



(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)



1-0033485

(51)<sup>7</sup> C12N 1/00; C12N 1/18; C12N 1/16

(13) B

(21) 1-2018-04391

(22) 05/10/2018

(45) 25/10/2022 415

(43) 25/01/2019 370A

(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 PROTEIN NẤM MEN TỪ NGUYÊN LIỆU NGŨ CỐC VÀ RỈ MẬT ĐƯỜNG

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sinh khối protein nấm men từ nguyên liệu ngũ cốc và rỉ mật đường, bao gồm các bước: (i) dịch hoá nguyên liệu ngũ cốc; (ii) đường hóa dung dịch thu được; (iii) sản xuất sinh khối protein bằng chủng nấm men *Kluyveromyces marxianus* sử dụng đường glucoza được sản xuất trong bước (ii) và rỉ mật.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực lên men rỉ mật đường mía và các nguyên liệu ngũ cốc chứa tinh bột, cụ thể hơn sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sinh khối protein nấm men từ rỉ mật đường mía và nguyên liệu ngũ cốc chứa tinh bột bằng chủng nấm men. Sản phẩm protein nấm men theo sáng chế hữu dụng làm chất bổ sung trong thức ăn chăn nuôi.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo báo cáo công bố ngày 03/5/2011 của Liên Hợp Quốc, dân số thế giới hiện nay xấp xỉ 7 tỷ người, dự kiến năm 2050 sẽ đạt khoảng 9,3 tỷ và con số này sẽ ở mức 10,1 tỷ người năm 2100, nhân loại đang đứng trước nguy cơ thiếu lương thực nghiêm trọng. Bảng 1 dưới đây thể hiện lượng tiêu thụ thịt, sữa và trứng của các nước trên thế giới ước tính vào năm 2030.

Bảng 1. Ước tính lượng tiêu thụ thịt sữa, trứng của các nước trên thế giới năm 2030

(kg/người)

|                          | 1997/99 |       |       | 2030  |       |       |
|--------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                          | Thịt    | Sữa   | Trứng | Thịt  | Sữa   | Trứng |
| Thế giới                 | 36,0    | 78,0  | 8,7   | 45,0  | 90,0  | 10,8  |
| Các nước đang phát triển | 2,5     | 45,0  | 6,5   | 37,0  | 66,0  | 8,9   |
| Các nước công nghiệp     | 88,0    | 212,0 | 13,5  | 100,0 | 221,0 | 13,8  |

Kèm theo những nỗ lực để sản xuất lương thực, thế giới đang phải đối mặt với những vấn đề môi trường nghiêm trọng như sự nóng lên toàn cầu, phát thải khí nhà kính, tiêu thụ nhiều nước dự trữ, mất đa dạng sinh học và ô nhiễm sông hồ do nước chảy. Nông nghiệp và chăn nuôi được báo cáo là những nguyên nhân chính gây ô nhiễm môi trường, lượng chất thải từ nông nghiệp và chăn nuôi thậm chí còn nhiều hơn các nhà máy và ô tô cộng lại. Theo David Tilman, việc tăng gấp đôi sản lượng lương thực nông nghiệp trong vòng 35 năm (từ 1961-1996) đi liền với việc tăng lượng nitơ tiêu thụ lên 6,87 lần, tăng lượng phospho tiêu thụ lên 3,48 lần, tăng lượng nước tưới lên 1,68 lần và diện tích đất trồng trọt lên 1,1 lần. Dựa vào xu thế mở rộng theo tuyến tính đơn giản của các xu hướng cũ các nhà khoa học dự đoán rằng: nếu sản lượng lương thực toàn cầu tăng gấp đôi thì nhu cầu nitơ và phospho sẽ tăng khoảng 3 lần, diện tích đất cần được tưới tiêu tăng gấp đôi, và diện tích đất trồng trọt tăng 18%. Điều này sẽ có tác động lớn đến sự đa dạng, thành phần và chức năng của các hệ sinh thái tự nhiên còn lại của thế giới. Các tác động lớn nhất làm khan hiếm nước ngọt và ảnh hưởng đến hệ sinh thái biển sẽ dẫn đến nhiều thảm họa cho con người trong tương lai (xem tài liệu "Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices", của Tilman, David, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (11): 5995–6000, công bố ngày 25/05/1999). Theo Vermeulen et al., trong năm 2008, hệ thống sản xuất nông nghiệp cung cấp lương thực và thực phẩm cho con người đóng góp 19% - 29% của khí thải nhà kính (GHG) trên toàn cầu, thải ra 9.800 - 16.900 triệu tấn đương lượng cacbon dioxit ( $\text{MtCO}_2\text{eq}$ ) (xem "Climate Change and Food Systems", Annual

Review of Environment and Resources 37 (1): 195–222, Vermeulen *et al.*, công bố ngày 01/01/2012). Nông nghiệp cung cấp lương thực và thực phẩm cho con người, nhưng lại tiêu thụ một khối lượng lớn nước ngọt, sử dụng nhiều đất, tàn phá đa dạng sinh học, suy thoái môi trường và góp phần thay đổi khí hậu do khí thải (một phần ba của tất cả các loại khí nhà kính). Theo đó, với nhu cầu về lương thực ngày càng tăng theo cấp số nhân này, một nhu cầu đặt ra đối với con người là cần thay đổi mô hình lương thực và kèm theo bảo vệ môi trường.

