



(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)



1-0032621

(51)⁷ C12N 1/00

(13) B

(21) 1-2019-00801

(22) 19/02/2019

(30) 1-2018-04391 05/10/2018 VN

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/04/2019 373A

(76) Lê Quang Thành (VN)

R03-06-02 Royal City, 72A đường Nguyễn Trãi, phường Thượng Đình, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT SINH KHỐI PROBIOTIC NẤM MEN TỪ SẮN
NGUYÊN LIỆU VÀ RỈ MẬT ĐƯỜNG

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sinh khối probiotic nấm men, trong đó quy trình theo sáng chế lên men chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong môi trường từ sản nguyên liệu và mật rỉ đường. Bằng kỹ thuật lên men tiếp diễn nồng độ liên tiếp 7 cấp và cấp khí mạnh, quy trình theo sáng chế cho phép sản xuất sinh khối probiotic nấm men với hiệu suất cao, giảm được sự hình thành etanol ức chế sự phát triển sinh khối.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh và công nghệ lên men, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sinh khối probiotic nấm men bằng kỹ thuật lên men tiếp dần nồng độ. Sản phẩm sinh khối probiotic nấm men theo sáng chế hữu dụng để bổ sung cho thức ăn chăn nuôi, như thay thế kháng sinh, tạo ra thực phẩm sạch và an toàn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) ngày 15/02/2018 về tình hình kháng thuốc kháng sinh, tình trạng kháng chất kháng sinh (Antimicrobial resistance-AMR) ngày càng phổ biến dẫn đến những thách thức to lớn về hiệu quả phòng ngừa và điều trị một loạt các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn, ký sinh trùng, virus và nấm (xem tại <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>). Trong năm 2016, trên thế giới có 490.000 trường hợp khởi phát bệnh lao kháng đa kháng sinh.

Theo James McIntosh, những biến đổi của bản thân vi sinh vật và do tình trạng lạm dụng kháng sinh của con người là hai nguyên nhân chính dẫn đến tình trạng kháng chất kháng sinh (xem: “Antibiotic resistance: What you need to know”, Medical News Today, 04/10/2018, <https://www.medicalnewstoday.com>). Cụ thể là, theo thời gian, sẽ đến thời điểm các chất kháng sinh đã biết không còn hiệu quả kháng vi sinh vật đích. Điều này chủ yếu là do những biến đổi xảy ra trong chính các vi sinh vật bao gồm đột biến, áp lực chọn lọc, trao đổi gen kháng chất kháng

sinh từ các vi sinh vật khác và thay đổi kiểu hình. Vi khuẩn có thể thay đổi một số đặc điểm của chúng để trở nên tự kháng với các tác nhân kháng khuẩn thông thường. Bên cạnh đó, việc lạm dụng kháng sinh của con người cũng như không tuân thủ các khuyến nghị về liều lượng, cách thức sử dụng kháng sinh làm đẩy nhanh tốc độ biến đổi của vi sinh vật. Việc sử dụng chất kháng sinh liều cao trong nông nghiệp là một trong những ví dụ điển hình của việc lạm dụng kháng sinh. Hiện nay, tại nhiều quốc gia trên thế giới trong đó có Việt Nam, tình trạng bán thuốc kháng sinh không theo đơn hay trộn thuốc kháng sinh vào thức ăn cho gia súc, gia cầm, thủy sản mà không được giám sát về chuyên môn để trị bệnh, phòng bệnh, kích thích tăng trưởng trong chăn nuôi ngày càng phổ biến. Hệ quả là đa số các sản phẩm thịt chứa lượng kháng sinh tồn dư cao hơn mức cho phép gấp nhiều lần và việc sử dụng thực phẩm này làm gia tăng nguy cơ kháng kháng sinh cũng như gây nhiều bất lợi khác cho cơ thể con người.

Đã có một số giải pháp được đề ra nhằm khắc phục tình trạng kháng chất kháng sinh trong ngành chăn nuôi và thú y. Một trong số đó là bổ sung các sinh khối probiotic, prebiotic cho vật nuôi để tăng cường sức đề kháng, phòng và loại trừ dần các loại vi sinh vật gây bệnh nhằm thay thế, hạn chế sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi. Một số loài vi khuẩn, nấm men đã được biết đến trong lĩnh vực về chức năng probiotic có thể kể đến bao gồm *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus*, và *Kluyvermyces marxianus*. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* cho thấy nhiều đặc tính hữu ích để sản xuất probiotic và có nhiều chủng

Saccharomyces cerevisiae đang được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp sản xuất probiotic.

Saccharomyces cerevisiae có thể sử dụng một số cơ chất như đường, mạch nha, đường, tuy nhiên không thể sử dụng trực tiếp tinh bột, xenluloza, hemixenluloza, chúng phát triển tối ưu ở nhiệt độ trong khoảng từ 28 đến 30°C và sinh trưởng, phát triển trong môi trường giàu glucoza. Trong điều kiện môi trường oxy bão hoà, khả năng tăng sinh khối gấp đôi sau từ 60 đến 80 phút nuôi cấy. Chủng *Saccharomyces cerevisiae* chịu nhiệt, tế bào nấm men sống tốt và ổn định ở ruột non, dạ cỏ. *Saccharomyces cerevisiae* được sử dụng như probiotic tạo sự ổn định hệ vi sinh vật đường ruột, tăng cường khả năng tiêu hóa thức ăn và đã được chứng minh có hiệu quả trên 12 loài động vật khác nhau. Đã có nghiên cứu chỉ ra rằng, *Saccharomyces cerevisiae* làm tăng sản lượng sữa ở bò lên 3 lít/ngày, có điểm tiết sữa sớm và cao hơn, kéo dài thời gian cho sữa, hàm lượng đạm trong sữa tăng 4,3%, chất béo tăng 9,8%. Đối với lợn, khả năng tăng sản lượng thịt, sữa và chất lượng được cải thiện. *Saccharomyces cerevisiae* có vai trò cải thiện hệ miễn dịch, giảm bệnh viêm móng, viêm bàn chân, cải thiện sức khỏe, cải thiện hấp thu thức ăn. Trong sinh khối *Saccharomyces cerevisiae* chứa β -glucan với hàm lượng cao, giúp tăng cường miễn dịch, tăng cường hoạt động của các đại thực bào và kích thích tăng tiết nhiều xytokin. β -glucan còn giúp giảm hệ số chuyển đổi thức ăn, kích thích tiêu hoá, phòng các bệnh đường ruột, nhiễm trùng do vi khuẩn, virus.

