



(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) 
2-0002046

(51)⁷ **C12N 1/20, A23C 9/123**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00170

(22) 22.06.2015

(45) 25.06.2019 375

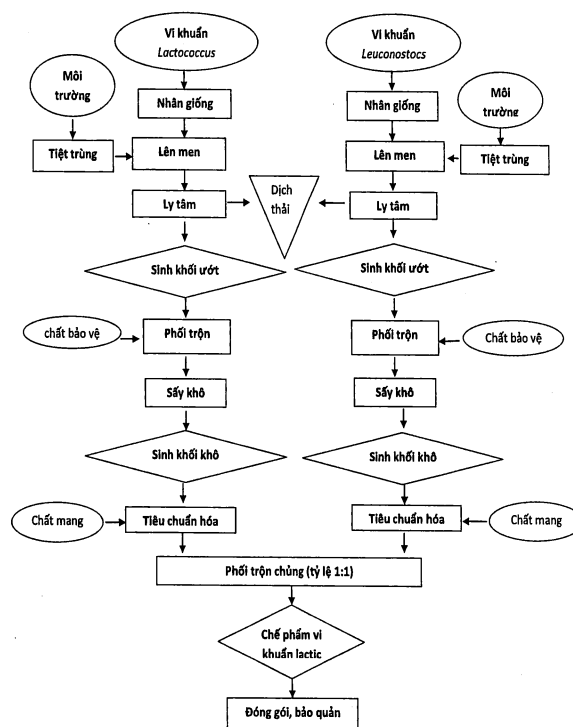
(43) 26.12.2016 345

(73) **VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM (VN)**
301 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Mạnh Đạt (VN), Lê Đức Mạnh (VN), Đỗ Thị Thanh Huyền (VN)

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI KHUẨN LACTIC DÙNG ĐỂ SẢN
XUẤT VÁNG SỮA LÊN MEN GIÀU PROTEIN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic để sản xuất váng sữa lên men giàu protein. Cụ thể, quy trình bao gồm các bước: nhân giống, lên men, ly tâm, bổ sung chất bảo vệ, sấy đông khô, tiêu chuẩn hóa và tạo dạng sản phẩm. Quy trình này khác biệt ở chỗ giống sử dụng là chủng hai chủng vi khuẩn trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm, nuôi cấy riêng rẽ hai chủng trên môi trường nuôi cấy có thành phần gồm nguồn cacbon là đường sacaroza, nguồn nitơ là bột casein thủy phân (sản phẩm casein được thủy phân từ nguyên liệu sữa tươi) và bột nấm men bia thủy phân (sản phẩm nấm men thải của các cơ sở sản xuất bia), đây là những nguyên liệu sẵn có, dễ cung ứng trên thị trường Việt Nam.



Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic để sản xuất váng sữa lên men giàu protein.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong các loại sản phẩm kem, kem lên men, hay còn gọi là kem chua, hay “váng sữa” lên men, có hàm lượng chất béo vào khoảng từ 10 đến 40%, là một sản phẩm được sản xuất rộng rãi trên thế giới với sản lượng tương đương với sản lượng của các sản phẩm lên men từ sữa còn lại. Kem lên men là sản phẩm của quá trình lên men kem, dưới tác động của hệ vi sinh vật thích hợp, làm giảm độ pH đến mức có thể hoặc chưa đến mức gây đông tụ (WHO, 2007). Cùng với quá trình lên men, các chất phụ gia này giúp tăng cường cấu trúc, ngăn ngừa quá trình tách nước của sản phẩm cuối. Tài liệu của Hoffmann, W. & Buchheim, W., 2006 Significance of Milk Fat in Cream Products. In *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2 Lipids*, pp. 365-375. Edited by P. F. FOX & P. L. H. McSWEENEY. New York: Springer Science & Business Media, Inc. mô tả các hạt chất béo cũng tham gia trực tiếp vào quá trình lên men và được kết hợp vào hệ thống cấu trúc sản phẩm. Quá trình lên men sử dụng các vi khuẩn lactic ưa nhiệt độ ôn hòa thường kéo dài đến 14-24 giờ. Kem lên men thường rất đồng nhất, mịn, nhót, hơi chua nhẹ, hơi có mùi như pho mát và bơ.

Hiện nay, đã có rất nhiều những thay đổi đáng kể trong việc sử dụng và nuôi cấy các môi trường khởi động khi chế biến các sản phẩm từ sữa. Các môi trường khởi động này được một số nhà cung cấp bán sẵn trên thị trường dưới các dạng khác nhau. Môi trường khởi động là nhân tố quan trọng nhất quyết định chất lượng cũng như đặc tính cuối cùng của sản phẩm. Tài liệu của Mayra-Makinen, A. & Bigret, M. (2004). Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria In *Lactic Acid Bacteria - Microbiological and Functional Aspects*, pp. 175-198. Edited by S. Salminen, A. von Wright & A. Ouwehand.