Một trong những giải pháp nhằm giảm thiểu tác động đến môi trường được ngành công nghệ sinh học đưa ra là sử dụng vi sinh vật trong các quy trình sản xuất, tận dụng nguyên liệu rẻ tiền hoặc chất thải công nghiệp làm cơ chất để các vi sinh vật được chọn lọc này tổng hợp các hợp chất mới có giá trị thương mại, ví dụ quá trình sản xuất protein từ sinh vật đơn bào (single cell protein -SCP). Bên cạnh những hợp chất thu được dưới dạng sản phẩm cuối hoặc sản phẩm trung gian của hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật được tiết ra ngoài môi trường hoặc được chiết xuất công nghiệp từ tế bào này (ví dụ, metanol, metan, etanol, vitamin B, axit lactic và axit glutamic, carotenoid, xylitol, v.v.), sinh khối vi sinh vật cũng có thể trở thành nguồn thực phẩm giàu protein. Theo định nghĩa của Huang và Kinsella, protein từ sinh vật đơn bào (SCP) xuất phát từ các vi sinh vật đơn bào như tảo đơn bào, nấm men (*Candida*, *Saccharomyces*, v.v.), nấm sợi (*Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizopus*, v.v.), vi khuẩn (*Cellulomonas*, *Alcaligenes*, v.v.) lên men cơ chất nhất định để tạo ra các thực phẩm chức năng, sản phẩm sinh học có giá trị (xem “Functional properties of phosphorylated yeast protein: solubility, water-holding capacity, and viscosity”,

Huang và Kinsella, J. Agric. Food Chem., 34: 670-674, công bố ngày 01/07/1986) như các sản phẩm giàu protein, vitamin, các axit amin thiết yếu và lipid với hàm lượng cao. Nguồn protein này có khả năng thay thế protein truyền thống vốn hấp thu chậm, hàm lượng axit amin không cân đối và hàm lượng axit nucleic cao. Các giai đoạn của quy trình sản xuất SCP điển hình bao gồm chuẩn bị nguyên liệu thô, lên men, thu sinh khối, phá vỡ tế bào và làm khô.

Để sản xuất protein từ các nguồn cacbon hydrat, vi sinh vật, cụ thể là nấm men phải đáp ứng các tiêu chuẩn gồm: Có khả năng đồng hoá nhiều nguồn cacbon khác nhau, nhất là các loại pentoza (xiloza, arabinoza) và các axit hữu cơ; có thể phát triển tốt trên môi trường có nồng độ chất khử (nồng độ đường) cao; có khả năng phát triển nhanh, có sức đề kháng cao đối với nồng độ CO<sub>2</sub>; sản lượng cao, sinh khối chứa nhiều chất dinh dưỡng có giá trị (hàm lượng protein cao, có nhiều axit amin không thay thế, vitamin, v.v.); kích thước tế bào tương đối lớn để dễ tách bằng cách ly tâm; chịu được nhiệt độ tương đối cao, ít làm biến đổi pH môi trường. Trong sản xuất sinh khối protein, các chủng thuộc bốn giống gồm *Saccharmyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* và *Torulopsis* thường được sử dụng do khả năng chuyển hoá của bốn giống này rất cao, đa dạng và quy trình tạo ra sinh khối cũng tương đối đơn giản.

Tuy nhiên, các sản phẩm sinh khối protein theo quy trình SCP gặp một số vấn đề như sau: vi sinh vật có tốc độ sinh trưởng, phát triển nhanh nên chứa nồng độ axit nucleic, đặc biệt là ARN ngoại lai cao. Lượng ARN cao này dẫn đến nhu cầu loại bớt axit nucleic ngoại lai này trong thực phẩm dành cho con người. Ngoài ra, lượng