Mặc dù các chủng *Saccharomyces cerevisiae* hiện đã được sử dụng trong lĩnh vực probiotic đạt được các tiêu chí để sản xuất probiotic cho người và vật nuôi, tuy nhiên, vẫn cần cải tiến để nhằm nâng cao hiệu quả sản xuất probiotic do nhu cầu

thay thế, hạn chế kháng sinh nhờ probiotic ở vật nuôi ngày càng tăng cao. Theo báo cáo của Cục chăn nuôi Việt Nam năm 2017, tổng sản lượng thức ăn chăn nuôi tiêu thụ là 22 triệu tấn, tương đương với 10 tỷ USD/năm và để thay thế kháng sinh trong tương lai, cần đầu tư thêm 20% chi phí chăn nuôi cho probiotic, tương đương với 2 tỷ USD hàng năm. Nguồn cung cấp probiotic đang lưu hành tại Việt Nam phần lớn là nhập khẩu từ Trung Quốc và các nước châu Âu.

Hơn nữa, dù đã có một số nghiên cứu được tiến hành để tối ưu hóa việc sản xuất sinh khối *Saccharomyces cerevisiae* bằng các loại môi trường khác nhau trong bình lắc và sử dụng các thông số nuôi khác nhau trong thiết bị lên men, ví dụ, thiết bị lên men theo mẻ, hoặc lên men liên tục nhằm tối ưu hóa quá trình tạo sinh khối *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* và những vi khuẩn probiotic khác, tuy nhiên vẫn khó sản xuất chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trên quy mô công nghiệp. Thứ nhất, khi sản xuất trên quy mô lớn, hiệu suất sinh khối thấp do khó kiểm soát hàm lượng oxy, các cơ chất cần được sử dụng trong quá trình lên men và thường tạo ra etanol ức chế ngược lại sự phát triển của vi sinh vật. Thứ hai, các tế bào nấm men rất nhạy cảm với việc gia tăng nhiệt độ và đặc biệt là nhiệt độ cao khi sấy khô, do đó, quá trình để thu được sinh khối probiotic nấm men thành phẩm yêu cầu thực hiện đông khô chi phí cao thay vì sấy phun thông thường. Thứ ba, khi vận hành trên quy mô công nghiệp, việc đảm bảo tiệt trùng cho các thiết bị nuôi, môi trường nuôi cấy cũng gặp phải nhiều khó khăn.

Do đó, tồn tại nhu cầu đối với quy trình sản xuất probiotic nấm men từ chủng nấm men *S. cerevisiae* cải tiến giải quyết được các vấn đề nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế đề xuất quy trình sản xuất probiotic nấm men *Saccharomyces cerevisiae* bằng kỹ thuật lên men tiếp diễn nồng độ có kiểm soát môi trường và nồng độ oxy, tăng hiệu suất sản xuất sinh khối nấm men và chất lượng probiotic, giảm được lượng etanol gây ức chế sự phát triển của nấm men trong quá trình sản xuất.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sinh khối probiotic nấm men từ sản nguyên liệu và rỉ mật đường, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) dịch hóa sản nguyên liệu:

xử lý nguyên liệu bằng cách làm sạch củ sản nguyên liệu và nghiền ướt thu được hỗn hợp nguyên liệu có hàm lượng tinh bột nằm trong khoảng từ 20 đến 25%;

phân cắt tinh bột bằng cách gia nhiệt hỗn hợp nguyên liệu đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 100°C để hồ hóa nguyên liệu, điều chỉnh pH đến khoảng từ 4 đến 6, sau đó bổ sung enzym α -amylaza với lượng từ 0,01 đến 0,03% theo hàm lượng tinh bột, duy trì điều kiện trong khoảng thời gian từ 2 đến 3 giờ để enzym phân cắt tinh bột thu được dịch sản nguyên liệu;

b) thu dịch đường từ dịch sản nguyên liệu:

đường hóa dịch sản nguyên liệu bằng cách hạ nhiệt độ dịch sản nguyên liệu đến khoảng từ 60 đến 70°C, tiếp đó bổ sung một lượng 0,65% enzym α -glucoamylaza theo lượng tinh bột trong dịch sản nguyên liệu, điều chỉnh pH đến khoảng từ 4 đến 6 để enzym phân cắt tinh bột thành đường glucoza;

thu dịch đường bằng cách lọc bỏ phần cặn, thu được dịch đường glucoza; và

c) sản xuất sinh khối probiotic nấm men:

nhân giống chủng giống gốc bằng cách bổ sung 1mL chủng nấm men giống gốc *Saccharomyces cerevisiae* vào môi trường YPG (yeast-peptone-glucose) bao gồm 10g/L dịch chiết nấm men, 20g/L pepton và 20g/L glucoza, nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ khoảng 30°C và pH khoảng 5,5 qua ba lần cấy chuyển để thu được tương ứng là 100mL, 250mL và 3L dịch môi trường giống gốc tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có mật độ khoảng 10^8 tế bào/mL;

