



(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) 
1-0019686

(51)⁷ **C11B 3/16, B01J 13/04, C12G 1/00,**
1/06, C12N 11/00, 11/04, C12C 11/00

(13) **B**

(21) 1-2012-03387

(22) 14.11.2012

(45) 27.08.2018 365

(43) 26.05.2014 314

(73) **ĐẠI HỌC QUỐC GIA THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH (VN)**
Phường Linh Trung, quận Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh.

(72) Lê Văn Việt Mẫn (VN), Lê Hoàng Du (VN)

(54) **PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ BỆ LÁ CỦA CÂY CHUỐI (MUSA SP.) THÀNH CHẤT MANG VÀ PHƯƠNG PHÁP CỐ ĐỊNH NẤM MEN TRÊN CHẤT MANG NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp xử lý phân bẹ lá của cây chuối (Musa asp.) thành chất mang và phương pháp cố định nấm men trên chất mang thu được để tạo ra chế phẩm nấm men cố định. Bẹ lá chuối được ngâm trong dung dịch NaOH với nồng độ từ 0,05 đến 0,20 mol/lít ở 30-40°C trong thời gian 30-90 phút để tách bớt các hợp chất phenolic có thể gây ức chế hoạt tính nấm men, sau đó được đem tiệt trùng ở 121°C trong thời gian 10-20 phút và làm nguội trước khi cố định tế bào. Trong quá trình cố định, các tế bào nấm men sẽ tự hấp phụ lên chất mang khi nuôi cấy nấm men trên môi trường dinh dưỡng có bổ sung các miếng chất mang. Để làm tăng mật độ tế bào trên chất mang, các miếng chất mang có chứa nấm men sau giai đoạn nuôi cấy sẽ được rửa bằng môi trường dinh dưỡng rồi đem ủ trong một thùng rộng vô trùng trước khi được đem sử dụng trong các quá trình lên men. Phương pháp cố định nấm men trên bẹ lá chuối có thể được dùng cho các chủng nấm men trong sản xuất ethanol, bia, rượu vang và nước trái cây lên men có chứa ethanol.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp xử lý phần bẹ lá của cây chuối làm chất mang và phương pháp cố định nấm men trên chất mang thu được để tạo ra chế phẩm nấm men cố định. Chế phẩm nấm men cố định có thể được sử dụng trong công nghiệp lên men sản xuất ethanol, bia, rượu vang và nước trái cây lên men có chứa ethanol.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dựa vào nguồn gốc, các chất mang để cố định tế bào vi sinh vật có thể được chia thành hai nhóm: chất mang tự nhiên và chất mang tổng hợp. Dựa vào thành phần hóa học, chất mang có thể là vật liệu vô cơ hoặc hữu cơ hoặc có chứa cả hai loại vật liệu. Tùy theo nguồn gốc và bản chất hóa học mà phương pháp sản xuất các loại chất mang sẽ khác nhau. Một số sáng chế Mỹ đã giới thiệu phương pháp sản xuất vật liệu có thể được ứng dụng để làm chất mang cố định tế bào nấm men như sáng chế Mỹ số 7838641 (2010) trình bày phương pháp sản xuất alginat. Alginat có nhiều ứng dụng trong công nghiệp và một trong những ứng dụng của alginate là làm chất mang cố định nấm men và các vi sinh vật khác.