tiêu thụ phải được giới hạn trong chế độ ăn là dưới 50g mỗi ngày. Nếu quá lượng nêu trên sẽ dẫn đến nồng độ axit uric trong huyết tương tăng cao, mà có thể gây ra bệnh gút và sỏi thận (do nucleotit khi vào trong ống tiêu hóa của động vật bị phân giải thành các nhóm purin và pyrimidin, tạo ra axit uric). Tương tự như tế bào thực vật, tế bào của một số vi sinh vật như tảo và nấm men có chứa các thành phần không tiêu hóa được, chẳng hạn như xenluloza. Như vậy, quy trình cần bao gồm thêm bước phá vỡ vách xenluloza để giải phóng bào chất bên trong các tế bào thì con người và động vật mới có thể tiêu hóa dễ dàng được. Một số sản phẩm từ SCP còn có mùi vị khó chịu. Tùy thuộc vào các chủng loại SCP và môi trường nuôi cấy, việc nuôi dưỡng phải hết sức cẩn thận, tránh các lây nhiễm bởi các vi sinh vật khác là nguyên nhân sản sinh ra một số độc tố như mycotoxin hoặc xyanotoxin. Một số nấm men và nấm sợi dùng để sản xuất protein chứa hàm lượng methionin thấp.

*Kluyveromyces marxianus* là một trong những chủng nấm men thường được sử dụng để sản xuất protein sinh khối nấm men. *K. marxianus* có tốc độ tăng trưởng cao, có thể lên tới 100 lần trong 16 giờ, từ 0,7g/l lên tới 70g/L (xem tài liệu của Érika Durão Vieira *et al.*, “Yeast biomass production: A new approach in glucoza-limited feeding strategy”, Brazilian Journal of Microbiology 44, 2, 551-558 (2013)). Trong một báo cáo khác, Christian Löser *et al.* đã nghiên cứu khả năng tăng sinh khối tế bào của chủng *K. marxianus* trên môi trường đậm whey thải từ nhà máy chế biến sữa, sử dụng *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 để lên men, cùng với việc bổ sung nguồn nitơ vô cơ (urê, amoni sulfat), tạo ra 82g/L sinh khối. Ngoài ra, như đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực, do chủng *K. marxianus* có khả năng tạo

etanol thấp hơn các chủng nấm men khác và đồng thời sử dụng nhiều nguồn cacbon, nguồn nitơ vô cơ (chất thải dư thừa trong nông nghiệp, công nghiệp) góp phần làm giảm ô nhiễm môi trường, tái tạo nguyên liệu chất thải nên chủng này được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực sản xuất sinh khối. *Kluyveromyces marxianus* có thể phát triển ở nhiệt độ 47°C, thậm chí là 52°C (theo Banat *et al.*, “Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C”, World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8(3): các trang 259-263, 1992) và sản sinh etanol ở nhiệt độ cao trên 40°C (theo Fonseca *et al.*, 2008). Hơn nữa, *K. marxianus* còn có thuận lợi là tốc độ phát triển nhanh và khả năng sử dụng rộng rãi các cơ chất trong công nghiệp như đường mía, bắp, nước trái cây, rỉ đường, v.v. (theo Nonklang *et al.*, “High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042”, Applied and Environmental Microbiology. 74(24): trang 7514-752, 2008). Theo Limtong, chủng nấm men *K. marxianus* DMKU 3-1042 được phân lập từ đất trồng mía có khả năng lên men và chịu nhiệt đến 45°C (theo Limtong *et al.*, “Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*”, Bioresources Technology. 98(17): trang 336-337, 2007) và được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về sự ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng lên men của nấm cả về cơ chế sinh hóa và sinh học phân tử. Do khả năng sử dụng đồng thời lactoza và glucoza của *K. marxianus*, tỷ lệ phổ biến của *K. marxianus* trong các môi trường công nghiệp cao vì nó làm giảm thời gian sản xuất và tăng năng suất.

Đã có một số nghiên cứu được đưa ra nhằm làm tăng hiệu quả sản xuất sinh khối của vi sinh vật, ví dụ như quy trình sản xuất theo mẻ (batch và quy trình liên tục (continuous). Tuy nhiên, những giải pháp này có những hạn chế nhất định. Quy trình sản xuất sinh khối theo mẻ dẫn đến hiện tượng tích tụ các phụ phẩm trong môi trường sản xuất, theo đó, có thể ảnh hưởng nghiêm trọng đến hiệu suất sinh khối. Quy trình liên tục đưa đều đặn lượng sinh khối được tạo ra khỏi bể phản ứng. Tuy nhiên, quy trình này đòi hỏi bước phân tách sinh khối ngay tại bể phản ứng để có được chất lượng sinh khối mong muốn. Quy trình cung cấp cơ chất theo mẻ (fed-batch) được đề xuất nhằm giảm thiểu phụ phẩm và không đòi hỏi bước tách sinh khối liên tục trong quá trình sản xuất. Tuy nhiên, quy trình sản xuất sinh khối áp dụng cung cấp theo mẻ đòi hỏi việc kiểm soát nồng độ cơ chất và các thành phần trong môi trường. Nếu cung cấp quá nhiều thành phần dinh dưỡng vào môi trường, có thể dẫn đến hiện tượng tích tụ phụ phẩm ảnh hưởng đến chất lượng sinh khối và ngược lại nếu quá ít sẽ dẫn đến hiện tượng hạn chế lượng sinh khối tạo thành.

