



(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)



2-0003146

(51) **C12N 1/20**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00329

(22) 28/09/2020

(67) 1-2020-05569

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/01/2021 394

(73) Trần Thị Thu Hằng (VN)

Số 20, ngõ 466, đường Ngô Gia Tự, phường Đức Giang, quận Long Biên, thành phố Hà Nội

(72) Trần Thị Thu Hằng (VN); Nguyễn Hoàng Anh (VN); Bùi Thị Thu Hiền (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM DẠNG BỘT CỦA VI KHUẨN *VIRGIBACILLUS CAMPISALIS* TT8.5 CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI HISTAMIN TRONG QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT NƯỚC MẮM TRUYỀN THÔNG

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 có khả năng phân giải histamin trong quá trình sản xuất nước mắm truyền thống bao gồm các bước: (1) Hoạt hóa chủng giống; (2) Nhân giống cấp 1; (3) Lên men chính; (4) Thu hồi sinh khối; (5) Làm khô; (6) Nghiền, phối trộn; đóng gói và bảo quản. Trong đó, quy trình theo sáng chế đã xác định các điều kiện thích hợp để hoàn thiện các bước trong quy trình sản xuất chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực sản xuất chế phẩm vi sinh vật. Cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 có khả năng phân giải histamin trong quá trình sản xuất nước mắm truyền thống.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Histamin là một amin sinh học (các hợp chất chứa nitơ, khối lượng phân tử thấp và có hoạt tính sinh học), có công thức phân tử là $C_5H_9N_3$, danh pháp hóa học là 2-(3H-imidazol-4-yl)etanamin. Nó là 1 hợp chất dị vòng, có 2 nhóm amin (diamin), dạng tinh thể, dễ hút ẩm, nhiệt độ nóng chảy $83,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, nhiệt độ sôi $209,5^{\circ}\text{C}$, dễ hòa tan trong nước và etanol, tan rất ít trong dietyl ete.

Trong cơ thể người, histamin là một chất nội sinh được tạo ra một cách tự nhiên qua quá trình decarboxyl hóa axit amin histidin với sự xúc tác của histidin decarboxylaza. Enzym này chỉ được tổng hợp khi cần thiết và bị phân hủy ngay khi lượng histamin nội sinh được sinh tổng hợp đủ (xem Báo cáo của FAO-WHO. 2013. Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products, July 23–27, 2012. Rome, Italy: FAO). Histamin có thể được tìm thấy trong các tế bào mast, tập trung nhiều ở mũi, miệng, thành mạch máu, v.v.. Hợp chất này tham gia vào khoảng 23 chức năng sinh lý như điều chỉnh nhiệt độ và trọng lượng cơ thể, kiểm soát giấc ngủ và sự tỉnh táo, tiết axit ở dạ dày, làm lành vết thương, làm giảm huyết áp, v.v (xem Noszal, B. *et al.*, "Histamine: fundamentals of biological chemistry" (2004), *In Falus, A.; Grosman, N.; Darvas, Z. Histamine: Biology and Medical Aspects*, Budapest: SpringMed. pp. 15–28).

Histamin nội sinh ở nồng độ nhất định cần thiết cho chức năng sinh lý bình thường nhưng histamin xâm nhập vào cơ thể với liều lượng lớn sẽ gây độc cho một loạt các cơ quan trong cơ thể. Ngộ độc histamin thường gây ra các triệu chứng như sổ mũi, hen suyễn (do co thắt phế quản), nổi mề đay, phát ban, ngứa, phù (mí mắt, môi sưng húp), làm viêm, đỏ kết mạc mắt, gây sự tiết quá độ dịch vị ở dạ dày, tiêu chảy, đau đầu, nôn mửa, gây giãn mạch, hạ huyết áp, tim đập nhanh và co thắt tim (Mah và cộng sự, Characterization of biogenic amine-producing microorganisms isolated from

Myeolchi-Jeot., Korean slated and fermented anchovy, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol 13, pp. 362-699, 2003).

Histamin trong thực phẩm được hình thành bởi sự tách nhóm α -carboxyl ra khỏi axit amin histidin. Histidin là một trong các axit amin không thay thế mà cơ thể người không tự tổng hợp, được cung cấp từ thức ăn. Histidin thường được tìm thấy trong thực phẩm như cá, thịt, trứng và các sản phẩm từ sữa. Sự tách nhóm carboxyl của axit amin diễn ra do hoạt động của enzym decarboxylaza có trong nguyên liệu hoặc do các vi sinh vật sinh ra (xem Shalaby, A.R., Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International* 29, pp. 675–690, 1996). Các vi sinh vật này có thể có sẵn trong nguyên liệu hoặc xuất hiện trong quá trình xử lý nguyên liệu và trong quá trình chế biến thực phẩm. Trong các sản phẩm lên men từ cá, histamin được hình thành với hàm lượng lớn. Nguyên nhân có thể là do điều kiện lên men đã đáp ứng các yêu cầu cần thiết cho sự sinh histamin như mức độ sẵn có của axit amin histidin tự do, sự hiện diện của vi khuẩn sinh enzym decarboxylaza, và các điều kiện cho phép sự phát triển của vi khuẩn này. Hàm lượng histamin rất cao được ghi nhận đối với các loại nước mắm khác nhau, như 200-600mg/L trong nước mắm Thái, 1380mg/L trong nước mắm Hàn Quốc (xem Brillantes và Samosorn, Determination of histamine in fish sauce from Thailand using a solid phase extraction and high-performance liquid chromatography, *Fisheries science* 67, pp. 1163-1168 (2001)), nước mắm nukazuke ở Nhật 383-1172mg/L (xem Kuda và cộng sự 2012). Các sản phẩm nước mắm thương mại được tìm thấy có hàm lượng histamin dao động từ 100 đến 1000mg/kg. Như vậy, nhiều sản phẩm nước mắm hiện nay chứa hàm lượng histamin vượt quá tiêu chuẩn.

Nước mắm truyền thống của Việt Nam là một sản phẩm lên men dài ngày từ cá biển, được sử dụng như một loại gia vị. Nó được coi là một nguồn protein và các axit amin quan trọng. Theo một số báo cáo, nước mắm của Việt Nam có hàm lượng histamin dao động từ khoảng 700 – 3.000 mg/kg (xem <http://www.vusta.gov.vn/News/tintuc/tinhoatdong/2013/04/25.aspx>, 15/04/2013). Theo báo Tiền Phong online, ngay cả nước mắm có chất lượng tốt nhất là nước mắm Phú Quốc cũng có tới 60-70% mẫu nước mắm đem phân tích vượt quá chỉ tiêu này (<http://www.tienphong.vn/kinh-te/chao-dao-thuong-hieu-nuoc-mam-phu-quoc-640623.tpo>, 09/08/2013). Ở nước ta, nước mắm truyền thống được sản xuất ở nhiều tỉnh thành dọc theo bờ biển dài hơn 3200 km với khoảng 2.800 cơ sở sản xuất, sản lượng lên tới hơn 215 triệu lít /năm, giá trị đạt hơn 4.800 tỷ đồng.

Việt Nam cùng với Thái Lan là hai nước sản xuất nước mắm lớn nhất thế giới. Trong đó, nhiều nhãn hiệu nước mắm của Việt Nam có chất lượng nổi trội hơn so với sản phẩm của Thái Lan về cả thành phần hóa học (hàm lượng nitơ tổng số và nitơ amin) cũng như về hương, vị. Tuy nhiên, sản lượng xuất khẩu nước mắm của Việt

Nam luôn thấp hơn rất nhiều so với Thái Lan. Theo Chất lượng Việt Nam online, hiện nay, sản lượng xuất khẩu nước mắm của Việt Nam chỉ chiếm khoảng từ 3-5% so với sản lượng sản xuất, mang về giá trị ngoại tệ chỉ khoảng 15 triệu USD (<http://vietq.vn/moi-nam-viet-nam-tieu-thu-215-trieu-lit-nuoc-mam-xuat-khau-mang-lai-15-trieu-usd-d105312.html>, 11/10/2016).