Trong những năm gần đây, nhóm chất mang để cố định nấm men có nguồn gốc từ thân cây được nhiều người quan tâm như thân cây mía (Vasconcelos và cộng sự, Brazilian Journal of Chemical Engineering, Tập 21, trang 357 – 365, năm 2004), thân cây bắp (Vucurovic và cộng sự, Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, Tập 14, trang 235–238, năm 2008), thân cỏ lau (Chandel và cộng sự, Bioresource Technology, Tập 100, trang 2404-2410, năm 2009)... Những chất mang này là phụ phẩm ngành nông nghiệp nên rẻ tiền và dễ tìm. Với thành phần hóa học chủ yếu là cellulose, nhóm chất mang này có độ bền lý, hóa và sinh khá tốt trong các quá trình lên men sản xuất ethanol, bia, rượu vang và nước trái cây lên men có chứa ethanol. Hầu hết các chất mang này không chứa các thành phần hóa học ảnh hưởng không tốt đến chất lượng sản phẩm. Một ưu điểm khác là chất mang có nguồn gốc từ thân cây sẽ có cấu trúc xốp nên cố định được nhiều tế bào nấm men hơn so với các loại chất mang khác. Ngoài ra, một số loại thân cây sau khi cắt nhỏ, rửa với nước và tiệt trùng là có thể đưa vào cố định tế bào ngay mà

không cần phải qua các công đoạn xử lý phức tạp khác. Từ trước đến nay, chưa có công bố nào về việc sử dụng phần bẹ lá chuối để làm chất mang cố định tế bào nấm men và các vi sinh vật khác.

Có nhiều phương pháp để cố định nấm men trên chất mang. Tùy theo các tính chất hóa lý của chất mang mà phương pháp cố định nấm men lên chất mang sẽ khác nhau. Một số sáng chế Mỹ số đã giới thiệu phương pháp cố định cố định nấm men trên các loại chất mang khác nhau như sáng chế Mỹ số 5070019 (năm 1991) đã mô tả phương pháp cố định nấm men trên chất mang alginat.

Để cố định nấm men trên chất mang có nguồn gốc từ thân cây, người ta cho các tế bào nấm men và những miếng chất mang đã qua xử lý vào một môi trường dinh dưỡng. Sau một khoảng thời gian nuôi cấy, các tế bào nấm men sẽ tự sinh trưởng và hấp phụ lên bề mặt chất mang; một số tế bào sẽ khuếch tán vào bên trong cấu trúc xốp của chất mang. Cuối cùng, người ta vớt các miếng chất mang có chứa tế bào cố định ra khỏi môi trường nuôi cấy để đem rửa với nước vô trùng rồi sử dụng chúng trong các quá trình lên men công nghiệp. Đến nay, chưa có công bố nào về phương pháp cố định nấm men trên chất mang có nguồn gốc từ bẹ lá chuối.

Sử dụng tế bào nấm men cố định trên chất mang trong các quá trình lên men công nghiệp sẽ mang lại nhiều ưu điểm cho nhà sản xuất so với trường hợp sử dụng nấm men không được gắn trên chất mang (nấm men tự do). Các ưu điểm là hoạt tính lên men của nấm men cố định sẽ cao hơn nấm men tự do vì chất mang sẽ “bảo vệ” nấm men trước những tác động stress xuất hiện trong quá trình lên men; thời gian lên men của nấm men cố định ngắn hơn; khi kết thúc quá trình lên men, kỹ thuật tách nấm men cố định ra khỏi bình lên men sẽ đơn giản và dễ dàng hơn so với nấm men tự do; nấm men cố định có thể tái sử dụng được nhiều lần trong phương pháp lên men theo chu kỳ; nấm men cố định rất thích hợp để ứng dụng trong phương pháp lên men liên tục... Một số sáng chế Mỹ đã trình bày ứng dụng nấm men cố định để lên men sản xuất ra nhiều loại sản phẩm khác nhau như sáng chế Mỹ số 5869117 (năm 1999) mô tả phương pháp sử dụng nấm men cố định trên caragenan để lên men sản xuất bia, sáng chế Mỹ số 5070019 (năm 1991) mô tả phương pháp sử dụng nấm men cố định trên alginat để lên men sản xuất rượu vang sủi bọt.