New York: Marcel Dekker, Inc. cho rằng việc lựa chọn đúng chủng loại môi trường khởi động là một vấn đề quan trọng đối với mỗi nhà máy chế biến sữa. Đối với phương pháp truyền thống, môi trường khởi động đầu tiên được nuôi cấy từ ống giống dạng lỏng, sau đó thể tích môi trường khởi động cần thiết có thể thu được bằng cách tăng dần thể tích các cấp nhân giống. Ống giống dạng lỏng có thể lấy từ các phòng thí nghiệm trung tâm hoặc từ bộ sưu tập giống của nhà máy và quá trình vận chuyển có thể mất đến hàng tuần. Do đó, phương pháp này khá tốn kém, tốn nhiều nhân lực và đòi hỏi người có kỹ năng kiểm soát quá trình. Môi trường khởi động rất dễ bị nhiễm tạp trong quá trình cấy truyền hoặc bị ảnh hưởng bởi các giai đoạn phát triển của vi khuẩn. Tuy vậy, môi trường khởi động dạng lỏng vẫn được sử dụng rộng rãi, đặc biệt là trong sản xuất các sản phẩm truyền thống của địa phương hoặc ở những nơi mà quá trình vận chuyển các môi trường khởi động từ phòng thí nghiệm trung tâm diễn ra thường xuyên và dễ dàng.

Các môi trường khởi động dạng đông khô cũng có thể được dùng để sản xuất ra môi trường gốc hoặc nhiều môi trường khởi động trong trường hợp quá trình nuôi cấy chỉ cần một lượng nhỏ môi trường gốc. Các môi trường khởi động dạng đông khô có thể được bảo quản nhiều tháng ở nhiệt độ -25°C , và nhà máy có thể sử dụng cùng một lô chế phẩm trong nhiều tháng. Trong trường hợp môi trường khởi động ở dạng đa chủng giống, các chủng này phải được đông khô riêng biệt để tránh sự thay đổi về mặt tỷ lệ giữa các chủng. Các hệ thống hiện đại nhằm lạnh đông hoặc đông khô các môi trường khởi động có thể khiến cho các môi trường khởi động có thể được nhân giống trực tiếp để đạt đến một lượng lớn trong quá trình sản xuất. Điều này sẽ giúp tiết kiệm lao động và nguyên liệu trong quá trình sản xuất (Mayra-Makinen & Bigret, 2004).

Công nghệ sản xuất các môi trường khởi động đông lạnh được ra đời từ những năm 1960. Tài liệu của Bergere, J.-L. H., J. (1968). La production massive de cellules de *Streptococcus lactiques*. II. Croissance de "*Streptococcus lactis*" dans un milieu A pH constant. *Le Lait* 13, 471-472 mô tả môi trường khởi động dạng này cần phải được vận chuyển và lưu giữ ở nhiệt độ thấp. Vào năm 1970, kỹ thuật đông khô phát triển đã khiến cho quá trình sử dụng và vận chuyển trở nên dễ dàng hơn. Một vài ưu điểm của quá trình sử dụng môi trường khởi động dạng cô đặc và đông khô là: dễ sử dụng, chất lượng ổn định, hoạt tính tốt, có thể kiểm tra trước khi sử dụng, yêu cầu ít nhân lực, thích hợp với

chế độ làm việc 5 ngày/tuần và việc kiểm soát quá trình phát triển của vi sinh vật dễ dàng hơn.

So với các phương pháp truyền thống, các phương pháp sản xuất môi trường khởi động đậm đặc có vài nét khác biệt. Tài liệu của Gilliland, S. E. & Speck, M. L. (1969). *Biological Response of Lactic Streptococci and Lactobacilli to Catalase. Appl Environ Microbiol* 17, 797-800 mô tả các chủng giống của môi trường khởi động được nuôi cấy trong môi trường có các điều kiện được kiểm soát kỹ lưỡng để có thể dễ dàng thu nhận các tế bào. Điều kiện của các quy trình rất khắc nghiệt đối với các vi sinh vật và do đó, người ta phải lựa chọn những chủng giống phù hợp. Chỉ có khoảng 25 - 50% các chủng giống sử dụng trong phương pháp sản xuất truyền thống là phù hợp với quá trình sản xuất môi trường khởi động dạng cô đặc và đông khô.

Trong ngành công nghiệp sữa hiện đại, môi trường khởi động là điều kiện tiên quyết cho việc sản xuất các sản phẩm an toàn chất lượng đồng đều, là nhân tố quan trọng nhất quyết định chất lượng cũng như đặc tính cuối cùng của sản phẩm. Số lượng lớn môi trường khởi động ở dạng hoạt động và tinh khiết là rất cần thiết cho sự thành công trong sản xuất sản phẩm. Do đó, việc lựa chọn đúng chủng loại môi trường khởi động là một vấn đề quan trọng đối với mỗi nhà máy chế biến sản phẩm từ sữa.

Trên thế giới hiện nay, việc nghiên cứu và sản xuất chế phẩm vi khuẩn khởi động rất được quan tâm. Cụ thể là, các tài liệu đề cập đến việc nuôi cấy thu sinh khối, như US 3235387 A, US 4053642 A, WO2000/005342, EP 0154614 A, và các tài liệu đề cập đến việc bổ sung chất mang, chất bảo vệ trước khi sấy đông khô, như US 2013/0337108 A1, EP 0259739 A, WO2004/065584.