Một trong những hạn chế khác của quy trình sản xuất protein sinh khối nấm men trên quy mô công nghiệp sử dụng *Kluyveromyces fragilis* hiện có là chi phí sản xuất cao và khi vận hành trên quy mô công nghiệp, không thể đảm bảo việc tiệt trùng cho các thiết bị nuôi, môi trường nuôi cấy, nên có các chủng tạp nhiễm có thể gây ức chế sự phát triển của chủng vi sinh nuôi cấy. Do đó, tồn tại nhu cầu đối với quy trình sản xuất sinh khối protein từ chủng nấm men *Kluyveromyces fragilis* cải tiến giải quyết được các vấn đề nêu trên.

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

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

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình sản xuất protein nấm men từ chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* quy mô công nghiệp, tối ưu hoá được lượng oxy và thành phần môi trường được sử dụng, và duy trì các trị số tối ưu này trong suốt nhằm nâng cao hiệu suất và chất lượng của sinh khối protein.

Quy trình theo sáng chế bao gồm các bước:

- (i) dịch hóa nguyên liệu ngũ cốc chứa tinh bột bằng cách sử dụng enzym  $\alpha$ -amylaza:
- (ii) đường hóa dung dịch thu được sau dịch hóa bằng cách sử dụng enzym  $\alpha$ -glucoamylaza để thu được đường glucoza:
- (iii) sản xuất sinh khối protein bằng chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* sử dụng đường glucoza được sản xuất trong bước (ii) và rỉ mật, trong đó:

nhân giống chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* để thu được dung dịch giống nuôi cấy tế bào nấm men;

lên men trên quy mô công nghiệp qua bảy cấp lên men sử dụng môi trường chứa cơ chất bao gồm đường glucoza được sản xuất ở bước (ii) kết hợp với rỉ mật.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết thông qua phương án cụ thể được ưu tiên theo sáng chế chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế. Theo đó, người trong lĩnh vực kỹ thuật dễ dàng hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án cụ thể này.

Rõ ràng là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, 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.

Trong bản mô tả này, 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 cần hiểu rằng pH này tốt nhất là có giá trị bằng 5,5, tuy nhiên các giá trị nằm trong khoảng 4,4 đến 6,6 cũng đều có thể được sử dụng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sinh khối protein nấm men từ nguyên liệu ngũ cốc chứa tinh bột và rỉ mật đường bằng chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* bao gồm các bước:

(i) dịch hóa nguyên liệu ngũ cốc bằng cách sử dụng enzym  $\alpha$ -amylaza:

nguyên liệu ngũ cốc được làm sạch và nghiền, trong đó tỷ lệ hàm lượng chất khô của nguyên liệu ngũ cốc nằm trong khoảng từ 20 đến 25%;

dịch hóa nguyên liệu ngũ cốc ở nhiệt độ 85°C, và pH 4,5 bằng cách sử dụng enzym  $\alpha$ -amylaza trong thời gian 2 giờ, lượng enzym  $\alpha$ -amylaza bổ sung trong quá trình dịch hóa so với hàm lượng tinh bột trong nguyên liệu ngũ cốc từ 0,01 đến 0,03%, tốt hơn là 0,02%;

(ii) đường hóa dung dịch thu được sau dịch hóa bằng cách sử dụng enzym  $\alpha$ -glucoamylaza để thu được đường glucoza:

sau khi dịch hóa, hạ nhiệt độ xuống đến nhiệt độ 65°C và điều chỉnh pH về 5,5, bổ sung enzym  $\alpha$ -glucoamylaza để thu được glucoza; phân tách ra khỏi cặn và lưu trữ đường glucoza thu được; và

(iii) sản xuất sinh khối protein bằng chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* sử dụng đường glucoza được sản xuất trong bước (ii) và rỉ mật, trong đó:

nhân giống 1mL chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* trong môi trường YPG (yeast-peptone-glucoza) 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 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;

lên men trên quy mô công nghiệp qua bảy cấp lên men sử dụng môi trường chứa cơ chất bao gồm đường glucoza được sản xuất ở bước (ii) kết hợp với rỉ mật theo tỷ lệ 50/50 tính theo hàm lượng đường, tổng hàm lượng đường (glucoza và rỉ mật) lần lượt là 70g/L, 78g/L, 78g/L, 120g/L, 140g/L, 160g/L và 160g/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%;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ở lượng khoảng 1,81%;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ở lượng khoảng 2,32%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (98%) ở lượng khoảng 3,45% ở mỗi cấp lên men, các điều kiện lên men được duy trì ở nhiệt độ khoảng  $30^\circ\text{C}$ , pH là khoảng 5,5, điều kiện hiếu khí với lượng cung cấp oxy  $1\text{m}^3$  không khí/ $\text{m}^3$  môi trường lên men/phút, trong đó:

cấp lên men 1: bổ sung môi trường mới vào 3L dung dịch giống nuôi cấy tế bào nấm men thu được từ bước nhân giống đến thể tích 30L, lên men cấp 1 và kết thúc cấp lên men 1 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 30L dịch lên men cấp 1,

cấp lên men 2: bổ sung môi trường mới vào 30L dịch lên men cấp 1 đến thể tích 300L, lên men cấp 2 và kết thúc cấp lên men 2 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 300L dịch lên men cấp 2,

cấp lên men 3: bổ sung môi trường mới vào 300L dịch lên men cấp 2 đến thể tích 1500L, lên men cấp 3 và kết thúc cấp lên men 3 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 1500L dịch lên men cấp 3,

cấp lên men 4: bổ sung môi trường mới vào 1500L dịch lên men cấp 3 đến thể tích 7500L, lên men cấp 4 và kết thúc cấp lên men 4 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 7500L dịch lên men cấp 4,

cấp lên men 5: bổ sung môi trường mới vào 7500L dịch lên men cấp 4 đến thể tích 15000L, lên men cấp 5 và kết thúc cấp lên men 5 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 15000L dịch lên men cấp 5, rút 87,5% dung dịch lên men cấp 5 ra khỏi bồn lên men và chuyển sang bồn chứa dung dịch lên men thành phẩm,

cấp lên men 6: bổ sung thêm môi trường lên men mới đến thể tích 7500L, lên men cấp 6 và kết thúc cấp lên men 6 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 7500L dịch lên men cấp 6,

cấp lên men 7: bổ sung môi trường mới vào 7500L dịch lên men cấp 6 đến thể tích 15000L, lên men cấp 7 và kết thúc cấp lên men 7 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 5g/L, thu được 15000L dịch lên men cấp 7,

chuyển dịch lên men cấp 7 thu được sang bồn chứa dung dịch lên men thành phẩm, hạ nhiệt về 18 -22°C, sấy để thu được sinh khối protein nấm men thành phẩm, trong đó, các cấp lên men 4 đến cấp lên men 7 được thực hiện trên cùng một bồn lên men.

*Các nguồn cơ chất lên men được sử dụng trong phương pháp sản xuất protein theo sáng chế*

Được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, 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, C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> 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 việc sản xuất SCP từ dầu mỏ bị dừng lại, nên đến nay không có nhà máy nào sản xuất protein từ dầu mỏ. Chủng *Methylobacterium 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. methylophilus* 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.

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). *Kluyveromyces maxianus* 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).

#### *Khoáng chất cho quá trình nuôi cấy nấm men*

Nitơ và khoáng là thành phần của 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  $(NH_4)_2SO_4$  làm nguồn cung N;  $KH_2PO_4$  98% làm nguồn cung P và K;  $MgCl_2.6H_2O$  làm nguồn cung Mg;  $CaCl_2.2.H_2O$  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  $(NH_4)_2SO_4$  là 10%;  $KH_2PO_4$  98% là 0%;  $MgCl_2.6H_2O$  và  $CaCl_2.2H_2O$  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 (biomass), từ căn cứ này các thành phần muối trên sẽ được tiến hành tính toán theo hàm lượng đường (sugar) hoặc glucoza.

Việc tính toán nhu cầu các khoáng trên theo sinh khối (biomas) lý thuyết (mỗi 100 g đường (sugar) tạo ra 46 - 51g biomas, hàm lượng protein trong biomass 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%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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%.

#### *Oxy cho quá trình tạo sinh khối nấm men*

Trong quá trình lên men tạo sinh khối của nấm men *Kluyveromyces maxianus*, điều kiện hiếu khí là yếu tố tiên quyết để hình thành sinh khối. Nếu lượng oxy không đủ, môi trường trở nên yếm khí, *Kluyveromyces maxianus* lên men tạo ra etanol và sau khi đủ khí oxy, vi sinh vật này 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<br>ứng<br>(Bioreactor) | 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  |

### *Dịch hoá nguồn cơ chất*

Khi được sử dụng trong bản mô tả sáng chế,  $\alpha$ -amylaza (còn được gọi là EC3.2.1.3) được hiểu là enzym thủy phân liên kết 1,4- $\alpha$ -glucosit trong polysacarit để tạo ra dextrin, oligosacarit và glucoza.

