



(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)** (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



2-0002698

(51) **C12P 1/04; A23K 10/18; A23K 10/10; A23K** (13) **Y**
2020.01 10/16

(21) 2-2019-00402 (22) 17/09/2019
(45) 25/09/2021 402 (43) 25/11/2019 380A
(73) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội
(72) Phí Quyết Tiến (VN); Vũ Thị Hạnh Nguyễn (VN); Chu Hoàng Hà (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC ỨNG DỤNG CHO LÊN MEN THỨC
ĂN THÔ XANH VÀ CHẾ PHẨM SINH HỌC THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng cho lên men thức ăn thô xanh, trong đó quy trình này bao gồm các bước (i) nhân giống vi sinh vật các chủng *B. subtilis* VTX16, *B. licheniformis* VTX18, *L. plantarum* LTX28 và *S. cerevisiae* MTX14; (ii) lên men và thu hồi sinh khối; và (iii) tạo chế phẩm sinh học. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến chế phẩm sinh học thu được từ quy trình nêu trên, trong đó chế phẩm này bao gồm sinh khối khô của chủng *B. subtilis* VTX16 (1%), chủng *B. licheniformis* VTX18 (1%), chủng *L. plantarum* LTX28 (2%), chủng *S. cerevisiae* MTX14 (2%), sữa tách béo (4%), cám gạo (30%) và bột ngô (60%).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học sử dụng các chủng giống *Bacillus subtilis* VTX16, *Bacillus licheniformis* VTX18, *Lactobacillus plantarum* LTX28 và *Saccharomyces cerevisiae* MTX14 có đặc tính probiotics ứng dụng lên men thức ăn thô xanh cho lợn an toàn, thân thiện với môi trường và đảm bảo về dinh dưỡng cũng như hiệu quả kinh tế.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Thức ăn dạng lỏng (Liquid Feed) sử dụng trong chăn nuôi lợn theo định nghĩa là dạng thức ăn hỗn hợp của một số loại thành phần dinh dưỡng, các nguyên liệu khô, sinh khối các loại thực vật, các phế phụ phẩm nông nghiệp... được phối trộn với nước theo tỷ lệ như 1:1,5 đến 1:4 (w/v). Nếu hỗn hợp này được ủ trong thời gian đủ dài (có thể bổ sung hoặc không bổ sung vi sinh vật) để thức ăn có thể lên men và đạt được điều kiện ổn định gọi là thức ăn lên men dạng lỏng (Fermented Liquid Feed, FLF). Hiện nay, chăn nuôi lợn bằng thức ăn dạng lỏng, đặc biệt FLF là công nghệ đang được áp dụng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới, nhất là sau khi Châu Âu ban hành lệnh cấm sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi vào năm 2006 (Missotten *et al.*, 2015; Plumed-Ferrer và Von Wright, 2009). Số liệu nghiên cứu cho thấy, sử dụng FLF cho lợn sữa và lợn thịt sẽ không cần bổ sung kháng sinh vào thức ăn chăn nuôi như các mô hình chăn nuôi cổ điển trước đây (Hans, 2002; Hans và Dong, 2006). Ngoài ra, thực nghiệm cho thấy FLF có pH thấp, mật độ vi khuẩn lactic cao, vi sinh vật (VSV) mang chức năng probiotics khác trong đường ruột giúp ức chế các VSV gây bệnh trong thức ăn và VSV sẵn có trong đường ruột của lợn (Bealvà cs., 2003; Brooks và cs., 2003).

Khi trộn nguyên liệu thức ăn chăn nuôi tự nhiên hữu cơ thâm canh năng suất cao (cỏ VA06: 200 - 500 tấn/ha/năm, cỏ ghinê: 100 - 150 tấn/ha/năm, cây ngô: 40-70 tấn/vụ...) với nước, các loại vi khuẩn lactic và nấm men có trong thức ăn sẽ phát triển tạo ra axit lactic, axit acetic, etanol và làm giảm pH của hỗn hợp thức ăn (Canibe và cs., 2012). Quá trình lên men làm giảm pH thức ăn chăn nuôi sẽ đồng thời ức chế sự phát triển của các VSV gây bệnh (Van Winsen và cs., 2001). Ngoài ra, khi hỗn hợp thức ăn có pH thấp cho lợn ăn sẽ giúp giảm pH trong dạ dày của lợn và ngăn ngừa sự phát triển của các VSV gây bệnh như *Coliform*, *Salmonella* trong hệ tiêu hóa (Canibe

và cs., 2012).