chuẩn bị môi trường lên men thu sinh khối *Saccharomyces cerevisiae* bằng cách pha dịch đường glucoza thu được từ bước (b) với rỉ mật theo tỷ lệ 1:1 tính theo hàm lượng đường, sau đó bổ sung nước cất để thu được các dung dịch có lượng đường tổng lần lượt là 70g/L, 78g/L, 78g/L, 120g/L, 140 g/L, 160 g/L và 160 g/L, tiếp đó bổ sung khoáng chất đến nồng độ cuối tính theo % trọng lượng bao gồm: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ khoảng 20%; $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ khoảng 1,81%; $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ khoảng 2,32%; KH_2PO_4 khoảng 3,45%, thu được bảy môi trường lên men, tương ứng;

lên men tiếp dần nồng độ bằng cách bổ sung 3L dịch chứa giống gốc tế bào nấm men vào thiết bị lên men và lần lượt tiếp dần nồng độ để lên men liên tiếp bảy cấp trong điều kiện nhiệt độ được duy trì khoảng 30°C, pH khoảng 5,5, hiệu khí với lượng khí cấp là 1m^3 không khí/ m^3 môi trường lên men/phút, trong đó:

lên men cấp 1: bổ sung vào thiết bị lên men 30 lít môi trường lên men có nồng độ đường tổng 70 g/L, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu dịch lên men cấp 1;

lên men cấp 2: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 1 môi trường lên men có nồng độ đường tổng 78 g/L đến thể tích 300 lít, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 2;

lên men cấp 3: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 2 môi trường có nồng độ đường tổng 78 g/L đến thể tích 1500 lít, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 3;

lên men cấp 4: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 3 môi trường có nồng độ đường tổng 120 g/L đến thể tích 7500 lít, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 4;

lên men cấp 5: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 4 môi trường lên men có nồng độ đường tổng 140 g/L đến thể tích 15000 lít, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L thu được dịch lên men cấp 5, chuyển 87,5% lượng dịch lên men cấp 5 sang bồn chứa thành phẩm, phần dịch còn lại được tiếp tục quá trình lên men;

lên men cấp 6: bổ sung vào phần dịch lên men cấp 5 còn lại trong thiết bị lên men một lượng môi trường lên men có nồng độ đường tổng 160 g/L đến thể tích 7500L, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 6; và

lên men cấp 7: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 6 môi trường lên men có nồng độ đường 160 g/L đến thể tích 15000 lít, duy trì điều kiện lên men đến khi

hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 5g/L, thu được dịch lên men cấp 7, phần dịch này được chuyển sang bồn chứa thành phẩm; trong đó, các công đoạn lên men cấp 4 đến lên men cấp 7 được thực hiện trong cùng một bồn lên men và dung dịch lên men cuối cùng có trong bồn chứa thành phẩm có mật độ tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đạt ít nhất 2×10^9 CFU/mL; và

d) thu sinh khối probiotic nấm men bằng cách hạ nhiệt độ dịch trong bồn chứa thành phẩm đến khoảng từ 18 đến 22°C, sau khi loại bỏ phần dịch, nấm men đạt độ ẩm khoảng từ 54 đến 70%, tiến hành sấy khô sinh khối ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 45°C đến hàm ẩm nằm trong khoảng từ 6 đến 10% thu được sinh khối probiotic nấm men thành phẩm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết thông qua phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên các phương án thực hiện này chỉ nhằm mục đích minh họa cho bản chất của sáng chế chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế. Theo đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án cụ thể này.

Theo đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn dựa trên phần mô tả này có thể thực hiện các biến đổi và/hoặc cải biến mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

Theo sáng chế, thuật ngữ “khoảng” đứng trước các giá trị số bao gồm chính giá trị số đó cũng như giá trị số nằm trong phạm vi -20% đến +20%, tốt hơn là -15% đến +15%, tốt hơn nữa là -10% đến +10%, và tốt nhất là -5% đến +5% của giá trị số

đó. Ví dụ, “pH khoảng 5,5” thì phạm vi bao hàm các giá trị từ 4,4 đến 6,6 chứ không chỉ riêng pH=5,5.

Theo sáng chế, enzym α -amylaza (mã EC3.2.1.3) được sử dụng là enzym thủy phân liên kết 1,4- α -glucosit trong polysacarit để tạo ra dextrin, oligosacarit và glucoza.

Theo sáng chế, enzym α -glucoamylaza là enzym thủy phân cả 1,4- và 1,6- α -glucosit từ đầu không khử của tinh bột, và các oligo liên quan, trong polysacarit tạo ra đường glucoza. Một đơn vị hoạt tính của α -glucoamylaza được xác định là lượng enzym cần thiết để giải phóng 1 μ mol glucoza/phút. Nồng độ enzym thường được sử dụng ở lượng 0,12% so với lượng tinh bột cần đường hóa. Các loại enzym α -amylaza và α -glucoamylaza đều là các enzym được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này và được cung cấp bởi các nhà cung cấp ngoài thị trường.

Theo sáng chế, khi đề cập đến việc điều chỉnh pH được hiểu là sử dụng chất điều chỉnh pH được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch H_2SO_4 , NaOH ở nồng độ khoảng 20% và tổ hợp của chúng để đạt được độ pH thích hợp.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sinh khối probiotic nấm men, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) dịch hóa sản nguyên liệu; b) thu dịch đường từ dịch sản nguyên liệu; c) sản xuất sinh khối probiotic nấm men; và d) thu sinh khối probiotic nấm men.

Trong bước dịch hóa sản nguyên liệu, nguyên liệu được sử dụng là củ sắn, bước này bao gồm các công đoạn xử lý nguyên liệu và phân cắt tinh bột.