Khi được sử dụng trong bản mô tả sáng chế,  $\alpha$ -glucoamylaza được hiểu là enzym thủy phân cả 1,4- và 1,6- $\alpha$ -glucosit từ đầu không khử của tinh bột, oligo- liên quan, trong polysacarit tạo đường glucoza. Một đơn vị hoạt tính của  $\alpha$ -glucoamylaza được xác định là lượng enzym cần thiết để giải phóng 1 $\mu$ mol glucoza/phút và thường được sử dụng ở lượng 0,12% so với lượng tinh bột cần đường hóa.  $\alpha$ -amylaza và  $\alpha$ -glucoamylaza đều là các enzym được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực và có thể mua một cách dễ dàng ngoài thị trường.

Khi được sử dụng trong bản mô tả sáng chế, 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.

*Tối ưu điều kiện nuôi trong bình lắc để thu được dung dịch giống nuôi cấy tế bào nấm men*

*Kluyveromyces fragilis* được nuôi lắc trong bình tam giác trên 8 môi trường thường được sử dụng để nuôi cấy nấm men bao gồm YPG (yeast-peptone-glucose), Malt extract, 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 khoảng 30°C và pH là khoảng 5,5; môi trường Malt extract (ME) bao gồm Cao malt-20; Glucoza-20; Pepton-1; môi trường Sabouraud's (Sab) bao gồm: Glucoza-20; Pepton-10;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -1,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -1,0;  $\text{NaNO}_3$ -1,0; môi trường PDB bao gồm: Khoai tây-200; Glucoza-20, môi trường YEGP bao gồm: Glucoza-20; Cao men-5; Pepton-10, môi trường YM bao gồm: Glucoza-10; Pepton-5; Cao men-3; Cao malt-3, môi trường YM bổ sung khoáng (YM-K) bao gồm: Glucoza-10; Pepton-5; Cao men-3; Cao malt-3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -2, môi trường YPD bao gồm: Pepton-20; Cao men-10; Glucoza-20.

Qua các kết quả thu được, chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* 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, *Kluyveromyces maxianus* 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 *Kluyveromyces maxianus* có mật độ khoảng  $10^8$  tế bào/mL ban đầu.

#### *Tối ưu điều kiện lên men trên quy mô công nghiệp*

Lên men trên quy mô công nghiệp qua bảy cấp lên men sử dụng môi trường chứa cơ chất bao gồm đường glucoza được sản xuất ở bước (ii) kết hợp với rỉ mật theo tỷ lệ 50/50 tính theo hàm lượng đường, tổng hàm lượng đường (glucoza và rỉ mật) lần lượt là 70g/L, 78g/L, 78g/L, 120g/L, 140g/L, 160g/L và 160g/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%;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ở lượng khoảng 1,81%;

MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ở lượng khoảng 2,32%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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<sup>3</sup> không khí/m<sup>3</sup> môi trường lên men/phút, trong đó:

cấp lên men 1: bổ sung môi trường mới vào 3L dung dịch giống nuôi cấy tế bào nấm men thu được từ bước nhân giống đến thể tích 30L, lên men cấp 1 và kết thúc cấp lên men 1 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 30L dịch lên men cấp 1,

cấp lên men 2: bổ sung môi trường mới vào 30L dịch lên men cấp 1 đến thể tích 300L, lên men cấp 2 và kết thúc cấp lên men 2 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 300L dịch lên men cấp 2,

cấp lên men 3: bổ sung môi trường mới vào 300L dịch lên men cấp 2 đến thể tích 1500L, lên men cấp 3 và kết thúc cấp lên men 3 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 1500L dịch lên men cấp 3,

cấp lên men 4: bổ sung môi trường mới vào 1500L dịch lên men cấp 3 đến thể tích 7500L, lên men cấp 4 và kết thúc cấp lên men 4 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 7500L dịch lên men cấp 4,

cấp lên men 5: bổ sung môi trường mới vào 7500L dịch lên men cấp 4 đến thể tích 15000L, lên men cấp 5 và kết thúc cấp lên men 5 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 15000L dịch lên men cấp 5, rút 87,5% dung dịch lên men cấp 5 ra khỏi bồn lên men và chuyển sang bồn chứa dung dịch lên men thành phẩm,

cấp lên men 6: bổ sung thêm môi trường lên men mới đến thể tích 7500L, lên men cấp 6 và kết thúc cấp lên men 6 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 7500L dịch lên men cấp 6, cấp lên men 7: bổ sung môi trường mới vào 7500L dịch lên men cấp 6 đến thể tích 15000L, lên men cấp 7 và kết thúc cấp lên men 7 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 5g/L, thu được 15000L dịch lên men cấp 7,

chuyển dịch lên men cấp 7 thu được sang bồn chứa dung dịch lên men thành phẩm, hạ nhiệt về 18 -22°C, sấy để thu được sinh khối protein nấm men thành phẩm, trong đó, các cấp lên men 4 đến cấp lên men 7 được thực hiện trên cùng một bồn lên men và dung dịch lên men thành phẩm có mật độ tế bào đạt ít nhất  $2 \times 10^9$  CFU/mL.

