được đánh giá.

Các kết quả đánh giá khả năng chịu được axit, khả năng kháng dịch vị nhân tạo, và khả năng kháng dịch mật nhân tạo được thể hiện trong FIG.6.

Như được thể hiện trong FIG.6, nếu chủng CJMPB957 được xử lý bằng dịch vị nhân tạo (pH=2,5) trong 2 giờ, thì tỷ lệ sống sót là khoảng 100%, và nếu CJMPB957 được xử lý bằng dịch vị nhân tạo và sau đó xử lý bằng dịch mật nhân tạo trong 24 giờ, thì tỷ lệ sống sót bằng 100% cũng được bảo toàn.

Do đó, chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 theo sáng chế được khẳng định là có tỷ lệ sống sót cao ngay cả khi được xử lý bằng dịch vị nhân tạo và dịch mật nhân tạo, vì thế chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 có thể hữu dụng làm chủng lợi khuẩn.

Ví dụ 8

Độ an toàn của chủng CJMPB957

Để khẳng định CJMPB957 an toàn, hiện tượng tiêu máu β được đánh giá. Hiện tượng tiêu máu β là hoạt động làm tan tế bào hồng cầu bằng cách sản sinh phospholipaza trong vi khuẩn gây hại để thủy phân phospholipit được cung cấp bởi tế bào hồng cầu.

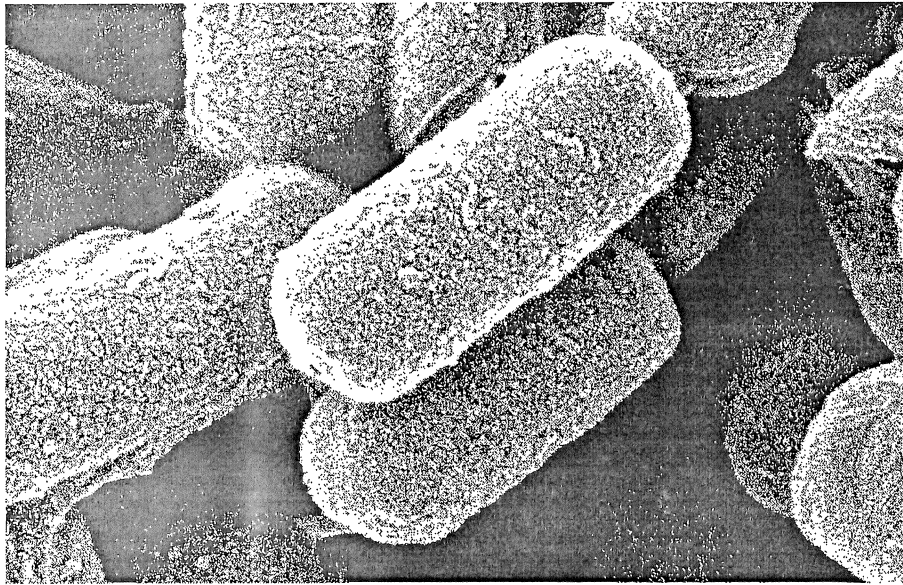
Để khẳng định hiện tượng tiêu máu bởi *Bacillus subtilis* CJMPB957, môi trường thạch đậu tương trypsin (TSA, Difco, Mỹ) chứa 5% máu cừu (Kisan Biotech, Hàn Quốc) được điều chế. Chủng này được cấy vạch trên môi trường thạch máu đã

điều chế và sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Sau đó, kết quả là hiện tượng tiêu máu được khẳng định là không xảy ra như được thể hiện trong FIG.7.

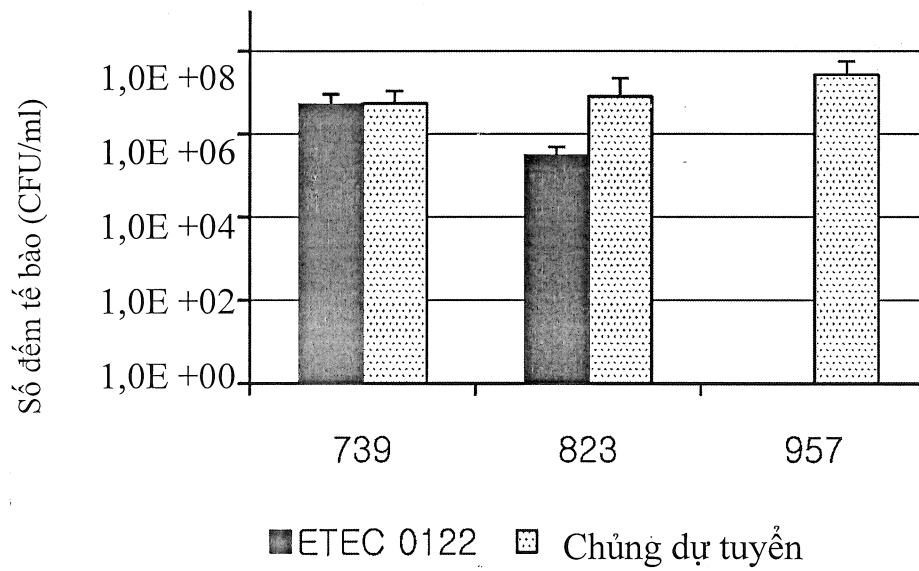
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 có hoạt tính kháng nấm và kháng sinh, có khả năng tổng hợp enzym tiêu hóa phức hợp, có khả năng chịu được axit, và bền với mật, được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM11271P.
2. Sản phẩm nuôi cấy của chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 theo điểm 1.
3. Chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 theo điểm 1 hoặc sản phẩm nuôi cấy của chủng này theo điểm 2.
4. Phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 theo điểm 1 hoặc sản phẩm nuôi cấy của chủng này theo điểm 2 hoặc chế phẩm lợi khuẩn theo điểm 3.
5. Thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* CJMPB957 theo điểm 1, sản phẩm nuôi cấy của chủng này theo điểm 2 hoặc chế phẩm lợi khuẩn theo điểm 3 hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 4.

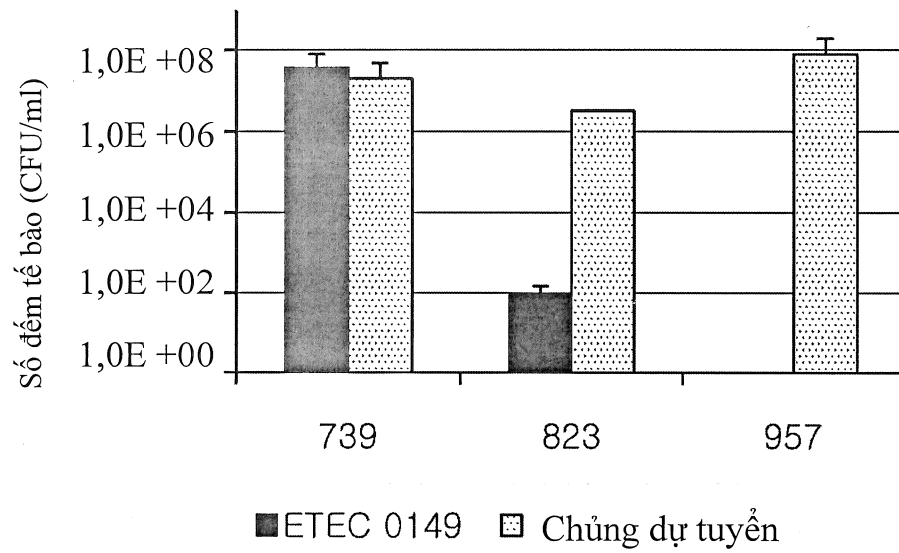
[FIG.1]



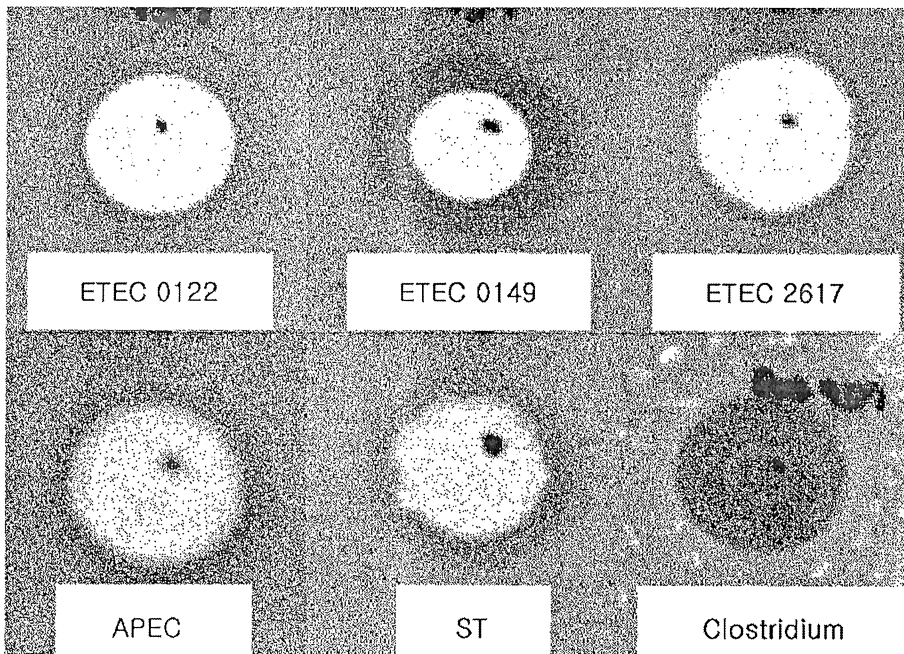
[FIG.2A]



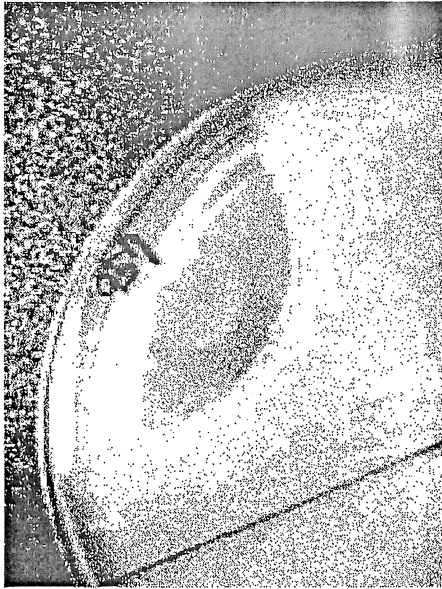
[FIG. 2B]



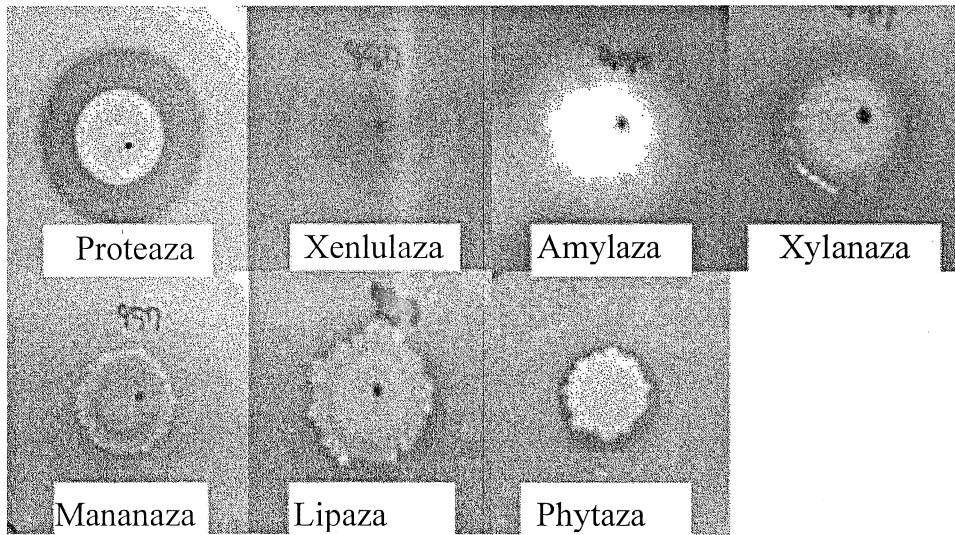
[FIG.3]



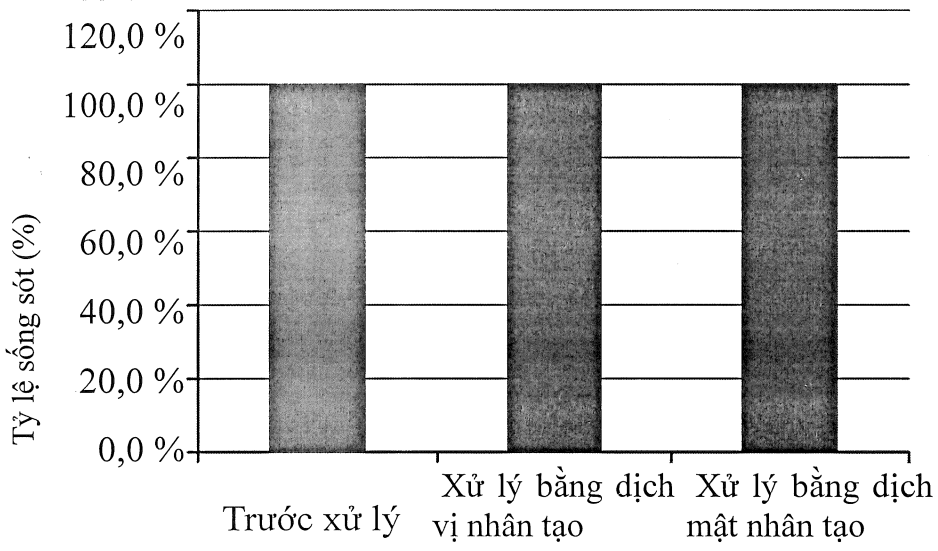
[FIG.4]



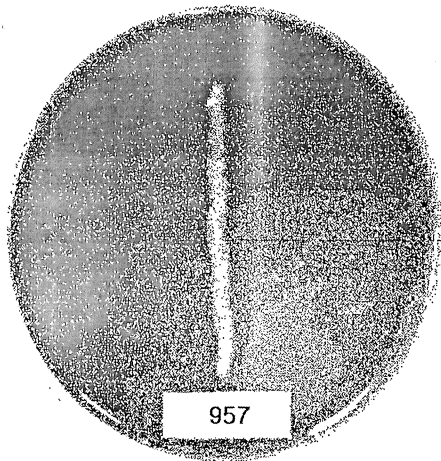
[FIG.5]



[FIG.6]



[FIG.7]



[FIG.8]

SEQ ID NO. 1 :

CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC
GGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTA
CAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAAC
GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCCGTGAAGTGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGC
TCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG
GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGG
TTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGGCACTCCGCCTGGGCGAGTAC
GGGACGGCAAGACTGAAAACCTAAGGAATTGACGGTGGCCCCGCAACAAT