Được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, các chủng nấm men có thể sử dụng cơ chất từ nhiều nguồn năng khác nhau bao gồm

nguồn năng lượng cao chất thải, phụ phẩm từ các quá trình sản xuất; rỉ mật; đường hoặc tổ hợp của chúng.

Nguồn năng lượng cao như khí metan, metanol, C₁₂-C₂₀ alkan (dạng sáp) và dầu đã được sử dụng để sản xuất sinh khối protein đơn bào (single cell protein -SCP) cho các chủng nấm men *Candida lipolytica* và *C. tropicalis*. Tuy nhiên, vì vấn đề độc tính nên SCP không thích hợp để sản xuất probiotic. Chủng *Methylomonas methanica* sử dụng metan và nguồn N (muối nitrat, muối amoni) làm cơ chất để sản xuất SCP, công nghệ này gặp nhiều khó khăn. Chủng *M. methylotrophus* sử dụng metanol để sản xuất SCP cho hiệu quả hơn, ví dụ, tại Anh, metanol có nhiều ưu thế vượt trội hơn n-parafin, metan và các loại cacbon hydrat khác, không gây ra vấn đề về độc tính.

Nguồn chất thải từ các quá trình sản xuất (ví dụ, xenluloza, lignin, hemixenluloza, tinh bột, v.v.) để sản xuất SCP cũng đã được nghiên cứu như một giải pháp xử lý chất thải môi trường. Việc sử dụng nguồn nguyên liệu củ sắn cho phép thu được môi trường nuôi cấy an toàn, dễ xử lý và dễ kiểm.

Rỉ mật, hay còn gọi là rỉ đường, có thành phần dinh dưỡng (tính theo % khối lượng): Tổng lượng đường: 48 - 56, chất hữu cơ khác: 9 - 12, protein: 2 - 4, K: 1,5 - 5, Ca: 0,4 - 0,8, Mg: 0,06, P: 0,6 - 2 cũng là một trong những nguồn cơ chất phổ biến của lên men sinh khối nấm men. Rỉ mật còn chứa (mg/kg): Biotin (vitamin H): 1 - 3, vitamin khác (thiamin, riboflavin, pyridoxin, axit folic, biotin), axit pantothenic: 15 - 55, Inositol: 2500 - 6000, và các nguyên tố vi lượng gồm Zn, Mn, Cu, B, Co và Mo. Vitamin H (biotin) kích thích sinh trưởng đối với phần lớn nấm men (White, 1954). Rỉ mật là cơ chất tốt cho lên men vi sinh vật để tạo ra các sản

phẩm có giá trị. Theo một nghiên cứu của Oura, cứ 100kg nguyên liệu mía hoặc củ cải đường ban đầu thu được từ 3,5 - 4,5 kg rỉ mật (xem tài liệu của Oura E (1983) “Biomass from Carbohydrates in Reed H-JRaG”, Biotechnology Series, 3). Diện tích trồng mía của Việt Nam là 300 ngàn ha, sản lượng mía hàng năm đạt gần 20 triệu tấn, sản lượng đường đạt 1 triệu tấn và rỉ mật đạt từ 700 ngàn đến 900 ngàn tấn. Nấm men sử dụng trực tiếp rỉ mật để tạo sinh khối và trao đổi chất của chúng, không cần bất kỳ quá trình thủy phân nào (do nấm men có thể thủy phân đường sucroza tạo đường glucoza và fructoza). *Saccharomyces cerevisiae* có thể sử dụng trực tiếp 2 loại đường này để sinh trưởng, phát triển, tạo sinh khối trong điều kiện có oxy. Bên cạnh đó, việc sử dụng kết hợp rỉ mật và phụ phẩm chế biến tinh bột ngô cho lên men lỏng có tiếp cơ chất và tối ưu môi trường tạo đã được sinh khối cao (180g sinh khối/L). Theo sáng chế, rỉ mật đường được sử dụng làm một nguồn cơ chất để nuôi cấy thu sinh khối nấm men.

Trong công đoạn xử lý nguyên liệu, tiến hành làm sạch củ sản nguyên liệu và nghiền ướt. Quá trình này nhằm thu được hỗn hợp nguyên liệu có hàm lượng tinh bột nằm trong khoảng từ 20 đến 25%.

Trong công đoạn phân cắt tinh bột, tiến hành gia nhiệt hỗn hợp nguyên liệu đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 100°C để hồ hóa nguyên liệu. Tiếp đó, điều chỉnh pH của hỗn hợp đến khoảng từ 4 đến 6. Tiếp đó bổ sung enzym α -amylaza với lượng từ 0,01 đến 0,03% theo hàm lượng tinh bột. Để quá trình phân cắt tinh bột xảy ra, duy trì điều kiện trong khoảng thời gian từ 2 đến 3 giờ để enzym phân cắt tinh bột thu được dịch sản nguyên liệu.

Trong bước thu dịch đường từ dịch sản nguyên liệu, bước này bao gồm các công đoạn đường hóa dịch sản nguyên liệu và thu dịch đường nguyên liệu.

Trong công đoạn đường hóa dịch sản nguyên liệu, tiến hành hạ nhiệt độ dịch sản nguyên liệu thu được ở trên đến khoảng từ 60 đến 70°C. Tiếp đó bổ sung một lượng 0,65% enzym α -glucoamylaza theo lượng tinh bột trong dịch sản nguyên liệu. Điều kiện tối ưu để enzym hoạt động là pH từ 4 đến 6, do đó, tiến hành điều chỉnh pH đến khoảng từ 4 đến 6 để enzym phân cắt tinh bột thành đường glucoza.