Công nghệ xử lý thức ăn thô xanh ở trong nước chủ yếu để chế biến và bảo quản thức ăn chăn nuôi cho gia súc nhai lại, đặc biệt là trâu, bò nhờ công nghệ lên men ủ chua. Gần đây, Viện Chăn nuôi và một số cơ sở chăn nuôi khu vực phía Nam đã thực hiện một số nghiên cứu thăm dò xử lý nguyên liệu rau thô xanh là thân, dây khoai lang bằng công nghệ ủ chua hoặc sử dụng các chế phẩm vi sinh vật hữu hiệu (EM) nhập khẩu. Các kết quả nghiên cứu chứng minh hiệu quả sử dụng chế phẩm thô xanh nhưng chưa xây dựng quy trình xử lý hiệu quả và chưa chủ động nguồn vi sinh vật đặc hiệu cũng như quy trình áp dụng. Ngoài ra, thức ăn sau xử lý không thể bảo quản lâu và quy trình chưa ổn định do tạp nhiễm xuất hiện trong quá trình lên men. Xuất phát từ các luận điểm trên, việc thực hiện quy trình sản xuất chế phẩm sinh học và áp dụng xử lý thức ăn thô xanh thành thức ăn lỏng cho lợn có ý nghĩa thực tế, đáp ứng yêu cầu thực tế của doanh nghiệp và các hộ chăn nuôi.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là lên men sản xuất chế phẩm sinh học từ các chủng giống *Bacillus subtilis* VTX16, *Bacillus licheniformis* VTX18, *Lactobacillus plantarum* LTX28 và *Saccharomyces cerevisiae* MTX14 có đặc tính probiotics ứng dụng chế phẩm trên để xử lý nguyên liệu thô xanh tạo thành thức ăn lên men cho lợn. Giải pháp tận dụng được nguồn nguyên liệu thô xanh sẵn có, nâng cao giá trị dinh dưỡng của nguyên liệu nhờ quá trình lên men, tạo ra thức ăn chất lượng cao, giảm chi phí chăn nuôi, nâng cao chất lượng thịt lợn. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng cho lên men thức ăn thô xanh, quy trình này bao gồm các bước:

- (i) nhân giống vi sinh vật;
- (ii) lên men và thu hồi sinh khối; và
- (iii) tạo chế phẩm sinh học.

Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề xuất đến chế phẩm sinh học thu được từ quy trình nêu trên.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ khối quy trình lên men sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng chế phẩm lên men thức ăn thô xanh.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ 4 chủng vi sinh vật *B. subtilis* VTX16, *B. licheniformis* VTX18, *L. plantarum* LTX28, *S. cerevisiae* MTX14 ứng dụng cho lên men thức ăn thô xanh cho lợn bao gồm các bước:

(i) Nhân giống vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* VTX16, *B. licheniformis* VTX18, *L. plantarum* LTX28, *S. cerevisiae* MTX14 có đặc tính probiotic từ Bộ sưu tập giống vi sinh vật của Phòng Công nghệ lên men – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các chủng vi khuẩn *B. subtilis* VTX16 và *B. licheniformis* VTX18 có khả năng sinh enzym ngoại bào cao (catalaza, xenlulaza, xylanaza, amylaza và proteaza), có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (*Escherichia coli* ATCC 11105, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 và *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), có khả năng chịu muối mật 3%, chịu độ pH thấp.

Từ ống giống các chủng *B. subtilis* VTX16 và *B. licheniformis* VTX18 được giữ trong glyxerin -80°C, giống được lấy ra cho vào hộp đá (30 phút) để cho ống giống rã đông từ từ. Dùng que cấy chuyển một vài mẫu giống sang ống nghiệm môi trường MPA lỏng (thành phần (g/l): cao thịt 3,0; pepton 5,0; NaCl 10,0; nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH 6,5-7,0). Các ống môi trường được cấy giống được nuôi lắc ở 200 vòng/phút ở 30°C trong 18-20 giờ. Các ống giống cho thấy sự phát triển mạnh, thuần khiết (kiểm tra bằng phương pháp soi kính hiển vi) được lựa chọn để cấy chuyển giống. Giống được chuyển với tỷ lệ là 5% sang bình tam giác 500ml chứa 150ml môi trường MPA lỏng đã chuẩn bị trước đó. Các bình đã cấy chuyển giống được nuôi trên máy lắc: 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Theo dõi, quan sát quá trình nhân giống. Kiểm tra khả năng sinh trưởng và độ thuần khiết (soi kính hiển vi). Loại bỏ những bình bị nhiễm, chết và thoái hóa, những bình giống thể hiện sự phát triển chậm hay dịch môi trường đục bất thường. Giống sinh trưởng tốt và không nhiễm được sử dụng để tiếp giống cho bình lên men.

Chủng vi khuẩn *L. plantarum* LTX28 có khả năng sinh axit lactic có hàm lượng cao, có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (*Escherichia coli* ATCC 11105, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 và *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), có khả năng chịu muối mật 3%, chịu độ pH thấp. Từ ống giống chủng *L. plantarum* LTX28 được giữ trong glyxerin -80°C, giống được lấy ra cho vào hộp đá (30 phút) để cho ống giống rã đông từ từ. Dùng que cấy chuyển một vài mẫu giống sang ống nghiệm môi trường MRS lỏng (thành phần (g/l): pepton 10,0; cao thịt 10,0; cao nấm men 8,0; CH₃COONa 5,0; K₂HPO₄ 2,0; glucoza 20,0; triamonium xitrat 2,0; MgSO₄.7H₂O 0,2; MnSO₄.7H₂O 0,2; Tween 80 1ml; nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH 6,0-6,5). Các ống môi trường được cấy giống được nuôi lắc ở 37°C trong 18-20 giờ. Các ống giống cho thấy sự phát triển mạnh, thuần khiết (kiểm tra bằng phương pháp