Sau khi nấm men đạt độ ẩm khoảng 65 - 70%, tiến hành sấy ở nhiệt độ thấp từ 40 – 45°C bằng công nghệ sấy dạng phun hoặc trống quay, để đưa độ ẩm xuống còn khoảng 6 – 10% mà không cần phải sử dụng công nghệ sấy đông khô chi phí cao.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

*Ví dụ thực nghiệm:* Sản xuất sinh khối protein nấm men từ nguyên liệu ngũ cốc và rỉ mật đường bằng chủng nấm men *Kluyveromyces fragilis* bao gồm các bước:

(i) dịch hóa nguyên liệu ngũ cốc bằng cách sử dụng enzym  $\alpha$ -amylaza:

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

dịch hóa nguyên liệu ngũ cốc ở nhiệt độ nằm 85°C, và pH khoảng 6 bằng cách sử dụng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% và NaOH 20%, enzym  $\alpha$ -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;

(ii) đường hóa dung dịch thu được sau dịch hóa bằng cách sử dụng enzym  $\alpha$ -glucoamylaza để thu được đường glucoza:

sau khi dịch hóa, hạ nhiệt độ xuống đến nhiệt độ  $65^{\circ}$  và điều chỉnh pH về 5,5, bổ sung 26,59kg enzym  $\alpha$ -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 (160g/L); phân tách ra khỏi cặn và lưu trữ dung dịch đường glucoza thu được; và

(iii) sản xuất sinh khối protein bằng chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* sử dụng đường glucoza được sản xuất trong bước (ii) và rỉ mật, trong đó:

nhân giống 1mL chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* trong môi trường YPG (yeast-peptone-glucoza) bao gồm 10g/L phần chiết nấm men, 20g/L pepton và 20g/L glucoza, ở nhiệt độ khoảng  $30^{\circ}\text{C}$  và pH là khoảng 5,5 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;

lên men trên quy mô công nghiệp qua bảy cấp lên men sử dụng môi trường chứa cơ chất bao gồm đường glucoza được sản xuất ở bước (ii) kết hợp với rỉ mật theo tỷ lệ 50/50 tính theo hàm lượng đường, tổng hàm lượng đường (glucoza và rỉ mật) lần lượt là 70g/L, 78g/L, 78g/L, 120g/L, 140g/L, 160g/L và 160g/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%;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ở lượng khoảng 1,81%;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ở lượng khoảng 2,32%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (98%) ở lượng khoảng 3,45% ở mỗi cấp lên men, các điều kiện lên men được duy trì ở nhiệt độ khoảng  $30^{\circ}\text{C}$ , pH là

khoảng 5,5, điều kiện hiếu khí với lượng cung cấp oxy  $1\text{m}^3$  không khí/ $\text{m}^3$  môi trường lên men/phút, trong đó:

cấp lên men 1: bổ sung môi trường mới vào 3L dung dịch giống nuôi cấy tế bào nấm men thu được từ bước nhân giống đến thể tích 30L, lên men cấp 1 và kết thúc cấp lên men 1 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 30L dịch lên men cấp 1,

cấp lên men 2: bổ sung môi trường mới vào 30L dịch lên men cấp 1 đến thể tích 300L, lên men cấp 2 và kết thúc cấp lên men 2 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 300L dịch lên men cấp 2,

cấp lên men 3: bổ sung môi trường mới vào 300L dịch lên men cấp 2 đến thể tích 1500L, lên men cấp 3 và kết thúc cấp lên men 3 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 1500L dịch lên men cấp 3,

cấp lên men 4: bổ sung môi trường mới vào 1500L dịch lên men cấp 3 đến thể tích 7500L, lên men cấp 4 và kết thúc cấp lên men 4 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 7500L dịch lên men cấp 4,

cấp lên men 5: bổ sung môi trường mới vào 7500L dịch lên men cấp 4 đến thể tích 15000L, lên men cấp 5 và kết thúc cấp lên men 5 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 15000L dịch lên men cấp 5, rút 87,5% dung dịch lên men cấp 5 ra khỏi bồn lên men và chuyển sang bồn chứa dung dịch lên men thành phẩm,

cấp lên men 6: bổ sung thêm môi trường lên men mới đến thể tích 7500L, lên men cấp 6 và kết thúc cấp lên men 6 khi hàm lượng đường trong

dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 7500L dịch lên men cấp 6,

cấp lên men 7: bổ sung môi trường mới vào 7500L dịch lên men cấp 6 đến thể tích 15000L, lên men cấp 7 và kết thúc cấp lên men 7 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 5g/L, thu được 15000L dịch lên men cấp 7,

chuyển dịch lên men cấp 7 thu được sang bồn chứa dung dịch lên men thành phẩm, hạ nhiệt về 18 -22°C, sấy để thu được sinh khối protein nấm men thành phẩm, trong đó, các cấp lên men 4 đến cấp lên men 7 được thực hiện trên cùng một bồn lên men.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất sinh khối protein nấm men từ nguyên liệu ngũ cốc và rỉ mật đường bằng chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* bao gồm các bước:

(i) dịch hóa nguyên liệu ngũ cốc bằng cách sử dụng enzym  $\alpha$ -amylaza:

nguyên liệu ngũ cốc được làm sạch và nghiền, trong đó tỷ lệ hàm lượng chất khô của nguyên liệu ngũ cốc nằm trong khoảng từ 20 đến 25%;

dịch hóa nguyên liệu ngũ cốc ở nhiệt độ 85°C, và pH 4,5 bằng cách sử dụng enzym  $\alpha$ -amylaza trong thời gian từ khoảng 2 đến 3 giờ, lượng enzym  $\alpha$ -amylaza bổ sung trong quá trình dịch hóa so với hàm lượng tinh bột trong nguyên liệu ngũ cốc từ 0,01 đến 0,03%;

(ii) đường hóa dung dịch thu được sau dịch hóa bằng cách sử dụng 0,65% enzym  $\alpha$ -glucoamylaza (tính theo khối lượng tinh bột trong môi trường đường hóa) để thu được dịch đường glucoza:

sau khi dịch hóa, hạ nhiệt độ xuống đến nhiệt độ 65° và điều chỉnh pH về 5,5, bổ sung enzym  $\alpha$ -glucoamylaza để thu được glucoza; phân tách ra khỏi cặn và lưu trữ đường glucoza thu được; và

(iii) sản xuất sinh khối protein bằng chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* sử dụng đường glucoza được sản xuất trong bước (ii) và rỉ mật, trong đó:

nhân giống 1mL chủng nấm men *Kluyveromyces maxianus* 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 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;

lên men trên quy mô công nghiệp qua bảy cấp lên men sử dụng môi trường chứa cơ chất bao gồm đường glucoza được sản xuất ở bước (ii) kết hợp với rỉ mật

theo tỷ lệ 50/50 tính theo hàm lượng đường, tổng hàm lượng đường (glucoza và ri mật) lần lượt là 70g/L, 78g/L, 78g/L, 120g/L, 140g/L, 160g/L và 160g/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%;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ở lượng khoảng 1,81%;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ở lượng khoảng 2,32%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (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<sup>3</sup> không khí/m<sup>3</sup> môi trường lên men/phút, trong đó:

cấp lên men 1: bổ sung môi trường mới vào 3L dung dịch giống nuôi cấy tế bào nấm men thu được từ bước nhân giống đến thể tích 30L, lên men cấp 1 và kết thúc cấp lên men 1 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 30L dịch lên men cấp 1,

cấp lên men 2: bổ sung môi trường mới vào 30L dịch lên men cấp 1 đến thể tích 300L, lên men cấp 2 và kết thúc cấp lên men 2 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 300L dịch lên men cấp 2,

cấp lên men 3: bổ sung môi trường mới vào 300L dịch lên men cấp 2 đến thể tích 1500L, lên men cấp 3 và kết thúc cấp lên men 3 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 1500L dịch lên men cấp 3,

cấp lên men 4: bổ sung môi trường mới vào 1500L dịch lên men cấp 3 đến thể tích 7500L, lên men cấp 4 và kết thúc cấp lên men 4 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 7500L dịch lên men cấp 4,

cấp lên men 5: bổ sung môi trường mới vào 7500L dịch lên men cấp 4 đến thể tích 15000L, lên men cấp 5 và kết thúc cấp lên men 5 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 15000L dịch lên men cấp 5, rút 87,5% dung dịch lên men cấp 5 ra khỏi bồn lên men và chuyển sang bồn chứa dung dịch lên men thành phẩm,

cấp lên men 6: bổ sung thêm môi trường lên men mới đến thể tích 7500L, lên men cấp 6 và kết thúc cấp lên men 6 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 20g/L, thu được 7500L dịch lên men cấp 6,

cấp lên men 7: bổ sung môi trường mới vào 7500L dịch lên men cấp 6 đến thể tích 15000L, lên men cấp 7 và kết thúc cấp lên men 7 khi hàm lượng đường trong dung dịch lên men giảm xuống còn khoảng 5g/L, thu được 15000L dịch lên men cấp 7,

chuyển dịch lên men cấp 7 thu được sang bồn chứa dung dịch lên men thành phẩm, hạ nhiệt về 18 -22°C, sấy để thu được sinh khối protein nấm men thành phẩm, trong đó, các cấp lên men 4 đến cấp lên men 7 được thực hiện trên cùng một bồn lên men.