Trong công đoạn thu dịch đường bằng cách lọc bỏ phần cặn, thu được dịch đường glucoza.

Trong bước sản xuất sinh khối probiotic nấm men, bước này bao gồm các công đoạn nhân giống chủng giống gốc; chuẩn bị môi trường lên men thu sinh khối *Saccharomyces cerevisiae*; và lên men tiếp dần nồng độ gồm 7 cấp.

Trong công đoạn nhân giống chủng giống gốc, tiến hành bổ sung 1mL chủng nấm men giống gốc *Saccharomyces cerevisiae* vào môi trường YPG (yeast-peptone-glucose) để hoạt hóa chủng giống gốc này. Chủng giống gốc *Saccharomyces cerevisiae* được cung cấp bởi các nhà cung cấp chủng giống gốc thuần khiết trên thị trường mà thích hợp để sử dụng làm probiotic.

Môi trường YPG được sử dụng bao gồm 10g/L dịch chiết nấm men, 20g/L pepton và 20g/L glucoza, nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ khoảng 30°C và pH khoảng 5,5. Quá trình hoạt hóa chủng giống gốc trải qua ba lần cấy chuyển để cuối cùng thu được tương ứng là 100mL, 250mL và 3L dịch môi trường giống gốc tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có mật độ khoảng 10^8 tế bào/mL.

Trong công đoạn chuẩn bị môi trường lên men thu sinh khối *Saccharomyces cerevisiae* bằng cách pha dịch đường glucoza thu được ở trên với rỉ mật theo tỷ lệ 1:1 tính theo hàm lượng đường. Hỗn hợp này được bổ sung nước cất để thu được các dung dịch có lượng đường tổng lần lượt là 70g/L, 78g/L, 78g/L, 120g/L, 140 g/L, 160 g/L và 160 g/L. Tiếp đó bổ sung khoáng chất đến nồng độ cuối tính theo % trọng lượng bao gồm: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ khoảng 20%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ khoảng 1,81%; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ khoảng 2,32%; KH_2PO_4 khoảng 3,45%, thu được bảy môi trường lên men, tương ứng;

Nitơ và khoáng chất tạo nên là thành phần màng tế bào nấm men, tham gia vào quá trình chuyển hóa lên men sinh khối. Các khoáng được bổ sung vào quá trình lên men là các muối bao gồm MgSO_4 , MnSO_4 , FeSO_4 và KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgCl_2 .

Cơ sở để tính toán nhu cầu khoáng dựa trên thành phần của sinh khối (N: 8-10%; P: 2- 4%; K: 2-5%; Mg: 2%; Ca: 2-3%), sử dụng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ làm nguồn cung N; KH_2PO_4 98% làm nguồn cung P và K; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ làm nguồn cung Mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ làm nguồn cung Ca. Việc tính toán nhu cầu các khoáng trên trong sinh khối, sau đó quy đổi ra hàm lượng muối, trong đó tính toán nhu cầu lãng phí của muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 10%; KH_2PO_4 98% là 0%; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ và $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tính bằng 50% nhu cầu do trong nước đã sẵn có hàm lượng Mg và Ca tương ứng 50%.

Đối với việc tính toán nhu cầu nitơ và muối khoáng, cứ 100g glucoza thì sẽ tạo ra được khoảng từ 33 - 51 g sinh khối, từ căn cứ này các thành phần muối trên sẽ được tiến hành tính toán theo hàm lượng đường tổng số.

Việc tính toán nhu cầu các khoáng trên theo sinh khối lý thuyết (mỗi 100 g đường tạo ra từ 46 - 51g sinh khối, hàm lượng protein trong sinh khối nấm men là

54,5%), sau đó quy đổi ra hàm lượng muối (trong đó tính toán nhu cầu lãng phí của muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 10%; KH_2PO_4 98% là 0%; $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ và $\text{CaCl}_2.2.\text{H}_2\text{O}$ tính bằng 50% nhu cầu do trong nước đã sẵn có hàm lượng Mg và Ca tương ứng 50%.

Trong công đoạn lên men tiếp dần nồng độ, tiến hành bổ sung 3L dịch chứa giống gốc tế bào nấm men vào thiết bị lên men và lần lượt tiếp dần nồng độ để lên men liên tiếp bảy cấp trong điều kiện nhiệt độ được duy trì khoảng 30°C , pH khoảng 5,5, hiệu khí với lượng khí cấp là 1m^3 không khí/ m^3 môi trường lên men/phút.

Trong quá trình lên men tạo sinh khối của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, điều kiện hiệu khí là yếu tố tiên quyết để hình thành sinh khối. Nếu lượng oxy không đủ, môi trường trở nên yếm khí, *Saccharomyces cerevisiae* lên men tạo ra etanol và ức chế quá trình tạo nấm men. Tuy nhiên, nếu cung cấp đủ oxy thì nấm men lại sử dụng etanol để hình thành sinh khối. Cụ thể hơn, để tối ưu thông số này, các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu để xác định nhu cầu oxy, trên cơ sở hàm lượng oxy trong tế bào nấm men là 28%, oxy được tính toán theo sinh khối sau đó căn cứ khả năng hòa tan oxygen trong nước rồi quy đổi ra L/phút và điều chỉnh tự động trong quá trình lên men và được thể hiện cụ thể trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Hàm lượng oxy

	Bình phản ứng	Nalgen
K, lượng lên men (L)	4	10
Hàm lượng đường glucoza (g/L)	200	200
K, lượng đường/mẻ lên men (g)	800	2000
Sản lượng sinh khối dự kiến 51% so với glucoza	408	1,020
Nhu cầu oxy (L)	0,11	0,29
Tương đương với không khí (L)	0,71	1,79

Khả năng hòa tan không khí trong nước là 0,01%	0,01%	0,01%
Tổng lượng không khí cấp trong 10 giờ lên men (L)	7,140	17,850
Tính cho mỗi phút là khoảng (L)	11,9	29,75

Để quá trình lên men thu sinh khối đạt hiệu quả, quá trình lên men được thực hiện với bảy cấp lên men tiếp dần nồng độ theo sơ đồ phát triển log của nấm men, trong đó:

Trong công đoạn lên men cấp 1: bổ sung vào thiết bị lên men 30 lít môi trường lên men có nồng độ đường tổng 70 g/L. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu dịch lên men cấp 1.