Sáng chế này giới thiệu phương pháp xử lý phần bẹ lá của cây chuối làm chất mang và cố định tế bào nấm men trên chất mang này để ứng dụng trong công nghiệp lên

men. Phương pháp cố định tế bào trên các miếng chất mang từ bẹ lá chuối trong sáng chế này sẽ làm tăng cao số tế bào nấm men tính trên 1 gam chất khô của chất mang so với phương pháp đang được sử dụng để cố định nấm men lên các miếng chất mang là “thân cây” hiện nay.

Các tài liệu đã trích dẫn

Sáng chế Mỹ số 5070019 (12/1991), Hill

Sáng chế Mỹ số 5869117 (2/1999), Neufeld và cộng sự

Sáng chế Mỹ số 7838641 (11/2010), Hjelland

De Vasconcelos, J.N. et al. , “Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks”, Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol. 21 (2004) 357 – 336
Vucurovic V. et al., “A corn stem as biomaterial for *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilization for the ethanol production”, Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, Vol. 14 (2008) 235–238

Chandel A.K. et al., “Use of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3”, Bioresource Technology, Vol. 100 (2009) 2404-2410

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp xử lý bẹ lá chuối thành chất mang và phương pháp cố định tế bào nấm men lên chất mang này để ứng dụng trong công nghiệp lên men.

Phương pháp xử lý bẹ lá chuối thành chất mang theo sáng chế bao gồm các bước:

- (i) cắt phần bẹ lá chuối theo chiều ngang thành những miếng chất mang với chiều cao 0,5-3,0 cm;
- (ii) ngâm các miếng chất mang trong dung dịch NaOH nồng độ từ 0,05 đến 0,20 mol/lít, gia nhiệt lên đến 30-40 °C, khuấy đảo với tốc độ 5-50 vòng/phút và giữ trong khoảng nhiệt độ này trong thời gian 30-90 phút;
- (iii) ngâm các miếng chất mang trong nước rửa để tách NaOH bám trên chất mang cho đến khi nước rửa trung tính;
- (iv) tiệt trùng các miếng chất mang trong nước ở 121 °C trong thời gian 10-20 phút, làm nguội và đem đi cố định nấm men.

Phương pháp cố định tế bào nấm men trên chất mang bẹ lá chuối theo sáng chế bao gồm các bước:

- (i) cho các miếng chất mang, tế bào nấm men vào thiết bị nuôi cấy đã chứa sẵn môi trường dinh dưỡng vô trùng và nuôi ở 20-35 °C trong thời gian 6-24 giờ với tốc độ khuấy đảo 5-50 vòng/phút;
- (ii) tách các miếng chất mang có chứa tế bào cố định ra khỏi thiết bị nuôi cấy và ngâm chúng trong môi trường dinh dưỡng đã được vô trùng;
- (iii) tách các miếng chất mang ra để cho vào một cái thùng rộng vô trùng và ủ ở 20-35 °C trong thời gian 3-18 giờ;
- (iv) lấy các miếng chất mang ra khỏi thùng để sử dụng ngay cho quá trình lên men.

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp xử lý bẹ lá chuối để làm chất mang cố định tế bào nấm men và phương pháp cố định nấm men trên bẹ lá chuối với giải pháp làm tăng số tế bào có trên 1 gam chất khô của chất mang.

Phương pháp xử lý bẹ lá chuối sẽ làm giảm hàm lượng phenolic tổng trong chất mang trước khi cố định tế bào vì một số hợp chất phenolic trong bẹ lá chuối làm giảm hoạt tính lên men của nấm men và có thể ảnh hưởng không tốt đến giá trị cảm quan của sản phẩm lên men.