EP 0154614 A đề cập đến phương pháp kích thích sự phát triển vi khuẩn khi lên men sữa có sử dụng môi trường khởi động. Sử dụng chất kích thích tăng trưởng tốt cho nuôi cấy vi khuẩn đã được bổ sung vào sữa với số lượng lớn như: cao nấm men (0,1-2g nấm men/lít sữa), protein (protein sữa gầy, protein whey và bột sữa gầy) được bổ sung với hàm lượng 3-36g/kg sữa, sản phẩm sữa cuối cùng có hàm lượng protein nằm trong khoảng 3,4-5,0%, v.v.. Quá trình nuôi cấy kết thúc khoảng 14 giờ và độ pH đạt 4,5-5,5, mật độ vi khuẩn đạt 2×10^9 tế bào/ml. Tuy nhiên, các hỗn hợp đó có những bất lợi có thể

gây ra những thay đổi trong thành nuôi cấy vi sinh vật, bởi vì các chất kích thích thúc đẩy sự tăng trưởng của một số vi khuẩn (biến thể) không mong muốn khác. Patent Mỹ số US818417 A đề nghị sử dụng môi trường nuôi chủng khởi động là hòa tan sữa và sữa bột trong nước, xử lý bằng enzym và bổ sung thêm cao ngô (corn steep liquor).

Tuy nhiên, thông qua việc kích thích sự tăng trưởng của một số vi khuẩn trong nuôi cấy hỗn hợp có thể dẫn đến những thay đổi trong tỷ lệ mong muốn và vấn đề này không được đáp ứng trong nuôi cấy đơn chủng.

US 4053642 A bộc lộ phương pháp lên men vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy có sử dụng nguyên liệu như nguồn cacbon và nitơ đắt tiền từ các công ty hóa chất nổi tiếng (Sigma, Meck) chứa protein không whey (protein đậu nành), casein sữa và hỗn hợp đệm bao gồm một hỗn hợp của dinatri hydro phosphat và kali dihydro phosphat. Khi chuẩn bị môi trường nuôi cấy, các whey protein và không whey được tiệt trùng riêng biệt.

Một nhược điểm của các phương pháp truyền thống là đòi hỏi thời gian tăng trưởng 16-20 giờ để sản xuất môi trường khởi động. Vì thời gian tương đối dài, nên kéo theo các chi phí sản xuất cho mỗi mẻ sẽ cao tương ứng. Ngoài ra, do thực tế rằng các môi trường phát triển phải có khả năng hỗ trợ sự tăng trưởng của vi khuẩn từ mức ban đầu là 10^5 CFU/g đến mức kết thúc 10^9 CFU/g, môi trường phải bao gồm một loạt các thành phần tốn kém như chất kích thích, khoáng chất, chiết xuất nấm men, v.v.. US 6146667 A lại đề xuất phương pháp sản xuất môi trường khởi động cho lên men sữa như pho mát là tạo sinh khối chủng có ít nhất khoảng 10^{11} CFU/g; và môi trường phải có 6-13% cao nấm men, 20-50% các muối phosphat và 30-60% sữa.

Theo WO2000/005342 thì việc bổ sung hợp chất porphyrin vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn axit lactic được nuôi dưới sục khí, không chỉ tăng năng suất của môi trường khởi động mà còn là khả năng tồn tại của vi khuẩn và khả năng chống lại các điều kiện khắc nghiệt khác nhau mà có thể xảy ra trong môi trường nuôi cấy, quá trình đóng gói và bảo quản môi trường khởi động.

Đối với việc bổ sung chất mang, chất bảo vệ vào sinh khối trước khi sấy đông khô sản phẩm, US 2013/0337108 A1 đề cập đến việc bổ sung chất mang, chất bảo vệ bao gồm rất nhiều phức chất như đường (sucroza, trehaloza, tinh bột, maltodextrin, v.v.); chất chống oxy hóa (vitamin E, glutathiol, beta-caroten, v.v.); chất hoạt động bề mặt (tween 20, tween 80, axit béo, v.v.); dầu (dầu oliu, dầu hướng dương, v.v.); axit amin; cao nấm men; pepton, v.v.. EP 0259739 A mô tả việc bổ sung các chất như sucroza, pepton, bột sữa béo, casein, whey protein, fructoza, maltoza. WO 2004/065584 bộc lộ việc bổ sung glutamic, lyxin, cao malt, sữa gầy, bột whey, cao nấm men, gluten, collagen, gelatin, v.v.. Các phương pháp trên đều cho chất lượng bảo quản bột sấy đông khô sản phẩm tốt có chất lượng cao. Tuy nhiên, trong hỗn hợp chất bảo vệ có nhiều đơn chất phức tạp, cần phải có thời gian để nghiên cứu rõ tỷ lệ từng chất bổ sung phù hợp và nồng độ sinh khối bị pha loãng khi phải bổ sung một lượng lớn các chất bảo vệ.