soi kính hiển vi) được lựa chọn để cấy chuyển giống. Giống được chuyển với tỷ lệ là 5% sang bình tam giác 500ml chứa 150ml môi trường MRS lỏng đã chuẩn bị trước đó. Các bình đã cấy chuyển giống được nuôi trên máy lắc: 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Theo dõi, quan sát quá trình nhân giống. Kiểm tra khả năng sinh trưởng và độ thuần khiết (soi kính hiển vi). Loại bỏ những bình bị nhiễm, chết và thoái hóa, những bình giống thể hiện sự phát triển chậm hay dịch môi trường đục bất thường. Giống sinh trưởng tốt và không nhiễm được sử dụng để tiếp giống cho bình lên men.

Chủng vi khuẩn *S. cerevisiae* MTX14 có khả năng sinh protein đơn bào cao. Từ ống giống chủng *S. cerevisiae* MTX14 được giữ trong glycerin -80°C, giống được lấy ra cho vào hộp đá (30 phút) để cho ống giống rã đông từ từ. Dùng que cấy chuyển một vài mẫu giống sang ống nghiệm môi trường Hansen lỏng (thành phần (g/l): glucoza 50,0; pepton 10,0; KH_2PO_4 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,0; cao nấm men 1,0; nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH 6,0-6,5). Các ống môi trường được cấy giống được nuôi lắc ở 200 vòng/phút ở 30°C trong 48 giờ. Các ống giống cho thấy sự phát triển mạnh, thuần khiết (kiểm tra bằng phương pháp soi kính hiển vi) được lựa chọn để cấy chuyển giống. Giống được chuyển với tỷ lệ là 5% sang bình tam giác 500ml chứa 150ml môi trường Hansen lỏng đã chuẩn bị trước đó. Các bình đã cấy chuyển giống được nuôi trên máy lắc: 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Theo dõi, quan sát quá trình nhân giống. Kiểm tra khả năng sinh trưởng và độ thuần khiết (soi kính hiển vi). Loại bỏ những bình bị nhiễm, chết và thoái hóa, những bình giống thể hiện sự phát triển chậm hay dịch môi trường đục bất thường. Giống sinh trưởng tốt và không nhiễm được sử dụng để tiếp giống cho bình lên men.

(ii) Lên men và thu hồi sinh khối

a) Lên men

Sau khi trải qua quá trình nhân giống, giống đạt được tiêu chuẩn sẽ được chuyển vào môi trường lên men với tỷ lệ 5% (v/v). Khử trùng môi trường nhằm loại bỏ các loại vi sinh vật nhiễm tạp và bào tử vi sinh vật có trong môi trường, tạo điều kiện thuận lợi để các chủng vi khuẩn phát triển.

Các chủng *B. subtilis* VTX16 và *B. licheniformis* VTX18 lên men trên môi trường MTB3 (g/l): khoai tây 250,0; sacaroza 5,0; nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH 6,5-7,0. Chủng *L. plantarum* LTX28 lên men trên môi trường MTL4 (g/l): cà chua 100,0; K_2HPO_4 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; cao nấm men 5,0; nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH 6,0-6,5. Chủng *S. cerevisiae* MTX14 lên men trên môi trường Hansen (g/l): glucoza 50,0; pepton 10,0; KH_2PO_4 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,0; cao nấm men 1,0; nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH 6,0-6,5.

Điều kiện lên men trên hệ thống Bioflo 110 dung tích 10 lít (New Brunswick Scientific-Mỹ) của các chủng *B. subtilis* VTX16, *B. licheniformis* VTX18, độ pH ban đầu 6,5 – 7,0; nhiệt độ 30°C; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; tốc độ thổi khí 0,5 lít khí/ 1 lít môi trường/ 1 phút; dầu phá bọt: bổ sung nếu cần thiết; thời gian lên men: 48 giờ.

Điều kiện lên men trên hệ thống Bioflo 110 dung tích 10 lít (New Brunswick Scientific-Mỹ) của chủng *L. plantarum* LTX28, độ pH ban đầu 6,0 – 6,5; nhiệt độ 37°C; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; tốc độ thổi khí 0,5 lít khí/ 1 lít môi trường/ 1 phút; dầu phá bọt: bổ sung nếu cần thiết; thời gian lên men: 48 giờ.

Điều kiện lên men trên hệ thống Bioflo 110 dung tích 10 lít (New Brunswick Scientific-Mỹ) của chủng *S. cerevisiae* MTX14, độ pH ban đầu 6,0 – 6,5; nhiệt độ 30°C; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; tốc độ thổi khí 0,5 lít khí/ 1 lít môi trường/ 1 phút; dầu phá bọt: bổ sung nếu cần thiết; thời gian lên men: 48 giờ.

(b) Thu hồi sinh khối

Từ 4 bình lên men của 4 chủng sẽ thu được sinh khối riêng rẽ của 4 chủng: *B. subtilis* VTX16, *B. licheniformis* VTX18, *L. plantarum* LTX28 và *S. cerevisiae* MTX14. Sau quá trình lên men, thu toàn bộ dịch lên men và ly tâm với tốc độ 7000 vòng/phút trong 15 phút. Loại bỏ dịch trong, thu sinh khối, sinh khối được rửa loại bỏ các thành phần môi trường với dung dịch NaCl 0,85%, sau đó ly tâm với tốc độ 7000 vòng/phút, loại bỏ dịch trong, thu sinh khối. Sinh khối của 4 chủng được trộn với glyxerin 15% để bảo quản các mô sinh học bị đông. Sinh khối của từng chủng được cho vào từng khay được cho vào máy sấy đông khô. Phương pháp giữ giống lạnh đông dựa trên nguyên tắc ức chế sự phát triển của vi sinh bằng cách đưa chúng vào nhiệt độ lạnh sâu ở -25°C đến -70°C.

(iii) Tạo chế phẩm sinh học

Sinh khối khô các chủng sau sấy đông khô mật độ đạt được là: chủng *B. subtilis* VTX16, *B. licheniformis* VTX18 mỗi chủng đạt mật độ 10^{12} CFU/g. Chủng *L. plantarum* LTX28 đạt mật độ 10^{11} CFU/g. Chủng *S. cerevisiae* MTX14 đạt mật độ 10^{12} CFU/g. Trộn các thành phần của chế phẩm sinh học với tỷ lệ như sau: sinh khối khô của các chủng *B. subtilis* VTX16 (1%), *B. licheniformis* VTX18 (1%), *L. plantarum* LTX28 (2%), *S. cerevisiae* MTX14 (2%), sữa tách béo (4%), cám gạo (30%) và bột ngô (60%). Chế phẩm dạng bột được sấy thường (nhiệt độ 40°C) đến độ ẩm 5-8%. Mật độ sau trộn đạt trên 10^9 CFU/kg. Chế phẩm dạng bột được giữ trong túi nhôm/túi polyetylen, hút chân không, hàn đóng gói và tránh ánh sáng trực tiếp, khối lượng chế phẩm 1kg/1túi. Bảo quản chế phẩm tại các điều kiện: 4°C hoặc nhiệt độ phòng.

Giải pháp hữu ích còn đề cập đến chế phẩm sinh học thu được từ quy trình nêu trên. Chế phẩm này bao gồm sinh khối khô của các chủng *B. subtilis* VTX16 (1%), chủng *B. licheniformis* VTX18 (1%), chủng *L. plantarum* LTX28 (2%), chủng *S. cerevisiae* MTX14 (2%), sữa tách béo (4%), cám gạo (30%) và bột ngô (60%).

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện mà không làm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Sản xuất 1kg chế phẩm sinh học

Các bước nhân giống vi sinh vật các chủng *B. subtilis* VTX16, *B. licheniformis* VTX18, *L. plantarum* LTX28 và *S. cerevisiae* MTX14 và lên men và thu hồi sinh khối các chủng này được thực hiện như trong phần “Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích”. Các công thức phối trộn chế phẩm sinh học dạng bột đã được tuyển chọn cho mỗi chủng *B. subtilis* VTX16, *B. licheniformis* VTX18, *L. plantarum* LTX28, *S. cerevisiae* MTX14 với tỉ lệ sinh khối khô được trộn cho 1kg chế phẩm sinh học là: 10g VTX16: 10g VTX18: 20g LTX28: 20g MTX14. Nhưng vậy công thức phối trộn cho 1kg chế phẩm sinh học và chất mang theo tỷ lệ sau: Sinh khối khô của 4 chủng vi sinh vật (60g); sữa tách béo (40g); cám gạo (300g); bột ngô (600g). Chế phẩm dạng bột được sấy thường (nhiệt độ 40°C) đến độ ẩm 5-8%. Mật độ sau trộn đạt trên 10⁹CFU/kg. Chế phẩm dạng bột được giữ trong túi nhôm/túi polyetylen, hút chân không, hàn đóng gói và tránh ánh sáng trực tiếp, khối lượng chế phẩm 1kg/1túi. Bảo quản chế phẩm tại các điều kiện: 4°C hoặc nhiệt độ phòng.

Ví dụ 2: Phối trộn và lên men thức ăn thô xanh dạng lỏng

Nghiên nguyên liệu cho 100kg thức ăn khô: Chuẩn bị thức ăn bổ sung bao gồm bột ngô, bã bia, khô đỗ tương, bột cá, NaCl, premix được cân riêng từng loại trước với khối lượng: 53,5kg bột ngô, 3,5kg bã bia, 0,1kg khô đỗ tương, 1,0kg bột cá, 0,5kg NaCl, 0,3kg premix.

Cân 35kg cỏ voi 30 ngày và 5,1kg rau muống chuyển vào máy nghiền. Khuấy đều dung dịch chế phẩm sinh học đã chuẩn bị (hòa 1kg chế phẩm sinh học dạng bột với 20 lít nước) chuyển vào máy nghiền. Hỗn hợp thức ăn bổ sung đã chuẩn bị sẵn và chuyển vào máy nghiền. Nghiền hỗn hợp nguyên liệu trong thời gian 20 phút.