Phương pháp cố định với giải pháp làm tăng số tế bào nấm men tính trên 1 gam chất khô của chất mang là do hai nguyên nhân sau đây:

- Rửa các miếng chất mang có chứa tế bào cố định bằng môi trường dinh dưỡng vô trùng: Giải pháp này sẽ tách bớt các chất ức chế (do nấm men sinh ra) bám tại vùng bề mặt của chất mang đồng thời làm tăng hàm lượng các chất dinh dưỡng (do môi trường cung cấp) cũng tại vùng bề mặt của chất mang.
- Ủ các miếng chất mang có chứa tế bào cố định trong thùng rộng vô trùng: Giải pháp này sẽ làm cho nấm men tiếp tục sinh trưởng trên chất mang và làm tăng số tế bào tính trên 1 gam chất khô của chất mang.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp xử lý bẹ lá chuối thành chất mang bao gồm các bước:

- (i) cắt phần bẹ lá chuối theo chiều ngang thành những miếng chất mang với chiều cao 0,5-3,0 cm;
- (ii) ngâm các miếng chất mang trong dung dịch NaOH nồng độ từ 0,05 đến 0,20 mol/lít, gia nhiệt lên đến 30-40 °C, khuấy đảo với tốc độ 5-50 vòng/phút và giữ trong khoảng nhiệt độ này trong thời gian 30-90 phút;
- (iii) ngâm các miếng chất mang trong nước rửa để tách NaOH bám trên chất mang cho

đến khi nước rửa trung tính;

(iv) tiệt trùng các miếng chất mang ở 121 °C trong thời gian 10-20 phút, làm nguội và đem đi cố định nấm men.

Phương pháp cố định tế bào nấm men trên chất mang bẹ lá chuối bao gồm các bước:

(i) cho các miếng chất mang, tế bào nấm men vào thiết bị nuôi cấy đã chứa sẵn môi trường dinh dưỡng vô trùng và nuôi ở 20-35 °C trong thời gian 6-24 giờ với tốc độ khuấy đảo 5-50 vòng/phút;

(ii) tách các miếng chất mang có chứa tế bào cố định ra khỏi thiết bị nuôi cấy và ngâm chúng trong môi trường dinh dưỡng đã được vô trùng;

(iii) tách các miếng chất mang ra để cho vào một cái thùng rộng vô trùng và ủ ở 20-35 °C trong thời gian 3-18 giờ;

(iv) lấy các miếng chất mang ra khỏi thùng để sử dụng ngay cho quá trình lên men.

Trong phần phương pháp xử lý bẹ lá chuối thành chất mang, công đoạn (ii) có thể được thực hiện trong thiết bị hình trụ đứng có vỏ áo xung quanh thân để điều nhiệt và cánh khuấy bên trong để đảo trộn. Ở công đoạn (iii), ngâm các miếng chất mang trong thùng hình trụ đứng. Công đoạn (iv) có thể được thực hiện trong các nồi hấp tiệt trùng thông thường.

Trong phần phương pháp cố định tế bào nấm men trên chất mang bẹ lá chuối, thiết bị nuôi cấy ở công đoạn (i) thường có dạng hình trụ đứng với vỏ áo xung quanh thân để điều nhiệt và cánh khuấy bên trong thùng để đảo trộn. Ở công đoạn (2ii), quá trình ngâm các miếng chất mang có tế bào cố định được thực hiện trong thùng hình trụ đứng. Thùng rộng vô trùng để ủ chất mang có chứa tế bào ở công đoạn (3iii) cũng có dạng hình trụ đứng. Môi trường dinh dưỡng là môi trường được dùng để nhân giống nấm men tại cơ sở sản xuất.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Chúng tôi cố định tế bào nấm men *Kluyveromyces marxianus* trên chất mang bẹ lá chuối để ứng dụng lên men sản xuất ethanol.

Phương pháp xử lý bẹ lá chuối thành chất mang được thực hiện như sau:

(i) cắt phần bẹ lá chuối theo chiều ngang thành những miếng chất mang với chiều cao 0,5 cm;

(ii) ngâm các miếng chất mang trong dung dịch NaOH nồng độ từ 0,1 mol/lít, hiệu chỉnh

về 30 °C, khuấy đảo với tốc độ 50 vòng/phút và giữ ở nhiệt độ này trong thời gian 60 phút;

(iii) ngâm các miếng chất mang trong nước rửa để tách NaOH bám trên chất mang cho đến khi nước rửa trung tính;

(iv) tiệt trùng các miếng chất mang ở 121 °C trong thời gian 15 phút, làm nguội và đem đi cố định nấm men.

