



(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)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003050

(51) **C12N 1/02; C12P 19/04**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00119

(22) 25/05/2016

(67) 1-2016-01888

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/04/2017 349A

(73) **TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH (VN)**
2374 Quốc lộ 1, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Phan Mỹ Hạnh (VN); Lê Thị Thùy Nhi (VN); Bùi Văn Tân (VN); Trần Chí Hiếu (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT XENLULOZA TỪ CHỦNG KOMAGATAEIBACTER
NATAICOLA BC-B0007**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất xenluloza vi sinh dạng màng và dạng bột từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007, trong đó môi trường BC1, BC2 và BC3 là môi trường chuyên biệt để nuôi cấy chủng này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất xenluloza vi sinh từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 dùng trong lĩnh vực y dược và mỹ phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khái niệm xenluloza vi khuẩn được S. Hestrin và M. Schramm nhắc đến lần đầu tiên năm 1954 khi phát hiện chủng *Acetobacter xylinum* (nay được gọi là *Komagataeibacter xylinus*) có khả năng sinh tổng hợp lớp màng xenluloza trong môi trường có glucose và oxy (S. Hestrin và M. Schramm, 1954).

Khả năng tổng hợp xenluloza vi sinh còn được phát hiện ở một số nhóm vi khuẩn khác như *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Zooglea*, *Gluconacetobacter* (Bielecki S. 2005); tuy nhiên chỉ *Gluconacetobacter* cho chất lượng xenluloza tốt nhất. Ngoài ra, năm 2008, D. R. Nobles và R. M. Brown đã chuyển gen sinh tổng hợp xenluloza từ *G. xylinus* vào khuẩn lam để tạo dòng khuẩn lam mới có khả năng tổng hợp xenluloza (Patent US2008085520-A1; US7803601-B2).

Theo hệ thống phân loại Bergey (2005), chi *Gluconacetobacter* thuộc họ vi khuẩn *Acetobacteraceae*, có khoảng 17 loài (Yamada và cs, 2012). Tuy nhiên theo Yamada và cộng sự, trong chi này có sự khác biệt về kiểu gen và kiểu hình giữa các loài, nhóm đại diện *Gluconacetobacter liquefaciens* có khả năng di động và tạo sắc tố nâu trong khi nhóm đại diện *Gluconacetobacter xylinus* không có khả năng này. Do vậy năm 2012, Yamada và cộng sự chia chi *Gluconacetobacter* thành hai chi mới là chi *Komagataeibacter* (đại diện là *Komagataeibacter xylinus*) và chi *Gluconacetobacter* (đại diện là *Gluconacetobacter liquefaciens*) (Yamada và cs, 2012). Chi mới *Komagataeibacter* gồm các loài: *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter oboediens*, *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter swingsii*, *Komagataeibacter rhaeticus*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter nataicola*, *Komagataeibacter kombuchae* và *Komagataeibacter sucrofermentans*.

Về đặc điểm, cấu trúc xenluloza vi sinh rất giống với cấu trúc xenluloza thực vật, tuy nhiên chúng khác biệt ở số lượng đơn phân D-glucose trong một chuỗi dẫn đến khác biệt về mức độ polymer hóa. Ví dụ, xenluloza trong sợi bông có mức độ polymer hóa trên thành tế bào bậc một khoảng 2000 - 6000, bậc hai – 13000 – 14000 đơn phân; xenluloza trong gỗ – 8000 – 10000 đơn phân trong khi xenluloza từ vi khuẩn *Gluconacetobacter xylinus* – 2000 – 6000 đơn phân (Bielecki S. 2005).

Khả năng ngấm nước của xenluloza vi sinh cao từ 96-98,2%. Khi nuôi cấy ở môi trường tĩnh sẽ tạo màng, nuôi cấy lắc sẽ tạo thành các hạt với kích thước tùy thuộc tốc độ khuấy. Các sợi xenluloza có thể ở dạng I α và I β , đây là loại xenluloza có trong thành tế bào thực vật và tảo. Màng thu được bằng phương pháp nuôi cấy tĩnh có chứa nhiều I α hơn là nuôi cấy lắc (Steinbüchel A., 2005). Xenluloza I α tạo cấu trúc bền hơn I β . Xenluloza vi sinh có chứa đến gần 60% là I α trong khi ở thực vật chỉ tầm 30%. Ở thực vật xenluloza I β chiếm phần lớn (Sugiyama J., 1999).

Theo Bielecki (2005), xenluloza vi sinh có những tính chất vô cùng độc đáo như nó có độ tinh khiết rất cao, độ tinh thể hóa cao, mật độ đạt 300-900 kg/m³, độ bền kéo đứt lớn, khả năng hấp thụ, khả năng giữ nước cao, đồng thời có độ co giãn, đàn hồi và độ dẻo tốt. Ngoài ra, xenluloza vi sinh hoàn toàn không độc hại, là một polymer phân hủy sinh học, trợ đời với các quá trình trao đổi chất của con người.

Chính vì thế, hiện nay trên thế giới, một loạt ứng dụng của xenluloza vi sinh đã và đang được nghiên cứu, trong đó các hướng chính (M. Iguchi và cs, 2000; Bielecki S. 2005; Klemm D. và cs, 2005; Hernán Charreau và cs, 2013) như:

- Mỹ phẩm: chất ổn định, mặt nạ dưỡng ẩm;
- Công nghiệp dệt may: vải, tơ lót;
- Vật liệu thấm hút nước;
- Du lịch và thể thao: quần áo thể thao, lều bạt và thiết bị cắm trại;
- Tái chế chất thải: bột để loại bỏ chất bẩn, vật liệu để hấp phụ độc tố, chế biến khoáng sản và dầu;
- Công nghệ dầu khí: lọc dầu;
- Xử lý nước thải: xử lý nước thải bằng phương pháp siêu lọc;
- Phát thanh truyền hình: màng cảm ứng cho tai nghe
- Lâm nghiệp: gỗ nhân tạo, ván ép và container

- Công nghiệp chế biến giấy: giấy chất lượng cao, sửa chữa giấy tờ lưu trữ, giấy lau, khăn tay v.v.
- Công nghiệp ô tô: thân xe, các bộ phận máy bay v.v.
- Công nghệ cao: màn hình điện thoại thông minh (smartphone)
- Công nghiệp thực phẩm: thạch dừa, thực phẩm chức năng bổ sung chất xơ v.v.
- Y dược: da nhân tạo, băng cá nhân, vật liệu làm răng giả, implant v.v.
- Sử dụng trong phòng thí nghiệm: màng cố định protein, thành phần môi trường, cố định enzym, vi khuẩn v.v.

Một số sản phẩm đã được bán thương mại trên thị trường như Nata de Coco (Thạch dừa), sản phẩm của công ty Xylos Corp. (Mỹ) - Prima Cel™, sản phẩm Biofill™ và Bioprocess™ của công ty Fzmb GmbH Đức (P.R. Chawla và cs, 2009), BASYC® (Bacterial Synthesised Cellulose) của Friedrich Schiller University Jena (Đức), Cellulon® của Weyerhaeuser Co. (Tacoma, Washington, Mỹ) và Cetus Co. (Emeryville, California, Mỹ) v.v.

Trong các loài thuộc chi *Komagataeibacter*, chỉ có *Komagataeibacter xylinus* được nghiên cứu kỹ và có nhiều ứng dụng rộng rãi nhất. Tại Việt Nam, một số sản phẩm như Nata de Coco (Thạch dừa), mặt nạ dưỡng ẩm từ lâu đã trở nên phổ biến trên thị trường. *K. xylinus* được nuôi chủ yếu trên môi trường nước dừa già truyền thống (g/l): sucroza - 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 8, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - 2, nước dừa - 1 lít.

Komagataeibacter nataicola được biết đến năm 2006 (Lisdiyanti và cs, 2006) tuy nhiên hầu như chưa có bất kỳ nghiên cứu sâu nào về loài này mặc dù đây là loài được phân lập từ nguồn thạch dừa tại Đông Nam Á.

Ở thời điểm hiện tại chưa có sản phẩm thương mại hóa nào từ *Komagataeibacter nataicola*, và thiếu các nghiên cứu chuyên sâu về môi trường nuôi cấy cũng như cách thức giữ giống, phương pháp, quy trình sản xuất xenluloza từ chủng này, đặc biệt thiếu dẫn chứng cho thấy *Komagataeibacter nataicola* có thể ứng dụng được ở quy mô công nghiệp, trong các ngành đặc thù như mỹ phẩm và y dược.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nhằm đạt được mục đích nêu trên, theo một phương án, sáng chế đề xuất môi trường SY để kích hoạt chủng *Komagataeibacter nataicola*, trong đó môi trường này

bao gồm các thành phần: sucroza là 100 g/l, cao nấm men là 10 g/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có độ pH = 4.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất môi trường BC1 để nuôi cấy chủng *Komagataeibacter nataicola*, trong đó môi trường này bao gồm các thành phần: sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 70 g/l, cao nấm men là 3 g/l, Na_2HPO_4 là 2 g/l, K_2HPO_4 là 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có độ pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men nằm trong khoảng từ 5-8%.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất môi trường BC2 để nuôi cấy chủng *Komagataeibacter nataicola*, trong đó môi trường này bao gồm các thành phần: sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 70 g/l, cao nấm men là 3 g/l, Na_2HPO_4 là 2 g/l, K_2HPO_4 là 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có độ pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong khoảng từ 8-11%.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất môi trường BC3 để nuôi cấy chủng *Komagataeibacter nataicola*, trong đó môi trường này bao gồm các thành phần: sucroza là 100 g/l, cao nấm men là 3 g/l, pepton là 1g/l, K_2HPO_4 là 2g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l; vitamin B1 là 2 mg/l, vitamin B6 là 2 mg/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong ngưỡng từ 8-11%.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất xenluloza dạng bột từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 tẩy trắng bằng ozon.

Theo một phương án nữa, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất xenluloza dạng bột từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 tẩy trắng bằng NaOH 0,5%,

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007, trong đó chủng này có trình tự nêu trong SEQ ID No:1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A: Mô tả hình dạng tế bào chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007.

Hình 1B: Mô tả hình thái khuẩn lạc chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007.

Hình 2: Mô tả hệ thống khay nuôi cấy chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007.

Hình 3: Mô tả màng xenluloza đã xử lý thu nhận từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 trên môi trường BC1.

Hình 3A: Mô tả màng xenluloza đã xử lý thu nhận từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 trên môi trường BC1 sau 03 ngày nuôi cấy.

Hình 3B: Mô tả màng xenluloza đã xử lý thu nhận từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 trên môi trường BC1 sau 07 ngày nuôi cấy.

Hình 4: Mô tả màng xenluloza thu nhận từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 trên môi trường BC2 trong thời gian 7 ngày nuôi cấy.

Hình 5: Bột xenluloza thu nhận từ *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phạm vi của sáng chế, chủng vi khuẩn *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 được sử dụng. Đây là chủng được sàng lọc và thu nhận từ các mẫu phân lập tại Bến Tre, Việt Nam. *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 có trình tự SEQ ID No:1.

Theo kết quả so sánh trình tự trên GenBank, chủng tương thích 100% với *Komagataeibacter nataicola*, chủng hiện được lưu giữ trong Bộ sưu tập giống vi sinh vật – Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh theo tên *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007.

Komagataeibacter nataicola BC-B0007 có dạng hình que, gram âm (-), kích thước trung bình từ 1,5 đến 2,5µm. Tế bào đơn, đôi và theo chuỗi ngắn (hình 1A), khuẩn lạc hình tròn, lồi ở giữa, bề mặt trơn láng nhẵn (hình 1B), hiếu khí bắt buộc, không di động, không tạo sắc tố nâu, có khả năng oxy hóa axetat và lactat để tạo CO₂ và H₂O, chuyển hóa etanol thành axit axetic, không phát triển trên môi trường có từ 3% etanol trở lên, có khả năng tổng hợp xenluloza ngoại bào. Có thể sử dụng được các nguồn đường như arabinoza, riboza, xyloza, galactoza, glucoza, sucroza, maltoza. Sử dụng sucroza tốt hơn glucoza. Phát triển trong môi trường có độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 6,5, khoảng pH tối ưu nằm trong khoảng từ 4 đến 6.

Chủng phát triển trên môi trường HS (tên viết tắt của môi trường S. Hestrin và M. Schramm, 1954) (g/l): glucoza – 20, pepton – 5, cao nấm men – 5, Na₂HPO₄ – 2,7, axit citric – 1,15, nước cất - 1 lít. Tuy nhiên hiệu suất tạo xenluloza không cao, đạt 8,14 g/l sau 07 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28 ± 2°C.

Trên môi trường nước dừa già truyền thống (g/l): sucroza – 20, (NH₄)₂SO₄ – 8, (NH₄)₂HPO₄ – 2, nước cất – 1 lít, lượng xenluloza tạo thành đạt 14,8 g/l sau 07 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28 ± 2°C.

Việc phụ thuộc vào nước dừa để sản xuất dẫn đến không chủ động được nguồn nguyên liệu, khó phát triển ở quy mô công nghiệp, do đó sáng chế đề xuất công thức môi trường thay thế nước dừa già, đơn giản, cho năng suất cao, an toàn, có thể sử dụng trong ngành mỹ phẩm và y dược đối với chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007, cụ thể sáng chế đề cập đến môi trường có các thành phần như dưới đây.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến môi trường kích hoạt SY (viết tắt của chữ “Sucrose Yeast extract”) (g/l): sucroza – 100, cao nấm men – 10, nước cất – 1 lít, pH 4.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến môi trường BC1 (BC1 viết tắt của chữ “Bacterial Cellulose 1” hay “Biotechnology Center 1”) (g/l): sucroza – từ 30 đến 70, cao nấm men – 3, Na_2HPO_4 – 2, K_2HPO_4 – 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2, nước cất – 1 lít, pH 4. Hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men nằm trong khoảng từ 5-8%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến môi trường BC2 (BC2 viết tắt của chữ “Bacterial Cellulose 2” hay “Biotechnology Center 2”) (g/l): sucroza – từ 30 đến 70, cao nấm men – 3, Na_2HPO_4 – 2, K_2HPO_4 – 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2, nước cất – 1 lít, pH 4. Hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong ngưỡng từ 8-11%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến môi trường BC3 (BC3 viết tắt của chữ “Bacterial Cellulose 3” hay “Biotechnology Center 3”) (g/l): sucroza - 100; cao nấm men - 3; pepton - 1; K_2HPO_4 - 2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2; vitamin B1 - 0,002; vitamin B6 - 0,002; nước cất - 1 lít, pH 4. Hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong ngưỡng từ 8-11%.

Năng suất tạo xenluloza sử dụng các môi trường nuôi cấy BC1, BC2, BC3 cao gấp từ 4-6 lần so với sử dụng môi trường HS. Các chủng khác thuộc chi *Komagataeibacter* như *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter hansenii* v.v. đều có thể phát triển tốt trên các môi trường này.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất tạo màng và bột xenluloza từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007, trong đó quy trình này bao gồm các bước như sau:

Bước 1: Kích hoạt giống. Chủng giữ trong ống giữ giống trong glyxerol 10% ở - 80°C được mang ra để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, sau đó cấy truyền sang đĩa Petri có chứa 30 ml môi trường SY hoặc bình tam giác có chứa 100 ml môi trường SY, nuôi cấy tĩnh ở 28°C, 03 ngày. Môi trường SY được hấp tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút. Việc sử dụng các đĩa Petri để kích hoạt giống giúp tăng bề mặt thoáng khí, tạo

điều kiện cho vi khuẩn tạo màng và nhân sinh khối nhanh hơn so với dùng bình tam giác như phương pháp truyền thống.

Bước 2: Nhân giống cấp 1 và nhân giống cấp 2. Chủng sau kích hoạt được cấy truyền sang môi trường BC2 trong các bình erlen 1 lít để chuẩn bị nuôi mẻ lớn, tỷ lệ giống – 10%, nuôi cấy ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 07 ngày. Môi trường BC2 được hấp tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút.

Bước 3: Nuôi cấy tạo màng mẻ lớn. Sử dụng môi trường BC1, BC2 hoặc BC3 để nuôi cấy. Tỷ lệ giống: 10%, nuôi ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian nuôi tùy mục đích sử dụng. Môi trường BC1, BC2, BC3 được chỉnh pH về 4 bằng axit axetic. Việc chỉnh độ pH về 4 và nồng độ đường cao trong các môi trường này (từ 70 – 100 g/l) giúp giảm tỷ lệ nhiễm ở mức dưới 2%, thuận lợi hơn trong khâu nuôi cấy và đặc biệt là giảm tỷ lệ nhiễm trong điều kiện nuôi bán tiệt trùng tại các cơ sở sản xuất hiện nay. Môi trường được tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút.

Tùy mục đích có thể sử dụng các môi trường và thời gian nuôi cấy khác nhau:

Để tạo màng trắng trong (ví dụ: làm mặt nạ) dùng môi trường BC1, thời gian ngắn từ 3-4 ngày.

Để tạo màng tương đối trắng, dày (ví dụ: làm tã lót) sử dụng môi trường BC2, thời gian từ 5-7 ngày.

Nếu chỉ quan tâm đến lượng sinh khối tạo thành (ví dụ: tạo bột giấy) sử dụng môi trường BC3, thời gian trên 7 ngày.

Theo phương pháp truyền thống, môi trường sau tiệt trùng được đổ vào từng khay kích thước hình chữ nhật sao cho môi trường chiếm không quá 1/3 khay, chờ nguội đến dưới 40°C thì thêm chủng với tỷ lệ 5-10%, sau đó các khay này được bọc giấy báo và xếp chồng lên nhau.

Tuy nhiên, phương pháp này có một vài nhược điểm: tỷ lệ nhiễm cao, số lượng công nhân nhiều, phải sử dụng giấy báo chưa qua tiệt trùng và khó tự động hóa. Đặc biệt, việc bọc báo rồi xếp chồng các khay lên nhau mất rất nhiều thời gian và đòi hỏi khu vực nuôi cấy phải có diện tích lớn.

Để khắc phục, môi trường sau khi tiệt trùng (đang ở 115°C) được chạy qua hệ thống trao đổi nhiệt dạng tấm để hạ nhiệt độ xuống 35°C , sau đó chủng được thêm vào với tỷ lệ 1:10.

Tiếp theo, môi trường chứa chủng qua hệ thống chiết rót tự động được thêm vào các khay có dung tích 3200 ml kích thước 253 x 160 x 80 mm qua lỗ tròn trên khay. Các khay này được hấp khử trùng từ trước hoặc được lau cồn và xếp chồng lên nhau như thể hiện trong Hình 2. Ở mỗi khay có 2 lỗ tròn đường kính 1 cm nằm song song nhau ở mặt trước và mặt sau để rót môi trường và giữ khay thoáng khí. Tùy mục đích sử dụng (làm mặt nạ, tã lót hay thu sinh khối) mà lượng môi trường chứa chủng được thêm vào cho phù hợp.

Các lỗ này có thể được che bằng giấy lọc đã hấp tiệt trùng hoặc không che. Nhờ xếp chồng các khay lên nhau mà diện tích nhà xưởng có thể giảm từ 5-10 lần, thuận tiện trong khâu tiền xử lý khay nuôi cấy, tự động hóa được khâu chiết rót. Ngoài ra, do môi trường đã được hạ độ pH xuống 4 và sử dụng nồng độ đường cao nên tỷ lệ nhiễm là rất thấp.

Các khay được để yên trong phòng tối, nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ theo thời gian tương ứng cho từng mục đích sử dụng (làm tã lót, khăn giấy, mặt nạ hay thu sinh khối v.v.).

Về đặc tính kỹ thuật của màng thu được sau nuôi cấy bằng chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007: trong 100 g màng sinh khối thu được có chứa nước với lượng nằm trong khoảng từ 95 đến 97%, xenluloza với lượng từ 2,8 đến 3,5%, protein với lượng nhỏ hơn 0,1%, tro với lượng nhỏ hơn 0,05%, lipid với lượng nhỏ hơn 0,005%. Như vậy cứ 100 g sinh khối ướt sẽ thu được từ 2,8 – 3,5 g xenluloza tinh chất, các thành phần khác ngoại trừ nước hầu như không đáng kể. Protein, lipid và tro nằm trong tế bào, do vậy để thu được xenluloza tinh chất cần xử lý.

Bước 4: Xử lý màng sau nuôi cấy.

Tùy mục đích sử dụng có 2 cách xử lý: giữ nguyên cấu trúc màng hay tạo dạng bột.

Để giữ nguyên cấu trúc màng, màng sau khi nuôi cấy được rửa sạch bằng nước, sau đó ép nước (độ ẩm dưới 60%), ngâm NaOH 0,5% để tẩy trắng và trung hòa axit, sau đó màng được ép NaOH (độ ẩm dưới 60%), trung hòa và hấp khử trùng (xem Hình 3).

Để tạo dạng bột, màng sau khi nuôi cấy được rửa sạch bằng nước, sau đó xay nhuyễn, tẩy trắng bằng ozon hoặc NaOH 0,5%, ép loại nước, xay nhuyễn tạo dạng bột, sấy khô ở nhiệt độ 60°C đến khi hàm lượng nước giảm xuống dưới 12% (xem Hình 5).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Kích hoạt và nhân giống: Chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 giữ trong glyxerol 10% ở -80°C được lấy ra để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, sau đó cấy truyền sang đĩa Petri có chứa 30 ml môi trường SY nêu trên, nuôi cấy ở

$28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 03 ngày. Môi trường SY được hấp tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút. Chủng sau kích hoạt được cấy truyền sang môi trường BC2 nêu trên từ một đến hai lần để chuẩn bị đủ lượng mẫu nuôi mẻ lớn, tỷ lệ giống là 10%, nuôi cấy ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, trong thời gian 07 ngày. Môi trường BC2 được hấp tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút.

Ví dụ 2: Nuôi cấy thu màng xenluloza mỏng làm mặt nạ: Chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 giữ trong glyxerol 10% ở -80°C được mang ra để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, sau đó cấy truyền sang đĩa Petri có chứa 30 ml môi trường SY nêu trên, nuôi cấy ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, trong thời gian 03 ngày. Chủng sau kích hoạt được cấy truyền sang môi trường BC2 nêu trên từ một đến hai lần để chuẩn bị đủ lượng mẫu nuôi mẻ lớn, tỷ lệ giống là 10%, nuôi cấy ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, trong thời gian 07 ngày.

Môi trường BC1 nêu trên sau tiệt trùng qua hệ thống trao đổi nhiệt dạng tấm được hạ nhiệt xuống 35°C , thêm giống 10% rồi được rót qua hệ thống chiết rót tự động để thêm vào các khay có dung tích 3200 ml kích thước $253 \times 160 \times 80$ mm theo thể tích từ 150 – 250 ml qua lỗ tròn trên khay, nuôi cấy ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, trong thời gian 03 ngày. Các khay này được hấp khử trùng từ trước hoặc được lau cồn và xếp chồng lên nhau như Hình 2. Ở mỗi khay có 2 lỗ tròn đường kính 1 cm nằm song song nhau ở mặt trước và mặt sau để rót môi trường và giữ khay thoáng khí. Các lỗ này có thể được che bằng giấy lọc đã hấp tiệt trùng hoặc không che. Các môi trường SY, BC1, BC2 nêu trên được hấp tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút.

Ví dụ 3: Nuôi cấy thu màng xenluloza làm tã lót: Chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 giữ trong glyxerol 10% ở -80°C được mang ra để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, sau đó cấy truyền sang đĩa Petri có chứa 30 ml môi trường SY nêu trên, nuôi cấy ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 03 ngày. Chủng sau kích hoạt được cấy truyền sang môi trường BC2 nêu trên từ một đến hai lần để chuẩn bị đủ lượng mẫu nuôi mẻ lớn, tỷ lệ giống là 10%, nuôi cấy ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, trong thời gian 07 ngày.

Môi trường BC2 nêu trên sau tiệt trùng qua hệ thống trao đổi nhiệt dạng tấm được hạ nhiệt xuống 35°C , thêm giống 10% rồi được rót qua hệ thống chiết rót tự động để thêm vào các khay có dung tích 3200 ml kích thước $253 \times 160 \times 80$ mm theo thể tích từ 400 – 450 ml qua lỗ tròn trên khay, nuôi cấy ở 28°C , trong thời gian 07 ngày. Các khay này được hấp khử trùng từ trước hoặc được lau cồn và xếp chồng lên nhau như Hình 2. Ở mỗi khay có 2 lỗ tròn đường kính 1 cm nằm song song nhau ở mặt trước và mặt sau để rót môi trường và giữ khay thoáng khí. Các lỗ này có thể được che bằng giấy lọc đã

hấp diệt trùng hoặc không che. Các môi trường SY, BC2 nêu trên được hấp diệt trùng ở 115°C trong 20 phút.

Ví dụ 4: Nuôi cấy thu màng xenluloza phục vụ các mục đích khác: Chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 giữ trong glyxerol 10% ở -80°C được mang ra để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, sau đó cấy truyền sang đĩa Petri có chứa 30 ml môi trường SY nêu trên, nuôi cấy ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 03 ngày. Chủng sau kích hoạt được cấy truyền sang môi trường BC3 nêu trên từ một đến hai lần để chuẩn bị đủ lượng mẫu nuôi mẻ lớn, tỷ lệ giống – 10%, nuôi cấy ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 7 ngày.

Môi trường BC3 sau diệt trùng qua hệ thống trao đổi nhiệt dạng tấm được hạ nhiệt xuống 35°C, thêm giống 10% rồi được rót qua hệ thống chiết rót tự động để thêm vào các khay có dung tích 3200 ml kích thước 253 x 160 x 80 mm theo thể tích từ 400 – 450 ml qua lỗ tròn trên khay ở 28°C, 3 ngày. Các khay này được hấp khử trùng từ trước hoặc được lau cồn và xếp chồng lên nhau như Hình 2. Ở mỗi khay có 2 lỗ tròn đường kính 1 cm nằm song song nhau ở mặt trước và mặt sau để rót môi trường và giữ khay thoáng khí. Các lỗ này có thể được che bằng giấy lọc đã hấp diệt trùng hoặc không che. Các môi trường SY, BC3 được hấp diệt trùng ở 115°C trong 20 phút.

Ví dụ 5: Xử lý màng: Màng sau khi nuôi cấy được cho vào các bồn thể tích 10 – 50 m³ có cánh khuấy (tốc độ: 500 – 1000 vòng/phút) theo tỷ lệ màng/nước: 1:1, rửa sạch 5 lần, sau đó màng được ép nước để độ ẩm dưới 60%, ngâm màng đã ép nước trong dung dịch NaOH 0,5% 24 tiếng để phá vỡ tế bào, tẩy trắng và trung hòa axit, sau đó màng được ép nước (độ ẩm dưới 60%), trung hòa và hấp khử trùng.

Ví dụ 6: Tạo dạng bột tẩy trắng bằng ozon: Màng sau khi nuôi cấy được cho vào các bồn thể tích 10 – 50 m³ có cánh khuấy (tốc độ: 500 – 1000 vòng/phút) theo tỷ lệ màng/nước: 1:1, rửa sạch 5 lần, trung hòa đến pH 7, sau đó màng được xay nhuyễn (tốc độ 15000 – 20000 vòng/phút trong 5 phút), tẩy màu bằng ozon (nồng độ bột trên 30%, nhiệt độ 25-35°C, thời gian tẩy 5 phút, nồng độ ozon 100 g/m³), ép loại nước, xay nhuyễn tạo dạng bột, sấy khô ở nhiệt độ 60°C đến khi hàm lượng nước giảm xuống dưới 12% (xem Hình 5).

Ví dụ 7: Tạo dạng bột tẩy trắng bằng NaOH 0,5%: Màng sau khi nuôi cấy được cho vào các bồn thể tích 10 – 50 m³ có cánh khuấy (tốc độ: 500 – 1000 vòng/phút) theo tỷ lệ màng/nước: 1:1, rửa sạch 5 lần, sau đó màng được xay nhuyễn (tốc độ 15000 – 20000 vòng/phút trong 5 phút), màng sau xay nhuyễn được cho vào bồn ngâm với NaOH

0,5% trong 24 tiếng để phá vỡ tế bào, tẩy trắng và trung hòa axit, sau đó ép loại nước, xay nhuyễn tạo dạng bột, sấy khô ở nhiệt độ 60°C đến khi hàm lượng nước giảm xuống dưới 12%.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Hiệu suất thu nhận xenluloza từ *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 khá cao so sánh với các một số chủng *Komagataeibacter xylinus*. Ví dụ, lượng xenluloza đạt được khi nuôi cấy trên môi trường BC3 là 32,278 g/l sau 07 ngày nuôi cấy, kết quả này cao hơn so với *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13773 (10,10 g/l), *Acetobacter xylinum* VKM B880 (15,82 g/l), tương đương với chủng *Acetobacter xylinum* BPR2001 (36 g/l). *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 là một chủng mới được ứng dụng để sản xuất xenluloza, với hiệu suất thu nhận xenluloza như trên hoàn toàn có thể thay thế được chủng *Komagataeibacter xylinus* trong phương pháp truyền thống và có thể sử dụng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 để sản xuất xenluloza vi sinh ở quy mô công nghiệp (Hình 4).

Các môi trường BC1, BC2, BC3 đều cho sinh khối cao hơn từ 3 đến 5 lần so với sử dụng môi trường nước dừa già truyền thống (14,8 g/l) và môi trường HS (8,14 g/l), như vậy các môi trường này có thể sử dụng để thay thế môi trường nước dừa. Ngoài ra, trong thành phần môi trường BC1, BC2, BC3 đều không chứa nước dừa, không phụ thuộc vào nguồn nguyên liệu này nên giá thành ổn định, có thể sản xuất quanh năm mà không phụ thuộc vào vùng nguyên liệu, do vậy đây là môi trường thay thế lý tưởng để ứng dụng trong công nghiệp sản xuất xenluloza vi sinh từ các chủng thuộc chi *Komagataeibacter*.

Các quy trình sản xuất xenluloza từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 trên các loại môi trường BC1, BC2, BC3 đều có thời gian nuôi cấy ngắn (từ 3 – 7 ngày), thời gian nuôi cấy giảm gần một nửa so với quy trình truyền thống (từ 14 – 21 ngày). Quy trình sử dụng hệ thống các khay nuôi cấy đơn giản (hình 2), có thể giúp giảm diện tích xưởng nuôi cấy xuống 3 – 5 lần, hệ thống kín hạn chế nhiễm so với các khay nuôi cấy bọc báo truyền thống và khả năng tự động hoá cao cho sản xuất công nghiệp khi sử dụng kèm hệ thống chiết rót tự động.

Sản phẩm xenluloza vi sinh tạo thành từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 trên các loại môi trường BC1, BC2, BC3 có độ tinh khiết cao, xenluloza vi sinh gần như là 100% xenluloza tinh khiết không có chứa các tạp chất khó phân tách: lignin,

hemixenluloza hay protein, lipit như trong các loại xenluloza tự nhiên khác (gỗ, bông, đay, gai, v.v.). Vì vậy, có thể sử dụng xenluloza vi sinh để sản xuất các loại sản phẩm đòi hỏi xenluloza tinh khiết, chất lượng cao như thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, dược phẩm, v.v. Màng xenluloza thu được có khả năng giữ ẩm cao, giữ được các hợp chất phối tử, độ dai, bền tốt, thân thiện với môi trường, có thể sử dụng để sản xuất mặt nạ, tã lót, băng vệ sinh, v.v. tốt hơn so với các loại vật liệu khác như giấy, PE, v.v. hay các vật liệu dệt, không dệt khác.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất xenluloza dạng màng từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

bước 1: kích hoạt giống

chủng giữ trong ống giữ giống trong glyxerol 10% ở -80°C được lấy ra để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, sau đó cấy truyền sang đĩa Petri có chứa 30 ml môi trường SY, hoặc bình tam giác có chứa 100 ml môi trường SY, môi trường SY bao gồm các thành phần: sucroza là 100 g/l, cao nấm men là 10 g/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có độ pH = 4, nuôi cấy tĩnh ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 03 ngày, môi trường SY được hấp tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút;

bước 2: nhân giống cấp 1 và nhân giống cấp 2

chủng sau kích hoạt ở bước 1 được cấy truyền sang môi trường BC2, môi trường BC2 bao gồm các thành phần: sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 70 g/l, cao nấm men là 3 g/l, Na_2HPO_4 là 2 g/l, K_2HPO_4 là 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có độ pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong khoảng từ 8-11%, đã được tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút, từ một đến hai lần để chuẩn bị đủ lượng mẫu nuôi mẻ lớn, tỷ lệ giống là 10%, nuôi cấy ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, trong thời gian 07 ngày;

bước 3: nuôi cấy tạo màng xenluloza mẻ lớn bằng cách:

nuôi cấy chủng sau khi nhân giống cấp 1 và cấp 2 thu được ở bước 2 trong môi trường BC1, thời gian 03 ngày để tạo màng có độ trắng trong, trong đó môi trường BC1 này bao gồm các thành phần: sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 70 g/l, cao nấm men là 3 g/l, Na_2HPO_4 là 2 g/l, K_2HPO_4 là 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có độ pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men nằm trong khoảng từ 5-8% môi trường nuôi cấy sau tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút qua hệ thống trao đổi nhiệt dạng tấm được hạ nhiệt xuống 35°C , thêm giống 10% rồi được rót qua hệ thống chiết rót tự động để thêm vào các khay có dung tích 3200 ml kích thước 253 x 160 x 80 mm theo thể tích từ 150 – 250 ml qua lỗ tròn trên khay, nuôi cấy ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, các khay này được hấp khử trùng từ trước hoặc được lau cồn và xếp chồng lên nhau; hoặc

nuôi cấy chủng sau khi nhân giống cấp 1 và cấp 2 thu được ở bước 2 trong môi trường BC2, thời gian 07 ngày để tạo màng tương đối trắng và dày, trong đó môi trường BC2 bao gồm các thành phần: sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến

70 g/l, cao nấm men là 3 g/l, Na_2HPO_4 là 2 g/l, K_2HPO_4 là 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có độ pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong khoảng từ 8-11% môi trường nuôi cấy sau tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút qua hệ thống trao đổi nhiệt dạng tấm được hạ nhiệt xuống 35°C, thêm giống 10% rồi được rót qua hệ thống chiết rót tự động để thêm vào các khay có dung tích 3200 ml kích thước 253 x 160 x 80 mm theo thể tích từ 150 – 250 ml qua lỗ tròn trên khay, nuôi cấy ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, các khay này được hấp khử trùng từ trước hoặc được lau cồn và xếp chồng lên nhau; hoặc

nuôi cấy chủng sau khi nhân giống cấp 1 và cấp 2 thu được ở bước 2 trong môi trường BC3, thời gian từ 07 đến 09 ngày để tạo màng có sinh khối lớn, trong đó môi trường BC3 bao gồm các thành phần: sucroza là 100 g/l, cao nấm men là 3 g/l, pepton là 1 g/l, K_2HPO_4 là 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l; vitamin B1 là 2 mg/l, vitamin B6 là 2 mg/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong ngưỡng từ 8-11%, môi trường nuôi cấy sau tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút qua hệ thống trao đổi nhiệt dạng tấm được hạ nhiệt xuống 35°C, thêm giống 10% rồi được rót qua hệ thống chiết rót tự động để thêm vào các khay có dung tích 3200 ml kích thước 253 x 160 x 80 mm theo thể tích từ 150 – 250 ml qua lỗ tròn trên khay, nuôi cấy ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, các khay này được hấp khử trùng từ trước hoặc được lau cồn và xếp chồng lên nhau,

bước 4: xử lý màng

màng thu được sau khi nuôi cấy ở bước 3 được cho vào các bồn thể tích 10 – 50 m³ có cánh khuấy, tốc độ: 500 – 1000 vòng/phút, theo tỷ lệ màng/nước: 1:1 (khối lượng), rửa sạch 5 lần, sau đó màng được ép nước để độ ẩm dưới 60%, ngâm màng đã ép nước trong dung dịch NaOH 0,5% 24 tiếng, sau đó màng được ép nước để độ ẩm dưới 60%, trung hòa và hấp khử trùng.

2. Quy trình sản xuất xenluloza dạng bột từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 tẩy trắng bằng ozon, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

bước 1: kích hoạt giống

chủng giữ trong ống giữ giống trong glyxerol 10% ở -80°C được lấy ra để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, sau đó cấy truyền sang đĩa Petri có chứa 30 ml môi trường SY, hoặc bình tam giác có chứa 100 ml môi trường SY, môi trường SY bao gồm các thành phần: sucroza là 100 g/l, cao nấm men là 10 g/l, nước cất – 1 lít, môi

trường này có độ pH = 4, nuôi cấy tĩnh ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 03 ngày, môi trường SY được hấp tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút;

bước 2: nhân giống cấp 1 và nhân giống cấp 2

chủng sau kích hoạt ở bước 1 được cấy truyền sang môi trường BC2, môi trường BC2 bao gồm các thành phần: sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 70 g/l, cao nấm men là 3 g/l, Na_2HPO_4 là 2 g/l, K_2HPO_4 là 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có độ pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong khoảng từ 8-11%, đã được tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút, từ một đến hai lần để chuẩn bị đủ lượng mẫu nuôi mẻ lớn, tỷ lệ giống là 10%, nuôi cấy ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 07 ngày;

bước 3: nuôi cấy tạo màng mẻ lớn

nuôi cấy chủng sau khi nhân giống cấp 1 và cấp 2 thu được ở bước 2 trong môi trường BC3, thời gian từ 07 đến 09 ngày, trong đó môi trường BC3 bao gồm các thành phần: sucroza là 100 g/l, cao nấm men là 3 g/l, pepton là 1g/l, K_2HPO_4 là 2g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l; vitamin B1 là 2 mg/l, vitamin B6 là 2 mg/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong ngưỡng từ 8-11%, môi trường nuôi cấy sau tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút qua hệ thống trao đổi nhiệt dạng tấm được hạ nhiệt xuống 35°C , thêm giống 10% rồi được rót qua hệ thống chiết rót tự động để thêm vào các khay có dung tích 3200 ml kích thước 253 x 160 x 80 mm theo thể tích từ 150 – 250 ml qua lỗ tròn trên khay, nuôi cấy ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, các khay này được hấp khử trùng từ trước hoặc được lau cồn và xếp chồng lên nhau;

bước 4: tạo dạng bột tẩy trắng bằng ozon

màng sau khi nuôi cấy thu được ở bước 3 được cho vào các bồn thể tích 10 – 50 m³ có cánh khuấy, tốc độ: 500 – 1000 vòng/phút, theo tỷ lệ màng/nước: 1:1 (khối lượng), rửa sạch 5 lần, trung hòa đến pH 7, sau đó màng được xay nhuyễn với tốc độ 15000 – 20000 vòng/phút trong 5 phút, tẩy màu bằng ozon ở điều kiện nồng độ bột trên 30%, nhiệt độ $25-35^\circ\text{C}$, thời gian tẩy 5 phút, nồng độ ozon 100g/m³, ép loại nước, xay nhuyễn tạo dạng bột, sấy khô ở nhiệt độ 60°C đến khi hàm lượng nước giảm xuống dưới 12%.

3. Quy trình sản xuất xenluloza dạng bột từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 tẩy trắng bằng NaOH 0,5%, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

bước 1: kích hoạt giống

chúng giữ trong ống giữ giống trong glyxerol 10% ở -80°C được lấy ra để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, sau đó cấy truyền sang đĩa Petri có chứa 30 ml môi trường SY, hoặc bình tam giác có chứa 100 ml môi trường SY, môi trường SY bao gồm các thành phần: sucroza là 100 g/l, cao nấm men là 10 g/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có độ pH = 4, nuôi cấy tĩnh ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 03 ngày, môi trường SY được hấp tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút;

bước 2: nhân giống cấp 1 và nhân giống cấp 2

chúng sau kích hoạt ở bước 1 được cấy truyền sang môi trường BC2, môi trường BC2 bao gồm các thành phần: sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 70 g/l, cao nấm men là 3 g/l, Na_2HPO_4 là 2 g/l, K_2HPO_4 là 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có độ pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong khoảng từ 8-11%, đã được tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút, từ một đến hai lần để chuẩn bị đủ lượng mẫu nuôi mẻ lớn, tỷ lệ giống là 10%, nuôi cấy ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, trong thời gian 07 ngày;

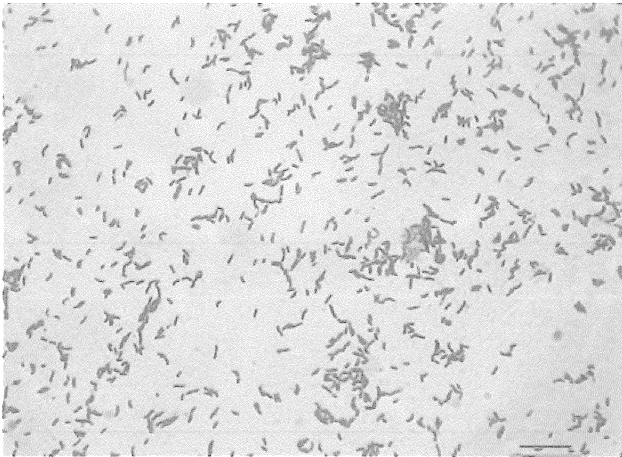
bước 3: nuôi cấy tạo màng mẻ lớn

nuôi cấy chúng sau khi nhân giống cấp 1 và cấp 2 thu được ở bước 2 trong môi trường BC3, thời gian từ 07 đến 09 ngày, trong đó môi trường BC3 bao gồm các thành phần: sucroza là 100 g/l, cao nấm men là 3 g/l, pepton là 1 g/l, K_2HPO_4 là 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2 g/l; vitamin B1 là 2 mg/l, vitamin B6 là 2 mg/l, nước cất – 1 lít, môi trường này có pH = 4, trong đó hàm lượng nitơ tổng của cao nấm men trong ngưỡng từ 8-11%, môi trường nuôi cấy sau tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút qua hệ thống trao đổi nhiệt dạng tấm được hạ nhiệt xuống 35°C , thêm giống 10% rồi được rót qua hệ thống chiết rót tự động để thêm vào các khay có dung tích 3200 ml kích thước 253 x 160 x 80 mm theo thể tích từ 150 – 250 ml qua lỗ tròn trên khay, nuôi cấy ở $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, các khay này được hấp khử trùng từ trước hoặc được lau cồn và xếp chồng lên nhau;

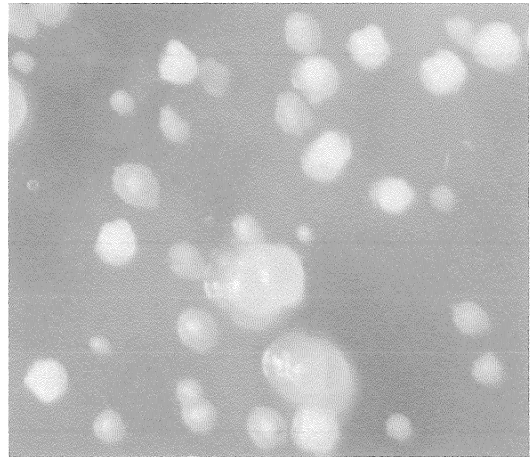
bước 4: tạo dạng bột tẩy trắng bằng NaOH 0,5%

màng sau khi nuôi cấy thu được ở bước 3 được cho vào các bồn thể tích 10 – 50 m³ có cánh khuấy, tốc độ: 500 – 1000 vòng/phút theo tỷ lệ màng/nước: 1:1 (khối lượng), rửa sạch 5 lần, sau đó màng được xay nhuyễn với tốc độ 15000 – 20000 vòng/phút trong 5 phút, màng sau xay nhuyễn được cho vào bồn ngâm với NaOH 0,5% trong 24 tiếng để phá vỡ tế bào, tẩy trắng và trung hòa axit, sau đó ép loại nước, xay nhuyễn tạo dạng bột, sấy khô ở nhiệt độ 60°C đến khi hàm lượng nước giảm xuống dưới 12%.

Hình 1A



Hình 1B



Hình 2



Hình 3 A



Hình 3 B



Hình 4



Hình 5



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh	
<120>	Quy trình sản xuất xenluloza từ chủng <i>Komagataeibacter nataicola</i> BC-B0007	
<160>	1	
<210>	1	
<211>	1420	
<212>	ADN	
<213>	<i>Komagataeibacter nataicola</i> BC-B0007	
<400>	1	
	agcgaacgct ggcggcatgc ttaacacatg caagtcgcac gaacctttcg gggttagtgg	60
	cggacgggtg agtaacgcgt agggatctgt ccacgggtgg gggataactt tgggaaactg	120
	aagctaatac cgcattgacac ctgaggggtca aaggcgcaag tcgcctgtgg aggaacctgc	180
	gttcgattag ctagttggtg gggtaaaggc ctaccaaggc gatgatcgat agctggtctg	240
	agaggatgat cagccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag	300
	tggggaatat tggacaatgg gcgcaagcct gatccagcaa tgccgcgtgt gtgaagaagg	360
	ttttcggatt gtaaagcact ttcagcgggg acgatgatga cggtaaccgc agaagaagcc	420
	ccggctaact tcgtgccagc agccgcggta atacgaaggg ggcaagcggt gctcggaaatg	480
	actgggcgta aaggcgcggt aggcgggtga cacagtcaga tgtgaaattc ctgggcttaa	540
	cctgggggct gcatttgata cgtggcgact agagtgtgag agagggttgt ggaattccca	600
	gtgtagaggt gaaattcgta gatattggga agaacaccgg tggcgaaggc ggcaacctgg	660
	ctcatgactg acgctgaggc gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta	720
	gtccacgctg taaacgatgt gtgctggatg ttgggtgact ttgtcattca gtgtcgtagt	780
	taacgcgata agcacaccgc ctggggagta cggccgcaag gttgaaactc aaaggaattg	840
	acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gcagaacctt	900
	accagggtt gacatgcgga ggccgtgtcc agagatgggc atttctcgca agagacctcc	960
	agcacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc	1020
	aacgagcgca accctcgct ttagttgcca tcacgtctgg gtgggcactc taaaggaact	1080
	gccggtgaca agccggagga aggtggggat gacgtcaagt cctcatggcc cttatgtcct	1140
	gggctacaca cgtgctacaa tggcgggtgac agtgggaagc caggtagcga taccgagccg	1200
	atctcaaaaa gccgtctcag ttcggattgc actctgcaac tcgagtgcatt gaaggtggaa	1260
	tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc	1320
	gcccgtcaca ccatgggagt tggtttgacc ttaagccggt gagcgaaccc gcaaggggcg	1380
	cagccgacca cggtcgggtc agcgactggg gtgaagtcta	1420