Phối trộn nguyên liệu: Từ các bước chuẩn bị nguyên liệu trên đã xác định được một số thông số cơ bản để xây dựng quy trình lên men thức ăn thô xanh:

- Tỷ lệ phối trộn cho 100kg thức ăn khô của các nguyên liệu, thức ăn thô xanh và chế phẩm sinh học theo tỷ lệ sau: bột ngô 53,5kg: bã bia 3,5kg: khô đỗ tương 0,1kg: bột cá: 1kg: NaCl 0,5kg: premix 0,3kg: cỏ voi 30 ngày 35kg: rau muống

5,1kg: chế phẩm sinh học 1,0kg.

- Tỷ lệ nguyên liệu/ nước: 100kg vật chất khô/ 150 lít nước
- Tỷ lệ thức ăn bổ sung/ nguyên liệu thô xanh: 60kg/ 40kg
- Tỷ lệ chế phẩm sinh học/ vật chất khô: 1,0kg/ 100kg

Hỗn hợp nguyên liệu được nghiền trong máy nghiền bổ sung nước vừa đủ được chuyển qua máy trộn ngang, tiến hành trộn trong 20 phút đến khi nguyên liệu thô xanh, thức ăn bổ sung và chế phẩm sinh học được trộn đều thì chuyển vào bể lên men.

Lên men: Hỗn hợp được chuyển vào bể lên men và dùng gậy tán đều sao cho bề mặt nguyên liệu bằng phẳng. Đo độ pH ban đầu của hỗn hợp nguyên liệu khoảng 5,5-6,5 và nhiệt độ bể lên men, đậy kín bể và tiến hành lên men yếm khí trong 3-5 ngày đến khi độ pH của hỗn hợp đạt pH=4,5-5,0, thu được thức ăn thô xanh dạng lỏng có mùi thơm mát và chua ngọt, thì quá trình lên men kết thúc.

Ví dụ 3: Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn chế phẩm sinh học với khẩu phần thức ăn thô xanh

* *Phương pháp phối hợp khẩu phần:* Khẩu phần ăn được phối hợp dựa theo tiêu chuẩn ăn của Việt Nam cho lợn lai và được phối hợp trên phần mềm Formulation. Thành phần và giá trị dinh dưỡng của thức ăn và khẩu phần ăn của lợn thịt được trình bày tại bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1. Thành phần hóa học của các nguyên liệu thức ăn

Nguyên liệu thức ăn	DM	ME	Thành phần hóa học (%DM)					
	(%)	kcal/kg DM	CP	EE	CF	NDF	ADF	Ash
Bột ngô	89,15	3213	8,41	2,72	4,93	35,99	10,88	1,54
Bã bia	23,21	3116	28,06	8,03	14,45	51,36	18,40	4,35
Khô đỗ tương	89,23	3229	33,12	7,54	0,59	2,13	0,82	8,64
Bột cá	90,22	2621	42,28	6,32	2,37	7,66	3,01	26,66
NaCl	92,00							90,10
Premix	92,00							89,00
Cỏ voi 30 ngày	17,91	2077	13,29	2,37	34,72	65,82	36,38	12,87
Rau muống	13,82	2445	26,79	1,32	20,42	30,07	19,72	11,95

Bảng 2. Thành phần nguyên liệu thí nghiệm

ĐVT: kg (tính theo CK)

Nguyên liệu	Tỷ lệ (%)
Bột ngô	53,5
Bã bia	3,5

Khô đỗ tương	0,1
Bột cá	1,0
NaCl	0,5
Premix	0,3
Chế phẩm sinh học	0,5-1,5
Cỏ voi 30 ngày	35,0
Rau muống	5,1

* *Phương pháp lên men thức ăn*: Thức ăn xanh (rau muống, cỏ voi 30 ngày) được lấy về, rửa sạch và nghiền nát bằng máy nghiền thức ăn 3A. Trong quá trình nghiền đồng thời thêm bột ngô, cám gạo, khô đậu tương, bột cá, NaCl, premix, chế phẩm sinh học bao gồm các chủng *B. subtilis* VTX16, *B. licheniformis* VTX18, *L. plantarum* LTX28, *S. cerevisiae* MTX14 và nước. Các nguyên liệu đều được nghiền nát và trộn đều. Mỗi công thức thức ăn được thử ở ba mức bổ sung khác nhau (0,5%; 1,0% và 1,5%) chế phẩm sinh học tính theo vật chất khô. Thức ăn lên men được chứa trong thùng có nắp đậy kín xung quanh để đảm bảo cho quá trình lên men yếm khí.

Thức ăn lên men được chứa trong bình 5kg có nắp đậy kín xung quanh để đảm bảo cho quá trình lên men yếm khí. Mỗi công thức thức ăn sẽ được ủ với số lượng như sau: 1 công thức x 3 lần lặp x 2 mốc thời gian (0 giờ, 120 giờ) = 6 bình. Sau các khoảng thời gian 0, 120 giờ, các thức ăn ủ được lấy mẫu để phân tích thành phần hóa học đánh giá chất lượng thức ăn và xác định tỷ lệ men bổ sung thích hợp.

* *Phương pháp lấy mẫu và phân tích chất khô*: Phương pháp lấy mẫu theo tiêu chuẩn Việt Nam năm 2007 (TCVN 4325 – 2007). Lấy mẫu tại thời điểm 0 giờ và 120 giờ sau khi lên men. Thức ăn được khuấy đều trong các thùng lên men, sau đó lấy mẫu đại diện và tiến hành phân tích chất khô theo TCVN-4326-2001.

* *Các chỉ tiêu phân tích*: Mẫu thức ăn cho ăn, mẫu thức ăn thừa được phân tích chất khô (DM), chất hữu cơ (OM), protein thô (CP), xơ thô (CF), mỡ thô (EE) và tro (Ash) được phân tích theo các tiêu chuẩn tương ứng TCVN-4326-2001, TCVN-4328-2007, TCVN-4329-2007, TCVN-4331-2001 và TCVN-4327-2007. Các thành phần xơ trung tính NDF và xơ axit ADF được xác định theo phương pháp của Van Soest và cs. (1991). Giá trị GE, DE và ME được ước tính theo NRC (1998) ($GE = 4,143 + (56\%EE) + (15\%CP) - (44\%Ash)$, $R^2 = 0,98$; $DE = 949 + (0,789*GE) - (43\%Ash) - (41\%NDF)$, $R^2 = 0,91$; $ME = DE * (1,012 - (0,0019\%CP))$, $R^2 = 0,91$).

Số liệu được xử lý bằng phần mềm minitab 14.0.

Bảng 3. Giá trị dinh dưỡng của khẩu phần ăn cho lợn sau 120 giờ lên men với các tỷ lệ phối trộn chế phẩm sinh học khác nhau

Thành phần dinh dưỡng	Thời điểm 0 giờ	Mức bổ sung chế phẩm sinh học (%CK)			SEM	P-value
		0,5%	1,0%	1,5%		
NL trao đổi (<i>ME, kcal/kg DM</i>)	2800	2831	2972	3006	66,75	<0,001
Protein (<i>CP, %DM</i>)	14,00	14,86	15,32	15,48	0,48	<0,001
Mỡ thô(<i>EE, %DM</i>)	3,28	3,62	3,55	3,57	0,07	<0,001
Xơ thô(<i>CF, %DM</i>)	15,44	15,29	14,39	13,88	0,34	<0,001
Xơ trung tính (<i>NDF, %DM</i>)	44,32	31,88	28,73	28,24	1,60	<0,001
Xơ axit (<i>ADF, %DM</i>)	19,21	18,78	18,31	17,22	0,57	<0,001
Khoáng tổng số (<i>Ash, %DM</i>)	6,49	6,54	6,45	6,52	0,13	>0,001
Độ pH	6,50	6,10	5,80	5,60	0,06	<0,001

Sau khi nghiền và trộn đều các nguyên liệu theo tỷ lệ ở bảng 3, mẫu thức ăn ở 2 thời điểm khác nhau: 0, 120 giờ. Kết quả cho thấy, so với thời điểm trước khi ủ sau 120 giờ lên men khẩu phần cho lợn ở các tỷ lệ chế phẩm sinh học khác nhau đều có sự thay đổi theo hướng cải thiện về giá trị dinh dưỡng và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các mức bổ sung khác nhau về các chỉ tiêu dinh dưỡng được khảo sát ở mức $P < 0,001$.

Năng lượng trao đổi ở 0 giờ là 2800kcal/kg DM, sau 120 giờ lên men ở mức bổ sung 0,5%, 1,0% và 1,5% năng lượng lần lượt đạt ở mức 2831; 2972 và 3006kcal/kg DM. Protein thô ở 0 giờ là 14% DM, sau 120 giờ lên men ở mức bổ sung 0,5%, 1,0% và 1,5% đã tăng lên và lần lượt đạt ở mức 14,86; 15,32 và 15,48% DM. Tương tự mỡ thô ở 0 giờ là 3,28% DM, sau 120 giờ lên men ở mức bổ sung 0,5%, 1,0% và 1,5% đã tăng lên và lần lượt đạt ở mức 3,62; 3,55 và 3,57% DM. Sự khác biệt giữa hai thời điểm có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,001$. Như vậy, trong ba mức bổ sung chế phẩm, sử dụng chế phẩm ở mức 1% tính theo vật chất khô lên men các khẩu phần ăn cho lợn có khả năng cải thiện các giá trị dinh dưỡng rõ nhất.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình tạo chế phẩm sinh học cho lên men thức ăn thô xanh dạng lỏng theo giải pháp hữu ích giúp giá trị dinh dưỡng của thức ăn lên men được tăng lên sau các thời điểm lên men: CP, ME tăng qua các thời điểm 120 giờ; xơ NDF giảm, đặc biệt trong quá trình lên men vi sinh vật sẽ phân giải xơ thành các chất dễ tiêu hóa, Làm giảm tỷ lệ xơ khó tiêu trong các nguyên liệu thức ăn từ đó tăng tỷ lệ tiêu hóa của thức ăn. Đây là giải pháp tốt với các loại thức ăn có giá trị dinh dưỡng hạn chế hoặc không

cân bằng hoặc chứa nhiều xơ khó tiêu hóa. Có rất nhiều lợi thế của việc sử dụng hệ thống cho ăn lỏng so với cho ăn khô trong nuôi lợn. Bao gồm cải thiện việc sử dụng chất dinh dưỡng, sự linh hoạt và kiểm soát các chương trình cho ăn, sử dụng các phụ phẩm lỏng rẻ tiền, giảm tác động môi trường và cải thiện hoạt động của động vật. Việc cho ăn lỏng cũng có thể làm tăng sức khỏe ruột, giảm nhu cầu sử dụng thuốc cho thức ăn và cải thiện phúc lợi vật nuôi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng cho lên men thức ăn thô xanh, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) nhân giống vi sinh vật

nhân giống các chủng *B. subtilis* VTX16 và *B. licheniformis* VTX18 trong môi trường MPA lỏng, nuôi lắc ở 200 vòng/phút ở 30°C trong 18-20 giờ, chuyển giống với tỷ lệ là 5% sang bình tam giác 500ml chứa 150ml môi trường MPA lỏng đã chuẩn bị trước đó, nuôi trên máy lắc: 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ, giống sinh trưởng tốt và không nhiễm được sử dụng để tiếp giống cho bình lên men;

nhân giống chủng *L. plantarum* LTX28 trong môi trường MRS lỏng, nuôi lắc ở 200 vòng/phút ở 37°C trong 18-20 giờ, chuyển giống với tỷ lệ là 5% sang bình tam giác 500ml chứa 150ml môi trường MRS lỏng đã chuẩn bị trước đó, nuôi trên máy lắc: 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ, giống sinh trưởng tốt và không nhiễm được sử dụng để tiếp giống cho bình lên men;

nhân giống chủng *S. cerevisiae* MTX14 trong môi trường Hansen lỏng, nuôi lắc ở 200 vòng/phút ở 30°C trong 48 giờ, chuyển giống với tỷ lệ là 5% sang bình tam giác 500ml chứa 150ml môi trường Hansen lỏng đã chuẩn bị trước đó, nuôi trên máy lắc: 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ, giống sinh trưởng tốt và không nhiễm được sử dụng để tiếp giống cho bình lên men;

(ii) lên men và thu hồi sinh khối

(a) lên men

lên men các chủng *B. subtilis* VTX16 và *B. licheniformis* VTX18 trên môi trường MTB3 (g/l): khoai tây 250,0; sacaroza 5,0; nước cất vừa đủ 1000ml; trong điều kiện lên men trên hệ thống Bioflo 110 dung tích 10 lít là: độ pH ban đầu 6,5– 7,0; nhiệt độ 30°C; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; tốc độ thổi khí 0,5 lít khí/1 lít môi trường/1 phút; dầu phá bọt: bổ sung nếu cần thiết; thời gian lên men: 48 giờ;

lên men chủng *L. plantarum* LTX28 trên môi trường MTL4 (g/l): cà chua 100,0; K₂HPO₄ 1,0; MgSO₄.7H₂O 0,5; cao nấm men 5,0; nước cất vừa đủ 1000ml; trong điều kiện lên men trên hệ thống Bioflo 110 dung tích 10 lít là: độ pH ban đầu 6,0– 6,5; nhiệt độ 37°C; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; tốc độ thổi khí 0,5 lít khí/1 lít môi trường/1 phút; dầu phá bọt: bổ sung nếu cần thiết; thời gian lên men: 48 giờ;

lên men chủng *S. cerevisiae* MTX14 trên môi trường Hansen; trong điều kiện lên men trên hệ thống Bioflo 110 dung tích 10 lít là: độ pH ban đầu 6,0 – 6,5; nhiệt độ 30°C; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; tốc độ thổi khí 0,5 lít khí/ 1 lít môi trường/ 1 phút;

dầu phá bọt: bổ sung nếu cần thiết; thời gian lên men: 48 giờ;