Trong công đoạn lên men cấp 2: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 1 môi trường lên men có nồng độ đường tổng 78 g/L đến thể tích 300 lít. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 2.

Trong công đoạn lên men cấp 3: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 2 môi trường có nồng độ đường tổng 78 g/L đến thể tích 1500 lít. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 3.

Trong công đoạn lên men cấp 4: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 3 môi trường có nồng độ đường tổng 120 g/L đến thể tích 7500 lít. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 4.

Trong công đoạn lên men cấp 5: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 4 môi trường lên men có nồng độ đường tổng 140 g/L đến thể tích 15000 lít. Duy trì điều

kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L thu được dịch lên men cấp 5. Tiến hành chuyển 87,5% lượng dịch lên men cấp 5 sang bồn chứa thành phẩm, phần dịch còn lại được tiếp tục quá trình lên men.

Trong công đoạn lên men cấp 6: bổ sung vào phần dịch lên men cấp 5 còn lại trong thiết bị lên men một lượng môi trường lên men có nồng độ đường tổng 160 g/L đến thể tích 7500L. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 6.

Trong công đoạn lên men cấp 7: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 6 môi trường lên men có nồng độ đường 160 g/L đến thể tích 15000 lít. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 5g/L, thu được dịch lên men cấp 7. Phần dịch này được chuyển sang bồn chứa thành phẩm.

Trong đó, các công đoạn lên men cấp 4 đến lên men cấp 7 được thực hiện trong cùng một bồn lên men và dung dịch lên men cuối cùng có trong bồn chứa thành phẩm có mật độ tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đạt ít nhất 2×10^9 CFU/mL.

Trong bước thu sinh khối probiotic nấm men, tiến hành hạ nhiệt độ dịch trong bồn chứa thành phẩm đến khoảng từ 18 đến 22°C. Sau khi loại bỏ phần dịch, nấm men đạt độ ẩm khoảng từ 54 đến 70%, tiến hành sấy khô sinh khối ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 45°C đến hàm ẩm nằm trong khoảng từ 6 đến 10%. Thu được sinh khối probiotic nấm men thành phẩm dạng bột mùi thơm đặc trưng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Tối ưu điều kiện nuôi cấy để thu được chủng giống gốc tế bào nấm men

Chủng giống gốc *Saccharomyces cerevisiae* được nuôi cấy trong bình tam giác trên 8 môi trường thường được sử dụng để nuôi cấy nấm men bao gồm YPG (yeast-peptone-glucose), dịch chiết Malt, Sabouraud's, YEGP, YM, YPD, YM bổ sung khoáng và PDB. Thử nghiệm sinh trưởng ở các nhiệt độ khác nhau 20, 25, 30, 35, 40, 45 và 50°C; pH thay đổi từ 3 đến 9; tỉ lệ giống cấy từ 0,2 đến 10%.

Cụ thể là, môi trường YPG (yeast-peptone-glucose) bao gồm 10g/L phần chiết nấm men, 20g/L pepton và 20g/L glucoza, ở nhiệt độ 30°C và pH là 5,5; môi trường dịch chiết Malt (ME) bao gồm (g/l): cao malt-20; glucoza-20; pepton-1; môi trường Sabouraud's (Sab) bao gồm (g/l): glucoza-20; pepton-10; KH_2PO_4 -1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -1,0; NaNO_3 -1,0; môi trường PDB bao gồm (g/l): khoai tây-200; glucoza-20, môi trường YEGP bao gồm (g/l): glucoza-20; cao men-5; pepton-10, môi trường YM bao gồm (g/l): glucoza-10; pepton-5; cao men-3; cao malt-3, môi trường YM bổ sung khoáng (YM-K) bao gồm (g/l): glucoza-10; pepton-5; cao men-3; cao malt-3; KH_2PO_4 -3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -2, môi trường YPD bao gồm (g/l): pepton-20; cao men-10; glucoza-20.

Qua các kết quả thu được, chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đạt được hiệu quả nhân giống cao nhất khi được nuôi cấy trong môi trường YPG (yeast-peptone-glucose) bao gồm 10g/L phần chiết nấm men, 20g/L pepton và 20g/L glucoza, ở nhiệt độ khoảng 30°C và pH là khoảng 5,5. Ngoài ra, về tỉ lệ giống cấy, *Saccharomyces cerevisiae* đạt được nồng độ tối ưu khi thực hiện qua ba lần cấy chuyển để thu được tương ứng là 100mL, 250mL và 3L dung dịch giống nuôi cấy tế

bào nấm men có mật độ khoảng 10^8 tế bào/mL từ 1mL tế bào *Saccharomyces cerevisiae* có mật độ khoảng 10^8 tế bào/mL ban đầu.

Ví dụ 2. Lên men sản xuất thu sinh khối probiotic nấm men

Sắn tươi được làm sạch và nghiền ướt để thu được 16000kg sắn nguyên liệu, trong đó tỷ lệ hàm lượng chất khô của sắn nguyên liệu được xử lý để đạt được tỷ lệ 25%.

Dịch hóa sắn nguyên liệu ở nhiệt độ nằm 85°C , và $\text{pH}=6$ bằng cách sử dụng H_2SO_4 10% và NaOH 20%, enzym α -amylaza 0,82kg (0,02% tính theo khối lượng tinh bột) trong thời gian từ khoảng 3 giờ thu được 29454 lít dung dịch sau dịch hoá.

Sau khi dịch hóa, hạ nhiệt độ xuống đến 60° và điều chỉnh $\text{pH}=6$, bổ sung 26,59kg enzym α -glucoamylaza (0,65% tính theo khối lượng tinh bột) để thu được 29454 lít dung dịch sau đường hóa, hàm lượng glucoza đạt 4500kg vật chất khô glucoza (160 g/l), lọc bỏ phần cặn thu phần dịch đường.

Để tối ưu hóa điều kiện lên men, tiến hành lên men qua bảy cấp sử dụng môi trường chứa cơ chất bao gồm đường glucoza thủy phân từ tinh bột sắn kết hợp với rỉ mật theo tỷ lệ 1/1 tính theo hàm lượng tổng (glucoza và rỉ mật) lần lượt là 70g/L, 78g/L, 78g/L, 120g/L, 140 g/L, 160 g/L và 160 g/L, lượng khoáng bổ sung được định lượng theo hàm lượng thực tế có trong môi trường lên men gồm: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở lượng khoảng 20%; $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ ở lượng khoảng 1,81%; $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ ở lượng khoảng 2,32%; KH_2PO_4 (98%) ở lượng khoảng 3,45% ở mỗi cấp lên men, các điều kiện lên men được duy trì ở nhiệt độ khoảng 30°C , pH là khoảng 5,5, điều kiện hiếu khí với lượng cung cấp oxy 1m^3 không khí/ m^3 môi trường lên men/phút, trong đó.:

Lên men tiếp dần nồng độ bằng cách bổ sung 3L dịch chứa giống gốc tế bào nấm men vào thiết bị lên men và lần lượt tiếp dần nồng độ để lên men liên tiếp bảy cấp trong điều kiện nhiệt độ được duy trì khoảng 30°C, pH khoảng 5,5, hiếu khí với lượng khí cấp là 1m³ không khí/m³ môi trường lên men/phút.

Lên men cấp 1: bổ sung vào thiết bị lên men 30 lít môi trường lên men có nồng độ đường tổng 70 g/L. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu dịch lên men cấp 1.

Lên men cấp 2: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 1 môi trường lên men có nồng độ đường tổng 78 g/L đến thể tích 300 lít. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 2.

Lên men cấp 3: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 2 môi trường có nồng độ đường tổng 78 g/L đến thể tích 1500 lít. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 3;

Lên men cấp 4: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 3 môi trường có nồng độ đường tổng 120 g/L đến thể tích 7500 lít. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 4.

Lên men cấp 5: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 4 môi trường lên men có nồng độ đường tổng 140 g/L đến thể tích 15000 lít. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L

thu được dịch lên men cấp 5. Chuyển 87,5% lượng dịch lên men cấp 5 (13125 lít) sang bồn chứa thành phẩm, phần dịch còn lại (1875 lít) được tiếp tục quá trình lên men.

Lên men cấp 6: bổ sung vào phần dịch lên men cấp 5 còn lại (1875 lít) trong thiết bị lên men một lượng môi trường lên men có nồng độ đường tổng 160 g/L đến thể tích 7500L. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 6.

Lên men cấp 7: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 6 môi trường lên men có nồng độ đường 160 g/L đến thể tích 15000 lít. Duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 5g/L, thu được dịch lên men cấp 7. Phần dịch này được chuyển sang bồn chứa thành phẩm, tại bồn chứa này, độ tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trên 2×10^9 CFU/mL.

Làm mát dịch trong bồn chứa thành phẩm đến khoảng 22°C, sau khi loại bỏ phần dịch. Phần sinh khối nấm men đạt độ ẩm khoảng từ 54 đến 70%, tiến hành sấy khô sinh khối ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 45°C đến hàm ẩm nằm trong khoảng từ 6 đến 10% thu được sinh khối probiotic nấm men thành phẩm.

Ví dụ 3. Xác định trọng lượng tế bào khô (CDW) và mật độ tế bào theo thời gian trong quy trình nuôi cấy theo sáng chế

Để xác định trọng lượng tế bào khô (Cellular dry weight -CDW) của quá trình lên men sinh khối từ Ví dụ 2, định kỳ lấy mẫu và tiến hành ly tâm dịch cùng một lượng dung dịch nuôi cấy trong 10 phút ở 4°C và 3000×g và làm khô đến khối lượng

không đổi. Để xác định mật độ tế bào, máy đo mật độ tế bào được sử dụng. Kết quả được nêu trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Tương quan giữa CDW (g/L) và mật độ tế bào (CFU/mL)

Thời gian (giờ)	CDW (g/L)	Mật độ tế bào (CFU/mL)
0	33,6	5,5E+07
6	33,3	1,1E+08
8	51,4	4,5E+08
10	52,0	6,3E+08
12	61,6	8,5E+08
14	65,5	1,3E+09
16	67,3	1,4E+09
16,5	33,7	7E+08
18	51,5	3,5E+08
20	61,0	8,8E+08
22	65,5	1,1E+09
24	78,7	1,3E+09
26	84,7	1,3E+09
26,5	21,2	3,3E+08
30	68,0	3,5E+08
32	72,3	7,5E+08
34	78,5	1E+09
36	82,0	1,8E+09
38	87,5	2E+09
40	94,1	1E+09
42	47,1	5E+08
44	74,0	1,2E+09
46	80,3	1,5E+09
48	88,8	1,7E+09
50	92,5	1,8E+09
52	94,6	2,1E+09

Từ bảng 2 nêu trên có thể thấy rằng, quy trình theo sáng chế thu được mật độ tế bào lên tới $2,1 \times 10^9$ CFU/mL trong khi các quy trình thông thường chỉ đạt $1,0 \times 10^9$ CFU/mL.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất sinh khối probiotic nấm men từ sản nguyên liệu và rỉ mật đường, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) dịch hóa sản nguyên liệu:

xử lý nguyên liệu bằng cách làm sạch củ sản nguyên liệu và nghiền ướt thu được hỗn hợp nguyên liệu có hàm lượng tinh bột nằm trong khoảng từ 20 đến 25%;

phân cắt tinh bột bằng cách gia nhiệt hỗn hợp nguyên liệu đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 100°C để hồ hóa nguyên liệu, điều chỉnh pH đến khoảng từ 4 đến 6, sau đó bổ sung enzyme α -amylaza với lượng từ 0,01 đến 0,03% theo hàm lượng tinh bột, duy trì điều kiện trong khoảng thời gian từ 2 đến 3 giờ để enzyme phân cắt tinh bột thu được dịch sản nguyên liệu;

b) thu dịch đường từ dịch sản nguyên liệu:

đường hóa dịch sản nguyên liệu bằng cách hạ nhiệt độ dịch sản nguyên liệu đến khoảng từ 60 đến 70°C, tiếp đó bổ sung một lượng 0,65% enzyme α -glucoamylaza theo lượng tinh bột trong dịch sản nguyên liệu, điều chỉnh pH đến khoảng từ 4 đến 6 để enzyme phân cắt tinh bột thành đường glucoza;

thu dịch đường bằng cách lọc bỏ phần cặn, thu được dịch đường glucoza; và

c) sản xuất sinh khối probiotic nấm men:

nhân giống chủng giống gốc bằng cách bổ sung 1mL chủng nấm men giống gốc *Saccharomyces cerevisiae* vào môi trường YPG (yeast-peptone-glucose) bao gồm 10g/L dịch chiết nấm men, 20g/L pepton và 20g/L glucoza, nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ khoảng 30°C và pH khoảng 5,5 qua ba lần cấy chuyển để thu

được tương ứng là 100mL, 250mL và 3L dịch môi trường giống gốc tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có mật độ khoảng 10^8 tế bào/mL;

chuẩn bị môi trường lên men thu sinh khối *Saccharomyces cerevisiae* bằng cách pha dịch đường glucoza thu được từ bước (b) với rỉ mật theo tỷ lệ 1:1 tính theo hàm lượng đường, sau đó bổ sung nước cất để thu được các dung dịch có lượng đường tổng lần lượt là 70g/L, 78g/L, 78g/L, 120g/L, 140 g/L, 160 g/L và 160 g/L, tiếp đó bổ sung khoáng chất đến nồng độ cuối tính theo % trọng lượng bao gồm: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ khoảng 20%; $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ khoảng 1,81%; $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ khoảng 2,32%; KH_2PO_4 khoảng 3,45%, thu được bảy môi trường lên men, tương ứng;

lên men tiếp dần nồng độ bằng cách bổ sung 3L dịch chứa giống gốc tế bào nấm men vào thiết bị lên men và lần lượt tiếp dần nồng độ để lên men liên tiếp bảy cấp trong điều kiện nhiệt độ được duy trì khoảng 30°C, pH khoảng 5,5, hiệu khí với lượng khí cấp là 1m³ không khí/m³ môi trường lên men/phút, trong đó:

lên men cấp 1: bổ sung vào thiết bị lên men 30 lít môi trường lên men có nồng độ đường tổng 70 g/L, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu dịch lên men cấp 1;

lên men cấp 2: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 1 môi trường lên men có nồng độ đường tổng 78 g/L đến thể tích 300 lít, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 2;

lên men cấp 3: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 2 môi trường có nồng độ đường tổng 78 g/L đến thể tích 1500 lít, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 3;

lên men cấp 4: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 3 môi trường có nồng độ đường tổng 120 g/L đến thể tích 7500 lít, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 4;

lên men cấp 5: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 4 môi trường lên men có nồng độ đường tổng 140 g/L đến thể tích 15000 lít, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L thu được dịch lên men cấp 5, chuyển 87,5% lượng dịch lên men cấp 5 sang bồn chứa thành phẩm, phần dịch còn lại được tiếp tục quá trình lên men;

lên men cấp 6: bổ sung vào phần dịch lên men cấp 5 còn lại trong thiết bị lên men một lượng môi trường lên men có nồng độ đường tổng 160 g/L đến thể tích 7500L, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được dịch lên men cấp 6; và

lên men cấp 7: bổ sung tiếp vào dịch lên men cấp 6 môi trường lên men có nồng độ đường 160 g/L đến thể tích 15000 lít, duy trì điều kiện lên men đến khi hàm lượng đường tổng trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 5g/L, thu được dịch lên men cấp 7, phần dịch này được chuyển sang bồn chứa thành phẩm;

trong đó, các công đoạn lên men cấp 4 đến lên men cấp 7 được thực hiện trong cùng một bồn lên men và dung dịch lên men cuối cùng có trong bồn chứa thành phẩm có mật độ tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đạt ít nhất 2×10^9 CFU/mL; và

d) thu sinh khối probiotic nấm men bằng cách hạ nhiệt độ dịch trong bồn chứa thành phẩm đến khoảng từ 18 đến 22°C, sau khi loại bỏ phần dịch, nấm men đạt độ ẩm khoảng từ 54 đến 70%, tiến hành sấy khô sinh khối ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 45°C đến hàm ẩm nằm trong khoảng từ 6 đến 10% thu được sinh khối probiotic nấm men thành phẩm.