Tóm lại, có nhiều phương pháp sản xuất chế phẩm vi khuẩn khởi động trên thế giới, các phương pháp này cho sản phẩm tốt, chất lượng cao. Tuy nhiên, các phương pháp này đều được thực hiện trong điều kiện thí nghiệm nghiêm ngặt với những thiết bị đắt tiền, nguyên liệu nuôi cấy không sẵn có và khó thực hiện ở Việt Nam. Hơn nữa, việc mua một patent từ nước ngoài thường rất đắt và vẫn phần nào bị lệ thuộc và có nhiều rủi ro nếu ta không có trình độ kỹ thuật sâu về lĩnh vực đó. Do đó, nhu cầu cần thiết để tạo ra phương pháp chuẩn bị môi trường khởi động để giảm thời gian và chi phí vật liệu cần thiết như thành phần môi trường nuôi cấy, và theo đó sẽ giảm được chi phí sản xuất. Giải pháp hữu ích đề cập đến nhu cầu này và đưa ra một phương pháp đơn giản để thực hiện, sử dụng chủng giống và nguyên vật liệu sẵn có trong nước để sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic cho lên men váng sữa giàu protein.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn để lên men váng sữa giàu protein bao gồm các bước đơn giản, sử dụng nguồn nguyên liệu sẵn có tại Việt Nam, nhờ đó có thể hạ giá thành sản phẩm, đáp ứng nhu cầu của doanh nghiệp sản xuất sản phẩm lên men từ sữa trong nước.

Để đạt được mục đích trên, quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng chủng giống vi khuẩn *Lactococcus* và *Leuconostoc* trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm.

Điểm khác biệt của giải pháp hữu ích này là nuôi cấy các chủng riêng rẽ, sử dụng chủng giống *Lactococcus* và *Leuconostoc* trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm và thành phần môi trường nuôi cấy có nguồn cacbon là đường sacaroza, nguồn nitơ là casein thủy phân (sản phẩm casein được thủy phân từ nguyên liệu sữa tươi) và bột nấm men bia thủy phân (sản phẩm mẫn men thải của các cơ sở sản xuất Bia) đây là những nguyên liệu sẵn có, dễ cung ứng trên thị trường Việt Nam.

Theo phương án khác của giải pháp hữu ích là có quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn khởi động từ chủng giống *Lactococcus* và *Leuconostoc* nhờ giải pháp này ta có thể chủ động được nguồn chế phẩm vi khuẩn khởi động sẵn có cho quá trình lên men váng sữa giàu protein, giảm bớt chi phí cho việc nhập khẩu chế phẩm khởi động mà thường phải đặt hàng chờ đợi trong một thời gian dài và không chủ động.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ công nghệ của quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn cho lên men váng sữa giàu protein được sản xuất như sau:

a) Nhân giống: nhân giống riêng rẽ hai chủng có trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm là *Lac. lactis* FIRI 1105 và *Leu. mesenteroides* FIRI 1108, lấy một vòng que cấy giống có trong ống thạch nghiêng cho vào ống nghiệm chứa môi trường cơ bản, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 30°C.

Môi trường nhân giống gồm: cao thịt 5g, cao nấm men 5g, pepton 10g, glucoza 20g, natri axetat 5g, natri dihydro phosphat 2g, triamoni xitrat 2g, tween 80 1g, magie

sulphat ngậm 7 nước 0,2g, mangan sulphat 0,05g, độ pH = 6,5 (đối với FIRI 1105) và độ pH = 6,0 (đối với FIRI 1108); thanh trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Làm mới lại chủng giống sau 6 tháng, giống từ ống parafin hoạt hóa, phân lập lại trên hộp petri, cấy ra ống thạch nghiêng và bảo quản ở 4°C để dùng dần.

b) Lên men: tỷ lệ tiếp giống 5% ở tất cả các cấp cho đến khi đủ lượng giống cần thiết là 5% so với dịch lên men. Lên men trong môi trường nuôi tĩnh hoặc trên thiết bị lên men 50 lít.

Môi trường lên men có thành phần thay thế như sau:

Đối với chủng *Lac. lactis* FIRI 1105: môi trường gồm: casein thủy phân 10g, bột nấm men thủy phân 5g, sacaroza 40 g, tween 80 1g, kali hydro phosphat 3g, natri axetat 5g, magie sulphat ngậm 7 nước 0,2g, mangan sulphat 0,05g, thể tích 1 lít, độ pH 6,5; thanh trùng 121°C trong 20 phút;

Đối với chủng *Leu. mesenteroides* FIRI 1108: môi trường gồm: casein thủy phân 10 g, bột nấm men thủy phân 5g, sacaroza 40 g, tween 80 1g, kali hydro phosphat 2g, natri axetat 2g, magie sulphat ngậm 7 nước 0,2g, mangan sulphat 0,05g, thể tích 1 lít, độ pH= 6,0; thanh trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút;

Điều kiện lên men trên thiết bị 50 lít: dung tích môi trường 30 lít, tiếp giống 5%, nuôi tĩnh, 2 giờ khuấy đảo một lần, nhiệt độ 30°C, trong suốt quá trình nuôi cấy điều chỉnh độ pH khoảng 5,8-6,2 bằng NaOH 40%, thời gian lên men 18 giờ (1,5 ngày);

Chuẩn bị bột nấm men thủy phân: sau khi rửa loại tạp chất, men sữa được thủy phân trong 12 giờ có bổ sung enzym Neutrase (E.C.3.4.24 -Novozymes) 0,05% ở 52°C. Dịch thu được đem đi lọc ở 5 °C, sấy phun ở nhiệt độ khí vào/ra là 80-170°C và bảo quản trong tủ lạnh.