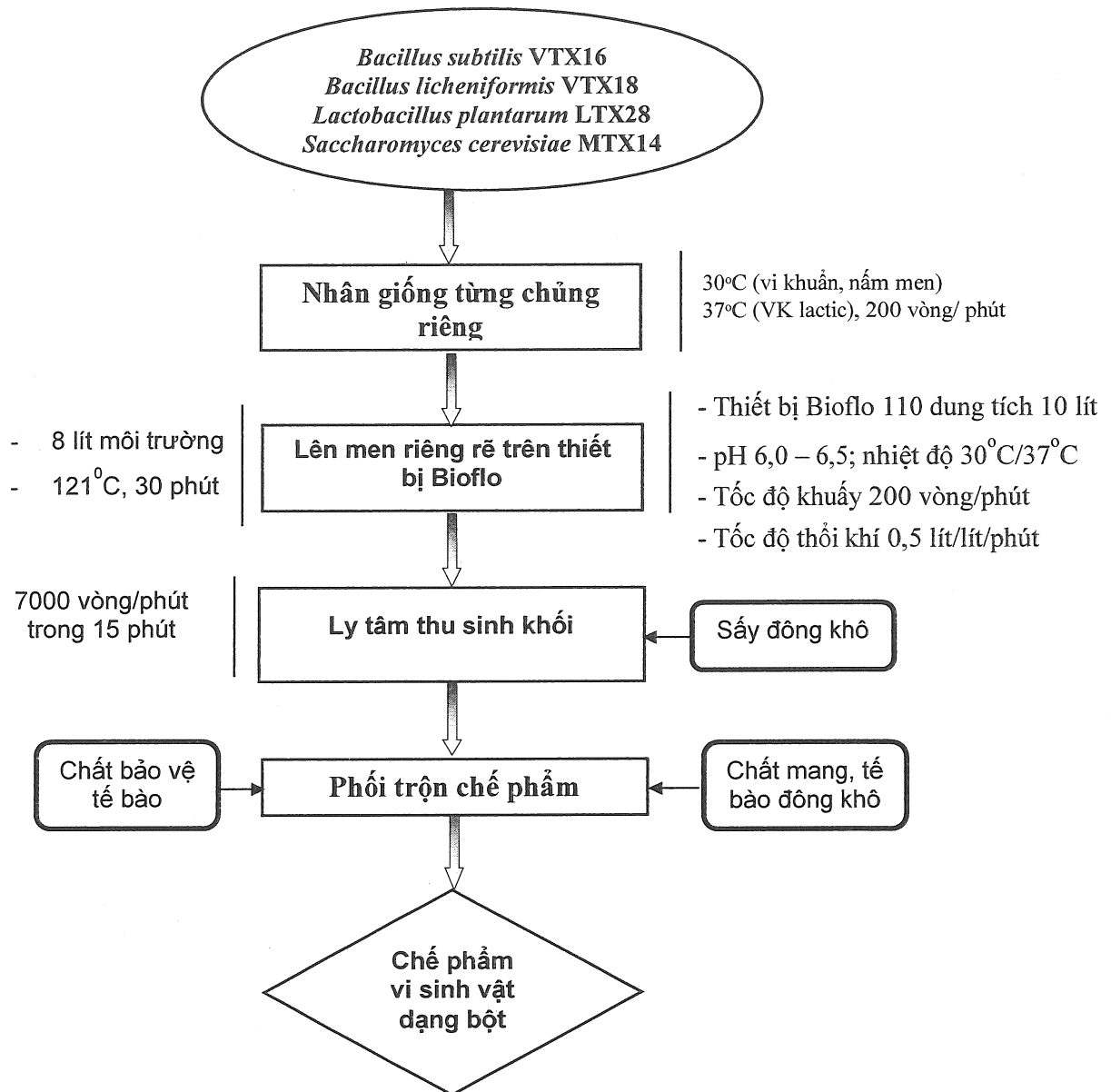
(b) thu hồi sinh khối

thu riêng rẽ toàn bộ dịch lên men của 4 chủng *B. subtilis* VTX16, *B. licheniformis* VTX18, *L. plantarum* LTX28 và *S. cerevisiae* MTX14 và ly tâm với tốc độ 7000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ dịch trong, thu sinh khối, rửa sinh khối loại bỏ các thành phần môi trường với dung dịch NaCl 0,85%, ly tâm với tốc độ 7000 vòng/phút, loại bỏ dịch trong, thu sinh khối, trộn với glyxerin 15% để bảo quản các mô sinh học bị đông, sau đó đem sấy đông khô; và

(iii) tạo chế phẩm sinh học

trộn các thành phần của chế phẩm sinh học với tỷ lệ như sau: sinh khối khô của các chủng *B. subtilis* VTX16 (1%), *B. licheniformis* VTX18 (1%), *L. plantarum* LTX28 (2%), *S. cerevisiae* MTX14 (2%), sữa tách béo (4%), cám gạo (30%) và bột ngô (60%), sấy ở nhiệt độ 40°C đến độ ẩm 5-8%, mật độ sau trộn đạt trên 10⁹CFU/kg, giữ chế phẩm dạng bột trong túi nhôm/túi polyetylen, hút chân không, hàn đóng gói và tránh ánh sáng trực tiếp, khối lượng chế phẩm 1kg/1túi, bảo quản chế phẩm tại các điều kiện: 4°C hoặc nhiệt độ phòng.

2. Chế phẩm sinh học thu được từ quy trình nêu trong điểm 1, trong đó chế phẩm này bao gồm sinh khối khô của các chủng *B. subtilis* VTX16 (1%), chủng *B. licheniformis* VTX18 (1%), chủng *L. plantarum* LTX28 (2%), chủng *S. cerevisiae* MTX14 (2%), sữa tách béo (4%), cám gạo (30%) và bột ngô (60%).



Hình 1.