Nguyên nhân chính của sản lượng xuất khẩu thấp là do chúng ta chưa xây dựng được thương hiệu nước mắm Việt Nam ở nước ngoài. Hiện nay, nhà nước cũng như các Hiệp hội nước mắm ở một số vùng miền đang xúc tiến công việc này. Ngoài ra, một vấn đề quan trọng khác là nước mắm truyền thống của Việt Nam thường gặp rào cản kỹ thuật với một số chỉ tiêu chất lượng vượt quá tiêu chuẩn quốc tế. Một trong những chỉ tiêu chất lượng quan trọng là hàm lượng histamin. Theo tiêu chuẩn Codex 302-2011 dành cho nước mắm của Ủy ban tiêu chuẩn thực phẩm quốc tế, histamin được coi là một mối nguy trong nước mắm và quy định hàm lượng hợp chất này không quá 400mg/kg. Mỹ và Canada đưa ra các mức quy định hàm lượng tối đa lần lượt là 500ppm và 200ppm. Các sản phẩm nước mắm thương mại được tìm thấy có hàm lượng histamin dao động từ 100 đến 1000mg/kg.

Hiện nay, việc ứng dụng các vi khuẩn có chứa các enzym phân giải histamin đang nổi lên như là một phương pháp hữu hiệu trong việc giảm hàm lượng histamin trong thực phẩm lên men. Một số nước như Đài Loan, Malaysia, và Thái Lan đã nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật trong việc làm giảm hàm lượng histamin trong các sản phẩm lên men từ cá nói chung, cũng như với nước mắm nói riêng.

Histamin được phân giải thông qua quá trình oxy hóa tách nhóm amin (oxidative deamination) được xúc tác bởi enzym histamin oxidaza hoặc histamin dehydrogenaza được sinh ra từ một số vi sinh vật. Trong đó, histamin oxidaza xúc tác chuyển hóa histamin, với sự có mặt của nước và oxy, thành imidazol axetadehyt, amoniac và hydro peroxit. Histamin oxidaza được tìm thấy trong *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Arthrobacter crystallopoietes*, và *Brevibacterium linens*. Bên cạnh đó, một số vi khuẩn sử dụng enzym histamin dehydrogenaza để xúc tác phản ứng oxy hóa tách nhóm amin thành các sản phẩm là imidazole axetadehyt và ammonia. Một số vi khuẩn sản sinh ra enzym này bao gồm *Rhizobium* sp., *Nocardioides simplex*, và *Natrinema gari* (Lee et al, 2015).

Có thể nhận thấy rất rõ ràng rằng việc bổ sung các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải histamin vào thực phẩm trước quá trình lên men là hướng đi có tính khả thi cao, với tỷ lệ phân giải histamin đạt khoảng trên 30%. Bên cạnh đó, sử dụng vi sinh vật thường có chi phí thấp, không cần trang thiết bị đặc biệt. Tuy nhiên, để áp dụng phương pháp vi sinh vật, cần có các nghiên cứu tỉ mỉ, cụ thể vì mỗi một loại

thực phẩm sẽ có các chủng vi sinh vật khác nhau phù hợp với thực phẩm đó trong việc phân giải histamin. Các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng phát triển và phân giải histamin của vi sinh vật cần được xác định chính xác.

Chủng vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 đã được nhóm nghiên cứu phân lập từ chượp mắm truyền thống và được xác định có khả năng phân giải histamin trong môi trường nuôi cấy cũng như trong quá trình lên men nước mắm, với khả năng phân giải histamin đạt khoảng 30-40%, được nộp lưu tại.... với số nộp lưu..... Để thuận tiện trong quá trình sử dụng và bảo quản chủng vi khuẩn này, chủng vi khuẩn cần được sản xuất tạo chế phẩm dạng bột. Do đó, sản xuất chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 cần có quá trình nghiên cứu, hoàn thiện quy trình sản xuất, điều kiện và thông số kỹ thuật cụ thể trên cơ sở sản xuất chế phẩm dạng bột của vi khuẩn nói chung, từ đó tạo ra được chế phẩm đảm bảo chất lượng. Ở Việt Nam, cho tới nay chưa có bất kỳ nghiên cứu nào liên quan đến việc sản xuất tạo chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 có khả năng giảm histamin trong nước mắm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 có khả năng phân giải histamin trong quá trình sản xuất nước mắm truyền thống hữu ích trong giảm hàm lượng hợp chất này trong nước mắm truyền thống thành phẩm. Quy trình theo sáng chế bao gồm các bước:

- a. Hoạt hóa chủng giống
- b. Nhân giống cấp 1
- c. Lên men chính
- d. Thu hồi sinh khối
- e. Làm khô
- f. Nghiền, phối trộn, bao gói, bảo quản

Chủng *Virgibacillus campisalis* TT8.5 là chủng vi khuẩn được phân lập từ chượp mắm truyền thống được lưu giữ tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam với mã số nộp lưu TT8.5. Khi bổ sung chủng này vào giai đoạn đầu của quá trình lên men nước mắm, chủng có khả năng phân giải histamin trong chượp, giúp cho hàm lượng histamin trong nước mắm thành phẩm giảm được 28% so với nước mắm thu từ chượp không bổ sung chủng. Chủng *Virgibacillus campisalis* TT8.5 là vi khuẩn ưa mặn, cần một số điều kiện dinh dưỡng và nuôi cấy nhất định trong quá trình lên men thu sinh khối để sản xuất chế phẩm.

Chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 thu được từ quy trình theo sáng chế đã được phân tích tại Trung tâm kỹ thuật tiêu chuẩn đo lường

chất lượng. Kết quả cho thấy, chế phẩm đạt mật độ 10^7 CFU/g và bảo đảm an toàn thực phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 có khả năng phân giải histamin trong quá trình sản xuất nước mắm truyền thống theo sáng chế.

Hình 2 thể hiện hình ảnh chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 thu được từ quy trình theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sơ đồ được thể hiện ở Hình 1, quy trình sản xuất chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 có khả năng phân giải histamin trong quá trình sản xuất nước mắm truyền thống theo sáng chế bao gồm các bước như sau:

a) Hoạt hóa chủng giống

Chủng giống vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 được lưu trữ tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam với mã số nộp lưu TT8.5 dưới hình thức lạnh đông sâu trong glyxerol.

Giống lưu giữ được hoạt hóa trên môi trường có nồng độ muối cao (HA-halophilic) gồm các thành phần được trình bày trong Bảng 1 trong thời gian hoạt hóa 36h ở 37°C trước khi sử dụng nhằm đảm bảo sức sống và độ thuần khiết.

Bảng 1. Thành phần môi trường HA hoạt hóa và nuôi cấy chủng

Virgibacillus campisalis TT8.5

STT	Thành phần	g/lít
1	NaCl	26
2	Axit casamino	5
3	Cao nấm men	5
4	KCl	2
5	Natri glutamat	1
6	Natri xitrat	3
7	MgSO ₂ .7H ₂ O	20
8	FeCl ₃ .4H ₂ O	0,036
9	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00036
pH		8,0

b) Nhân giống cấp 1

Khuẩn lạc đơn từ bước hoạt hoá được sử dụng để nhân giống cấp 1. Chuyển sinh khối tế bào từ một khuẩn lạc đơn vào 500ml môi trường HA (độ mặn 2,6%) (bình nón 1000ml). Giống cấp 1 được nuôi trong điều kiện 32°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau 24 giờ, kiểm tra mức độ thuần khiết của giống cấp 1 dựa vào quan sát tiêu bản và cấy ria quan sát khuẩn lạc trên môi trường HA.

c) Lên men chính

Chuyển giống cấp 1 vào môi trường HA (đã được khử trùng ở 121°C/30 phút) theo tỷ lệ giống/ môi trường HA là 1% (thể tích/thể tích). Quá trình nuôi cấy được thực hiện theo chương trình sau:

- Nhiệt độ nuôi cấy: duy trì ở 32°C
- pH môi trường được điều chỉnh về 8,0 và không điều chỉnh trong quá trình nuôi cấy.
- Tốc độ khuấy: Tốc độ khuấy ban đầu được cài đặt ở 50 vòng/phút, tăng dần tốc độ khuấy với bước nhảy 20 sau mỗi 6 giờ lên men cho đến khi đạt giá trị 200 vòng/phút và duy trì cho đến cuối quá trình lên men.
- Độ thông khí: Độ thông khí ban đầu được cài đặt ở 10L/phút (tương đương 0,2 v/v/min), tăng dần mức độ thông khí với bước nhảy 0,1 sau mỗi 6 giờ lên men cho đến khi đạt giá trị 50L/phút (tương đương 1 v/v/min) thì duy trì cho đến cuối quá trình lên men.
- Thời gian nuôi cấy: 72 giờ

Kiểm tra mật độ vi khuẩn của dịch nuôi cấy ở giai đoạn cuối nuôi cấy để đánh giá hiệu quả của quá trình nuôi cấy.

d) Thu hồi sinh khối

Sinh khối tế bào sau nuôi cấy được thu hồi bằng hệ thống lọc tiếp tuyến:

- Màng lọc: Dạng cartridge, cỡ lỗ 0,2µm cho phép khoáng và các vật chất hòa tan hoặc nhỏ hơn lỗ màng được loại bỏ, trong khi sinh khối tế bào vi khuẩn được giữ lại.
- Tốc độ bơm nhu động: Duy trì ở tốc độ 300 vòng/phút
- Áp suất dòng đầu vào: Duy trì ở mức 0,2 bar (~0,197atm)
- Độ mở đường thải: Mở tự do

Kiểm tra mật độ vi khuẩn của dịch sinh khối cô đặc để đánh giá hiệu quả thu hồi sinh khối và tính toán tỷ lệ phối trộn chất mang phù hợp.

e) Làm khô

Dịch sinh khối cô đặc được phối trộn với chất mang (bột đậu tương đã được xử lý nhiệt ở 80°C trong 12-14 giờ) với tỷ lệ 1/1,5. Hỗn hợp được làm khô trên máy sấy lạnh với các thông số cài đặt như sau:

- Nhiệt độ sấy: 40°C
- Độ ẩm thành phẩm được thiết lập dưới 10%

Quá trình sấy kết thúc khi sản phẩm đạt được độ ẩm theo thông số cài đặt. Sản phẩm sau làm khô được tiến hành lấy mẫu và kiểm tra mật độ vi khuẩn để đánh giá hiệu quả của quá trình làm khô.

f) Nghiền – Phối trộn

Sản phẩm sau sấy khô được tiến hành nghiền mịn trên máy nghiền inox với cỡ lỗ sàng 0,4mm. Sản phẩm sau nghiền được phối trộn với chất mang bột đậu tương (đã được xử lý ở 80°C trong 12-14 giờ) để đạt được thành phẩm cuối cùng. Thành phẩm được tiến hành kiểm tra mật độ vi khuẩn trước khi tiến hành đóng gói và bảo quản.

g) Đóng gói, bảo quản

Chế phẩm vi khuẩn dạng bột khô được đóng trong các túi nhôm và được bảo quản ở điều kiện lạnh, 4-6°C.

Kết quả kiểm nghiệm chế phẩm vi khuẩn thu được nêu trên có mật độ tế bào đạt 10^7 CFU/g.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 có quy mô 50 lít/mẻ nuôi cấy.

a) Hoạt hóa chủng giống

Giống lưu giữ được hoạt hóa trên môi trường thạch HA. Thời gian hoạt hóa 36h ở 37°C trước khi sử dụng nhằm đảm bảo sức sống và độ thuần khiết.

b) Nhân giống cấp 1

Khuẩn lạc đơn được sử dụng để nhân giống cấp 1. Chuyển sinh khối tế bào từ một khuẩn lạc đơn vào 500ml môi trường HA (độ mặn 2,6%) (bình nón 1000ml). Giống cấp 1 được nuôi trong điều kiện 32°C, tốc độ lắc 200rpm (vòng/phút). Sau 24

giờ, kiểm tra mức độ thuần khiết của giống cấp 1 dựa vào quan sát tiêu bản và cấy ria quan sát khuẩn lạc trên môi trường HA.

c) Lên men chính

Chuyển toàn bộ 500ml giống cấp 1 vào 50 lít môi trường HA (đã được khử trùng ở 121°C/30 phút). Quá trình nuôi cấy được thực hiện theo chương trình sau: nhiệt độ nuôi cấy duy trì ở 32°C; pH môi trường được điều chỉnh về 8,0 và không điều chỉnh trong quá trình nuôi cấy; tốc độ khuấy: tốc độ khuấy ban đầu được cài đặt ở 50 rpm, tăng dần tốc độ khuấy với bước nhảy 20 sau mỗi 6 giờ lên men cho đến khi đạt giá trị 200rpm và duy trì cho đến cuối quá trình lên men; độ thông khí: độ thông khí ban đầu được cài đặt ở 10 L/phút (tương đương 0,2 v/v/min), tăng dần mức độ thông khí với bước nhảy 0,1 sau mỗi 6 giờ lên men cho đến khi đạt giá trị 50 L/phút (tương đương 1 v/v/min) thì duy trì cho đến cuối quá trình lên men; thời gian nuôi cấy là 72 giờ.

Mật độ tế bào sau nuôi cấy đạt 10^7 CFU/ml.

d) Thu hồi sinh khối

Sinh khối tế bào sau nuôi cấy được thu hồi bằng hệ thống lọc tiếp tuyến: màng lọc dạng cartridge hàng WaterSep với diện tích màng 5 m² và cỡ lỗ 0,2µm cho phép khoáng và các vật chất hòa tan hoặc nhỏ hơn lỗ màng được loại bỏ, trong khi sinh khối tế bào vi khuẩn được giữ lại; tốc độ bơm nhu động được duy trì ở tốc độ 300 vòng/phút; áp suất dòng đầu vào được duy trì ở mức 0,2 bar; độ tự do đường thải; mức độ cô đặc đạt 10 lần (thể tích dịch sinh khối thu lại bằng 1/10 thể tích dịch nuôi cấy ban đầu).

Mật độ tế bào đạt 10^8 CFU/ml.

e) Làm khô

Dịch sinh khối cô đặc được phối trộn với bột đậu tương (đã được xử lý nhiệt ở 80°C trong 12-14 giờ) với tỷ lệ 1/1,5. Hỗn hợp được làm khô trên máy sấy lạnh MSL 1500 với các thông số cài đặt như sau: nhiệt độ sấy: 40 °C; độ ẩm thành phẩm được cài đặt dưới 10 %.

Chế phẩm có độ ẩm đạt 8%. Mật độ vi khuẩn đạt 10^8 CFU/g.

f) Nghiền – Phối trộn

Sản phẩm sau sấy khô được tiến hành nghiền mịn trên máy nghiền inox với cỡ lỗ sàng 0,4 mm. Sản phẩm sau nghiền được phối trộn với chất mang bột đậu tương đã được xử lý ở 80°C trong 12-14 giờ để đạt được thành phẩm cuối cùng.

g) Đóng gói, bảo quản

Chế phẩm vi khuẩn dạng bột khô được đóng trong các túi nhôm và được bảo quản ở điều kiện lạnh, 4-6°C. Kết quả kiểm nghiệm chế phẩm vi khuẩn thu được nêu trên có mật độ tế bào đạt 10^7 CFU/g. Hình 2 mô tả hình ảnh chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 sau khi được đóng gói.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Lần đầu tiên tại Việt Nam, quy trình sản xuất chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 có khả năng phân giải histamin được nghiên cứu hoàn thiện.

Chế phẩm này khi được bổ sung vào chượp mắm trong quá trình lên men giúp giảm hàm lượng histamin-hợp chất gây ngộ độc thực phẩm trong nước mắm thành phẩm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5 có khả năng phân giải histamin trong quá trình sản xuất nước mắm truyền thống bao gồm các bước:

(a) hoạt hóa chủng giống:

hoạt hóa chủng giống *Virgibacillus campisalis* TT8.5 được lưu trữ tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam với mã số nộp lưu TT8.5 trên môi trường thạch có nồng độ muối cao (HA- halophilic) gồm các thành phần như sau (tính cho mỗi lít môi trường): 26g NaCl, 5g axit cassamino, 5g cao nấm men, 2g KCl, 1g natri glutamat, 3g natri xitrat, 20g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,036g $FeCl_3 \cdot 4H_2O$, 0,00036g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, điều chỉnh pH=8,0 trong thời gian 36h ở 37°C để đảm bảo sức sống, độ thuần khiết của chủng giống và thu được khuẩn lạc;

(b) nhân giống cấp 1:

sử dụng khuẩn lạc đơn từ bước (a) để nhân giống cấp 1 trong 500ml môi trường HA có độ mặn 2,6% trong bình nón 1000ml trong điều kiện 32°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong thời gian 24h để thu được giống cấp 1;

(c) lên men chính:

lên men giống cấp 1 với tỷ lệ giống cấp 1 và môi trường lên men là 1% (thể tích/thể tích) trong điều kiện gồm: nhiệt độ duy trì ở 32°C; pH môi trường được điều chỉnh về 8,0 và không điều chỉnh trong quá trình lên men; tốc độ khuấy ban đầu là 50 vòng/phút và tăng dần tốc độ khuấy với bước nhảy 20 sau mỗi 6 giờ lên men cho đến khi đạt giá trị 200 vòng/phút và duy trì cho đến cuối quá trình lên men; độ thông khí ban đầu là 10L/phút, tăng dần mức độ thông khí với bước nhảy 0,1 sau mỗi 6 giờ lên men cho đến khi đạt giá trị 50L/phút và duy trì cho đến cuối quá trình lên men trong thời gian 72 giờ để thu được dịch lên men có mật độ vi khuẩn đạt 10^8 CFU/g;

(d) thu sinh khối

thu sinh khối tế bào sau nuôi cấy bằng lọc tiếp tuyến dịch lên men sử dụng màng lọc có dạng cartridge, cỡ lỗ 0,2 μ m; tốc độ bơm nhu động duy trì ở 300 vòng/phút; áp suất dòng đầu vào duy trì ở mức 0,2 bar (~0,197atm);

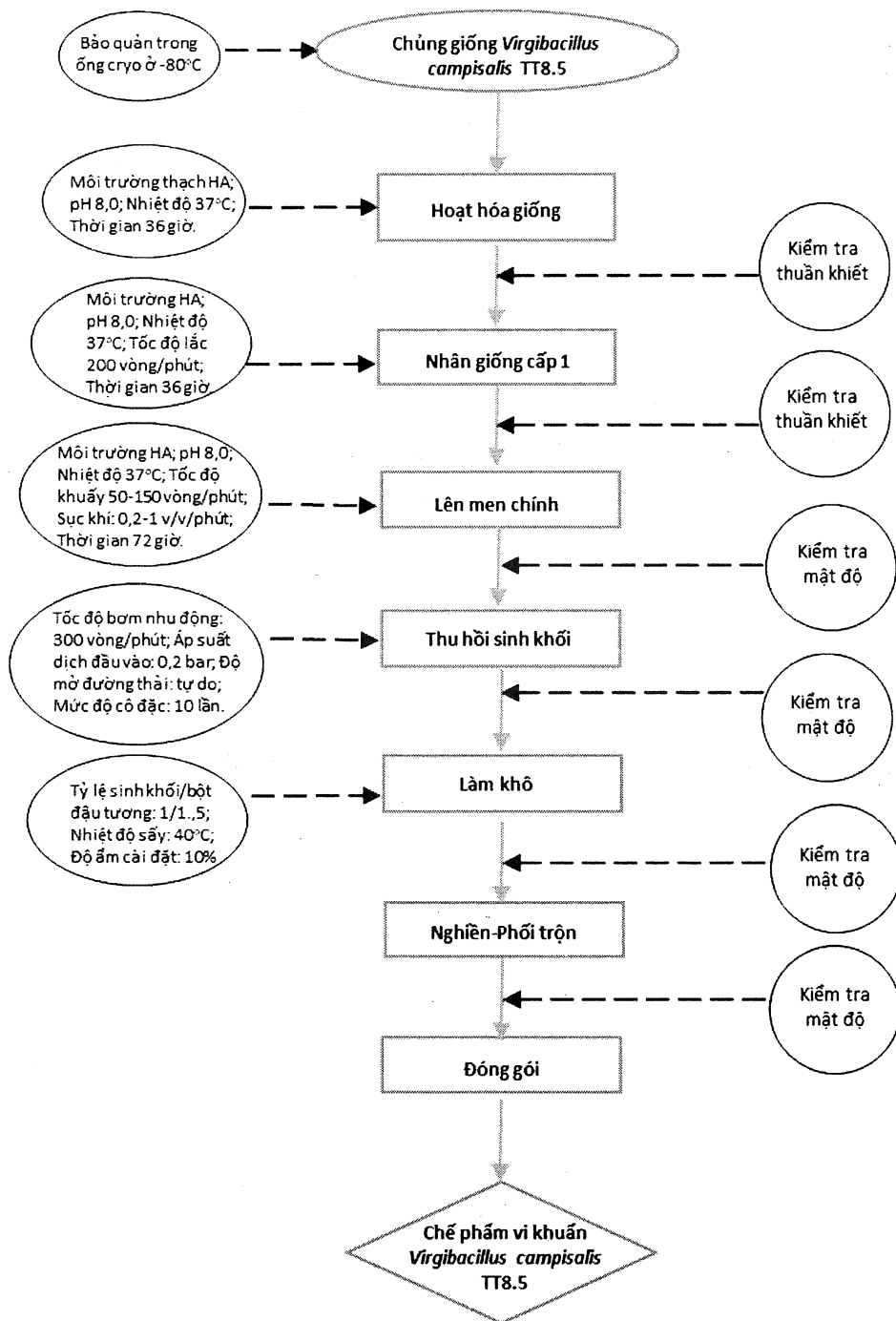
(e) làm khô sinh khối

phối trộn dịch sinh khối thu được từ bước (d) với bột đậu tương đã được xử lý nhiệt ở 80°C trong 12-14 giờ với tỷ lệ dịch sinh khối: bột đậu tương là 1/1,5; làm khô hỗn hợp thu được trên máy sấy lạnh ở nhiệt độ sấy là 40°C đến khi đạt được độ ẩm dưới 10%;

(f) nghiền, phối trộn, đóng gói, bảo quản

tiến hành nghiền mịn hỗn hợp sau sấy khô với cỡ lỗ sàng 0,4mm, phối trộn sản phẩm sau nghiền với bột đậu tương đã được xử lý ở 80°C trong 12-14 giờ với tỷ lệ sản phẩm sau nghiền: bột đậu tương là 1/2 để thu được chế phẩm dạng bột của vi khuẩn *Virgibacillus campisalis* TT8.5; đóng trong các túi nhôm và bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 4-6°C.

1/2



Hình 1

2/2



Hình 2