Chuẩn bị bột casein thủy phân từ sữa tươi: sữa tươi đã tách béo được điều chỉnh độ pH=4,6 với HCl 1N và khuấy trong 30 phút → để lắng thu kết tủa, sau đó được hòa lại bằng nước cất và chỉnh độ pH = 7,0 bằng NaOH → rửa kết tủa lại 2 lần bằng nước cất,

thu casein thô → sấy cô chân không ở điều kiện 35-40°C, độ chân không đạt 0,8-0,9kgF/cm³ → thu casein bột. Casein bột được bổ sung enzym papain (EC 3.4.22.2, Novozymes) theo tỷ lệ E/S là 380U/g, điều kiện phản ứng nhiệt độ 60°C ở độ pH =6,8 → phản ứng 120 giờ → bất hoạt enzym ở 90 °C/ 10 phút → ly tâm 6000 vòng/phút, 10 phút → thu casein thủy phân.

c) Thu nhận sinh khối vi khuẩn: sinh khối vi khuẩn sau khi kết thúc lên men được thu nhận bằng phương pháp ly tâm, trên thiết bị ly tâm lạnh liên tục, tốc độ cao ở điều kiện: nhiệt độ làm việc 4°C, tốc độ 10.000 vòng/phút, tốc độ dòng chảy 600 ml/phút, thời gian ly tâm liên tục cứ khoảng 30-40 phút thì dừng quá trình ly tâm để thu hoạch sinh khối mỗi lần.

d) Phối trộn chất mang, chất bảo vệ:

Chuẩn bị dung dịch chất bảo vệ với hàm lượng lactoza 7,5%; natri glutamat 5%; và axit ascorbic 0,35% trong sữa hoặc nước cất vô trùng, theo tỷ lệ như sau:

Chủng *Lac. lactis* FIRI 1105: tỷ lệ tổng sinh khối/chất mang chất bảo vệ = 0,05;
 chủng *Lac. lactis* FIRI 1108: tỷ lệ tổng sinh khối/chất mang chất bảo vệ = 0,34.

Sau khi phối trộn chất mang, chất bảo vệ. Để yên ở nhiệt độ phòng (khoảng 25-30°C) trong 15 - 20 phút.

e) Sấy khô:

Trước khi sấy đông khô, để lạnh -20°C qua đêm, sấy đông khô ở -45°C, áp suất chân không 0,06 mbar, trong 24 giờ.

f) Tiêu chuẩn hóa sản phẩm:

Bột chế phẩm vi khuẩn được tiêu chuẩn hóa bằng maltodextrin để đạt mật độ tế bào đạt >10⁹ CFU/g.

g) Phối trộn chủng:

Tỷ lệ phối trộn chủng *Lac. lactis* FIRI 1105 và *Leu. mesenteroides* FIRI 1108 là 1:1. Mật độ tế bào đạt >10⁹ CFU/g.

h) Đóng gói, bảo quản:

Đóng gói bằng máy hút chân không, công suất 100kg/giờ đối với gói 500g. Bảo quản tốt nhất ở -20°C đến -18°C.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ sau đây nhằm hiểu rõ hơn giải pháp hữu ích mà không nhằm giới hạn giải pháp hữu ích theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1: Xác định thành phần môi trường lên men để thu nhận sinh khối vi khuẩn *Lac. lactis* FIRI 1105

Một vòng que cấy giống vi khuẩn *Lactococcus* từ ống thạch nghiêng đưa vào 10ml môi trường nhân giống cấp 1 nuôi 18 giờ ở 30°C, sau đó được tiếp vào 100ml môi trường nhân giống cấp 2 cho đến khi có đủ lượng giống cần thiết là 5% so với dịch lên men. Môi trường lên men với các thành phần là: bột nấm men thủy phân, bột casein thủy phân, sacaroza, tween 80, kali hydro phosphat, natri axetat, magie sulphat ngâm 7 nước, mangan sulphat ở các nồng độ khác nhau, độ pH = 6,5; thanh trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Lên men ở cùng một điều kiện ở nhiệt độ 30°C, thời gian 18 giờ, trong quá trình lên men điều chỉnh độ pH = 6,5 bằng NaOH 40%. Kết thúc lên men xác định các thông số như hàm lượng axit lactic (%) và mật độ tế bào (CFU/g).