Phương pháp cố định tế bào nấm men trên chất mang bẹ lá chuối được thực hiện như sau:

(i) cho các miếng chất mang, tế bào nấm men vào thiết bị nuôi cấy đã chứa sẵn môi trường dinh dưỡng vô trùng và nuôi cấy ở 30 °C trong thời gian 20 giờ với tốc độ khuấy đảo 50 vòng/phút;

(ii) tách các miếng chất mang có chứa tế bào cố định ra khỏi thiết bị nuôi cấy và ngâm chúng trong môi trường dinh dưỡng đã được vô trùng;

(iii) tách các miếng chất mang ra để cho vào một cái thùng rộng vô trùng và ủ ở 30 °C trong thời gian 6 giờ;

(iv) lấy các miếng chất mang ra khỏi thùng để sử dụng ngay cho quá trình lên men.

Phương pháp theo ví dụ trong sáng chế sẽ tách được 67% các hợp chất phenolic tổng trong bẹ lá chuối. Giải pháp rửa chất mang (công đoạn 2ii) và ủ chất mang có chứa tế bào (công đoạn 2iii) đã làm mật độ tế bào nấm men trên chất mang tăng thêm 32% so với trường hợp bỏ qua hai công đoạn này. Chế phẩm nấm men cố định thành phẩm chứa xấp xỉ $1,5 \times 10^{11}$ tế bào trong mỗi gam chất khô của chất mang.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp xử lý bẹ lá của cây chuối (*musa sp.*) thành chất mang, phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) cắt phần bẹ lá chuối theo chiều ngang thành những miếng chất mang với chiều cao 0,5-3,0 cm;
- (ii) ngâm các miếng chất mang trong dung dịch NaOH nồng độ từ 0,05 đến 0,20 mol/lít, gia nhiệt lên đến 30-40 °C, khuấy đảo với tốc độ 5-50 vòng/phút và giữ trong khoảng nhiệt độ này trong thời gian 30-90 phút;
- (iii) ngâm các miếng chất mang trong nước rửa để tách NaOH bám trên chất mang cho đến khi nước rửa trung tính;
- (iv) tiệt trùng các miếng chất mang ở 121 °C trong thời gian 10-20 phút, làm nguội và đem đi cố định nấm men.

2. Phương pháp cố định tế bào nấm men trên chất mang bẹ lá của cây chuối theo điểm 1, phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) cho các miếng chất mang, tế bào nấm men vào thiết bị nuôi cấy đã chứa sẵn môi trường dinh dưỡng vô trùng và nuôi cấy ở 20-35 °C trong thời gian 6-24 giờ với tốc độ khuấy đảo 5-50 vòng/phút;
- (ii) tách các miếng chất mang có chứa tế bào cố định ra khỏi thiết bị nuôi cấy và ngâm chúng trong môi trường dinh dưỡng đã được vô trùng;
- (iii) tách các miếng chất mang ra để cho vào một cái thùng rộng vô trùng và ủ ở 20-35 °C trong thời gian 3-18 giờ;
- (iv) lấy các miếng chất mang ra khỏi thùng để sử dụng ngay cho quá trình lên men.

3. Phương pháp cố định tế bào nấm men theo điểm 2, trong đó nấm men là các chủng được sử dụng trong các quá trình lên men sản xuất ethanol, bia, rượu vang và nước trái cây lên men có chứa ethanol.

4. Phương pháp cố định tế bào nấm men theo điểm 2, trong đó môi trường dinh dưỡng vô trùng là môi trường nhân giống nấm men.