Dịch lên men ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút, 10 phút, 4°C, loại bỏ dịch trong, thu cặn chứa sinh khối vi khuẩn. Sinh khối vi khuẩn sau ly tâm được xác định mật độ tế bào (CFU/g). Kết quả cho thấy môi trường thích hợp cho lên men có thành phần như sau (lít): casein thủy phân: 10g; bột nấm men thủy phân 5g, sacaroza 40g, tween 80 1g, kali hydro phosphat 3g, natri axetat 5g, magie sulphat ngâm 7 nước 0,2g, mangan sulphat 0,05g

Thực hiện theo ví dụ 1, lên men chủng *Lac. lactis* FIRI 1105 trong thiết bị lên men 50 lít (có chứa 30 lít môi trường) ở điều kiện đã xác định như trên thu được 150g sinh khối, mật độ tế bào đạt 4×10^{12} CFU/ml.

Ví dụ 2: Xác định thành phần môi trường lên men để thu nhận sinh khối vi khuẩn *Leu. mesenteroides* FIRI 1108

Một vòng que cấy giống vi khuẩn *Leuconostoc* từ ống thạch nghiêng đưa vào 10ml môi trường nhân giống cấp 1 nuôi 18 giờ ở 30°C, sau đó được tiếp vào 100ml môi trường nhân giống cấp 2 cho đến khi có đủ lượng giống cần thiết là 5% so với dịch lên men.

Môi trường lên men dựa trên thành phần môi trường: bột nấm men thủy phân, bột casein thủy phân, sacaroza, tween 80, kali hydro phosphat, natri axetat, magie sulphat ngâm 7 nước, mangan sulphat ở các nồng độ khác nhau, độ pH = 6,0; thanh trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Các mẫu có chứa các thành phần môi trường khác nhau được lên men ở cùng một điều kiện như nhau: nhiệt độ 30°C, thời gian 18 giờ, trong quá trình lên men điều chỉnh độ pH = 5,8-6,2 bằng NaOH 40%. Kết thúc lên men xác định các thông số như hàm lượng axit lactic (%) và mật độ tế bào (CFU/g).

Dịch lên men ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút, 10 phút, 4°C, loại bỏ dịch trong, thu cặn chứa sinh khối vi khuẩn. Sinh khối vi khuẩn sau ly tâm được xác định mật độ tế bào (CFU/g). Kết quả cho thấy môi trường thích hợp cho lên men có thành phần như sau (lít): casein thủy phân 10g; bột nấm men thủy phân 5g; sacaroza 40g; tween 80 1g; kali hydro phosphat 2g; natri axetat 2g; magie sulphat ngâm 7 nước 0,2g; mangan sulphat 0,05g.

Thực hiện theo ví dụ 2, lên men chủng *Lac. lactis* FIRI 1105 trên thiết bị lên men 50 lít (có chứa 30 lít môi trường) ở điều kiện đã xác định như trên thu được 80g sinh khối, mật độ tế bào đạt $5,8 \times 10^{11}$ CFU/g.

Ví dụ 3: Xác định tỷ lệ sử dụng chất mang, chất bảo vệ tế bào vi khuẩn

Sử dụng chất bảo vệ như sau: sinh khối được trộn với dung dịch chứa lactoza mononatri glutamat và axit ascorbic trong sữa hoặc nước cất vô trùng, theo tỷ lệ như sau: đối với chủng *Lac. lactis* FIRI 1105, tỷ lệ tổng sinh khối khô/chất mang chất bảo vệ là 0,03-0,06; đối với chủng *Leu. mesenteroides* FIRI 1108, tỷ lệ sinh khối khô/chất mang chất bảo vệ là 0,3-0,4. Sau khi phối trộn chất mang, chất bảo vệ, để yên ở nhiệt độ phòng

(khoảng 25-30°C) trong 15-20 phút. Sau đó, đem sấy đông khô riêng rẽ sinh khối của 2 chủng ở điều kiện -45 °C, P<0,06 mbar trong 24 giờ.

Qua quá trình thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau, kết quả thu được như sau:

Sử dụng chất bảo vệ như sau: sinh khối được trộn với dung dịch chứa lactoza 7,5%; mononatri glutamat 5% và axit ascorbic 0,35% trong sữa hoặc nước cất vô trùng, theo tỷ lệ chủng *Lac. lactis* FIRI 1105: tỷ lệ tổng sinh khối khô/chất mang chất bảo vệ là 0,05; chủng *Leu. mesenteroides* FIRI 1108: tỷ lệ sinh khối khô/chất mang chất bảo vệ là 0,34. Mật độ tế bào đạt $>10^9$ CFU/g.

Thực hiện theo ví dụ 1, 2 và 3 thu được 370g sinh khối chủng *Lac. lactis* FIRI 1105 và 230g sinh khối chủng *Leu. mesenteroides* FIRI 1108.

Ví dụ 4: Phối trộn chủng

Sinh khối của 2 chủng ở ví dụ 3 được tiến hành phối trộn chủng trong điều kiện vô trùng ở các tỷ lệ khác nhau, để đạt được mật độ tế bào $>10^9$ CFU/g. Qua các thử nghiệm xác định kết quả cho thấy lệ phối trộn chủng *Lac. lactis* FIRI 1105 và *Leu. mesenteroides* FIRI 1108 là 1:1. Mật độ tế bào đạt $>10^9$ CFU/g.

Như vậy, thực hiện theo các ví dụ 1,2,3 và 4 sẽ thu được khoảng 600g chế phẩm vi khuẩn khởi động chứa 2 chủng *Lac. lactis* FIRI 1105 và *Leu. mesenteroides* FIRI 1108, mật độ tế bào đạt $>10^9$ CFU/g.

Hiệu quả của giải pháp hữu ích

Nuôi cấy riêng rẽ hai chủng vi khuẩn *Lactococcus* và *Leuconostoc* có trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm có khả năng lên men váng sữa. Sinh khối vi khuẩn thu được sau quá trình lên men trong môi trường nuôi cấy thay thế tổng hợp với các điều kiện đã lựa chọn, khi lên men trên thiết bị 50 lít sau 18 giờ nuôi cấy mật độ đạt 4×10^{12} CFU/g và $5,8 \times 10^{11}$ CFU/g, sinh khối đạt 150g và 80g tương ứng đối với chủng *Lactococcus* và *Leuconostoc*.

Trong giải pháp này ta có thể chủ động được nguồn chế phẩm vi khuẩn khởi động sẵn có cho quá trình lên men váng sữa giàu protein, giảm bớt chi phí cho việc nhập khẩu chế phẩm khởi động mà phải đặt hàng chờ đợi trong một thời gian dài, không chủ động.

Tìm được thành phần môi trường lên men có nguồn cacbon là đường sacaroza, nguồn nitơ là casein thủy phân (là sản phẩm casein được thủy phân từ nguyên liệu sữa

tươi) và bột nấm men bia thủy phân (sản phẩm mẫn men thải của các cơ sở sản xuất bia) đây là những nguyên liệu sẵn có, dễ cung ứng trên thị trường Việt Nam.

Tìm được thành phần chất mang, chất bảo vệ bổ sung vào sinh khối trước khi sấy đông khô chế phẩm vi khuẩn, các thành phần là đơn giản, dễ kiếm tại thị trường Việt Nam

Bằng phương pháp lên men nhân giống các cấp đã tiết kiệm được thời gian, nguyên vật liệu và công sức trong công đoạn gây giống các cấp. Thời gian tổng cộng cho mẻ lên men từ giống gốc đến kết thúc đã giảm được từ 120 giờ xuống còn 36 giờ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic để sản xuất váng sữa lên men giàu protein bao gồm các bước sau:

a) nhân giống: nhân giống riêng rẽ hai chủng *Lac. lactis* FIRI 1105 và *Leu. mesenteroides* FIRI 1108, lấy một vòng que cấy giống có trong ống thạch nghiêng cho vào ống nghiệm chứa môi trường cơ bản, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 30°C;

b) lên men: lên men chủng *Lac. lactis* FIRI 1105 trong môi trường bao gồm (g/l) bột casein thủy phân 10g, bột nấm men thủy phân 5g, sacaroza 40g, tween 80 1g, kali hydro phosphat 3g, natri axetat 5g, magie sulphat ngậm 7 nước 0,2g, mangan sulphat 0,05g, thể tích 1 lít, độ pH = 6,5; thanh trùng 121°C trong 20 phút;

lên men chủng *Leu. mesenteroides* FIRI 1108 trong môi trường bao gồm (g/l) bột casein thủy phân 10g, bột nấm men thủy phân 5g, sacaroza 40g, tween 80 1g, kali hydro phosphat 2g, natri axetat 2g, magie sulphat ngậm 7 nước 0,2g, mangan sulphat 0,05g, thể tích 1 lít, độ pH = 6,0; thanh trùng 121°C trong 20 phút;

tỷ lệ tiếp giống 5% ở mỗi cấp độ, nuôi tĩnh, cứ 2 giờ khuấy đảo 1 lần, nhiệt độ 30°C, điều chỉnh độ pH = 6,5 (*Lac. lactis* FIRI 1105) và độ pH = 6,0 (*Lac. lactis* FIRI 1108) bằng NaOH 40%;

c) thu nhận sinh khối vi khuẩn: dịch sau quá trình lên men (bước b) đem ly tâm lạnh liên tục, tốc độ cao ở điều kiện nhiệt độ 4°C, tốc độ 10.000 vòng/phút, tốc độ dòng chảy 600 ml/phút;

d) phối trộn chất mang, chất bảo vệ: sinh khối thu được từ bước (c) được trộn với dung dịch chất mang chất bảo vệ chứa lactoza 7,5%, mononatri glutamat 5% và axit ascorbic 0,35% trong sữa hoặc nước cất vô trùng;

e) sấy khô: sinh khối thu được ở bước (d) được đem sấy đông khô ở -50°C, áp suất chân không 0,080 mbar, chế phẩm thu được có mật độ tế bào sống: $6,5 \times 10^{11}$ CFU/g;

f) tiêu chuẩn hóa sản phẩm: tiêu chuẩn hóa sinh khối chế phẩm vi khuẩn thu được ở bước (e) bằng maltodextrin để mật độ tế bào $>10^9$ CFU/g;

g) phối trộn chủng: phối trộn sinh khối: chế phẩm thu được từ bước (f) chủng *Lac. lactis* FIRI 1105 và *Leu. mesenteroides* FIRI 1108 theo tỷ lệ 1:1; và

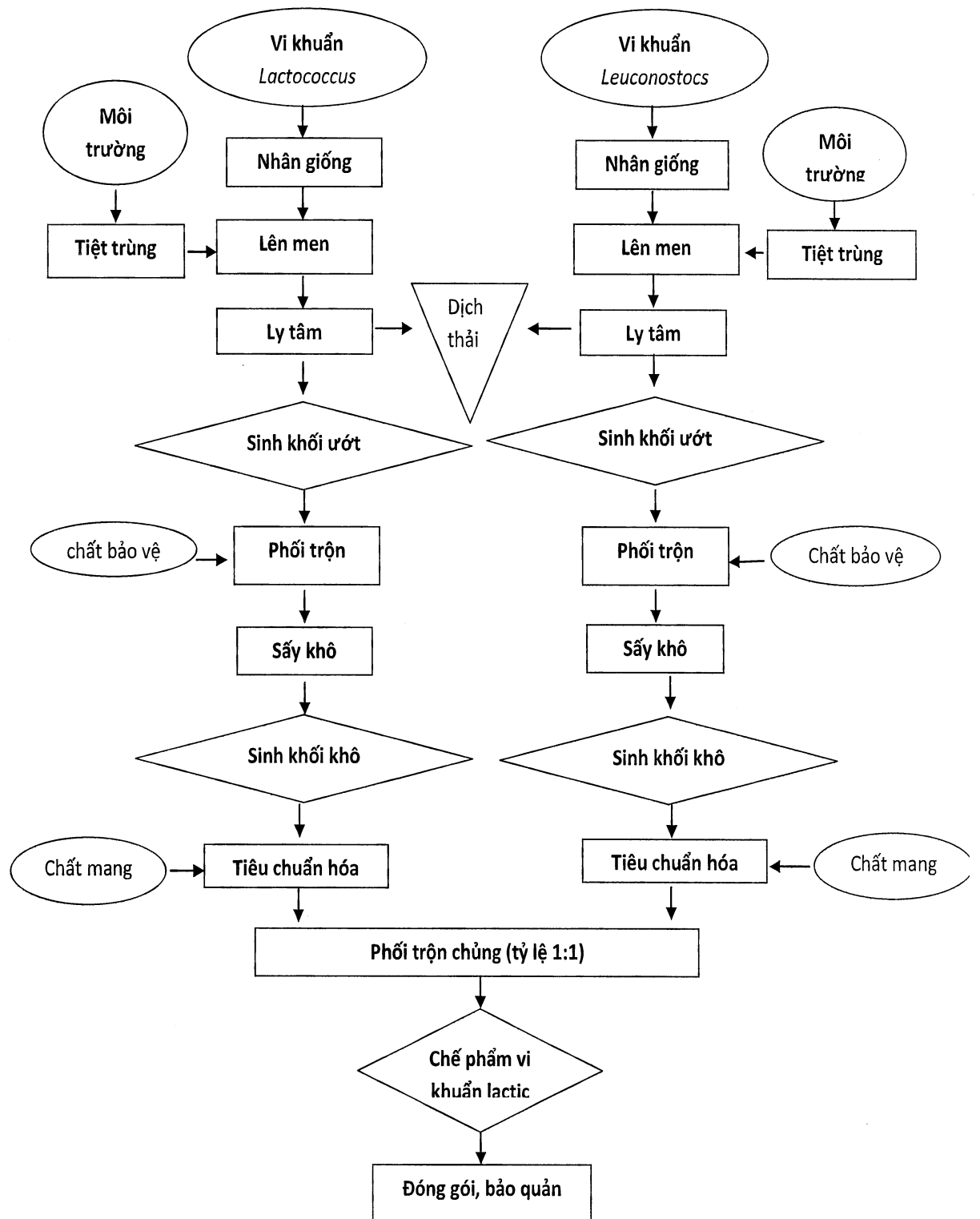
h) đóng gói, bảo quản: đóng gói chế phẩm thu được từ bước (g) trong túi thiếc bằng máy hút chân không, công suất 100kg/giờ đối với gói 500g, bảo quản tốt nhất ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20 đến -18°C.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó ở bước (a), thời gian nhân giống nằm trong khoảng từ 18 giờ đến 24 giờ.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó ở bước (b), môi trường lên men thành phần môi trường có sử dụng nguyên liệu thay thế, dễ kiếm ở Việt Nam là bột casein thủy phân và bột nấm men bia thủy phân, dùng để thay thế cao thịt, cao nấm men, và pepton của môi trường cơ bản có trong bước (a).

4. Quy trình theo điểm 1, trong đó ở bước (b), lên men trên thiết bị 50 lít chứa 30 lít môi trường, thời gian lên men là 36 giờ.

5. Quy trình theo điểm 1, trong đó ở bước (d), tỷ lệ trộn sinh khối/ chất mang, chất bảo vệ là 0,05 và 0,34 tương ứng đối với chủng *Lac. lactis* FIRI 1105 và chủng *Leu. mesenteroides* FIRI 1108.



Hình 1. Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic