



(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) 
2-0001874

(51)⁷

(13) Y

(21) 2-2018-00014

(22) 10.10.2014

(67) 1-2014-03409

(45) 26.11.2018 368

(43) 25.04.2016 337

- (73) 1. CÔNG TY CỔ PHẦN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)
Tầng 2, tòa nhà Biogroup, 814/3 đường Láng, phường Láng Thượng, quận Đống Đa,
thành phố Hà Nội
2. CÔNG TY CỔ PHẦN PHÂN BÓN FITOHOOCMON (VN)
814/3 đường Láng, phường Láng Thượng, quận Đống Đa, thành phố Hà Nội
(72) Lê Văn Tri (VN)

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH TRÊN MÔI TRƯỜNG XỐP**

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất các chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp bao gồm các bước:

- (1) chia nhóm nguyên liệu môi trường;
- (2) trộn và khử trùng môi trường;
- (3) cấy giống và lên men; và
- (4) thu hồi chế phẩm.

Quy trình theo giải pháp hữu ích thực hiện chia nhóm các nguyên liệu môi trường và tiến hành khử trùng riêng rẽ, giúp đảm bảo cho thành phần dinh dưỡng của môi trường không bị thay đổi, giảm tuyệt đối độ tạp khuẩn trong môi trường, nâng cao năng suất và chất lượng sản phẩm. Chế phẩm thu được từ quy trình có mật độ và hoạt tính các vi sinh vật hữu ích cao cho nên có thể kéo dài thời gian bảo quản sản phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, lên men vi sinh, sản xuất các chế phẩm vi sinh phục vụ trong sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh, xử lý ô nhiễm môi trường. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Việc sản xuất các chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp ở Việt Nam cũng như ở trên thế giới đều được thực hiện bằng phương pháp nong, nia, khay hoặc cao hơn là buồng cấy có khay, mẹt được điều khiển nhiệt độ và độ ẩm. Quy trình được thực hiện như sau: toàn bộ thành phần môi trường như cám, bột ngô, đậu tương, trấu, các nguồn đạm, lân, kali, vi lượng, có thể cao cấp hơn là các cao nấm men cao thịt, các vitamin, v.v., được trộn đều và được nấu hoặc hấp thanh trùng ở nhiệt độ 120°C và áp suất cao 1,5 atm (khoảng 152 kPa) trong thời gian dài 30 phút. Quá trình khử trùng này được lặp lại 2 lần, cách nhau 24 giờ. Khử trùng bằng phương pháp gián đoạn là để những bào tử sống sót trong lần hấp trước sẽ nảy mầm khi gặp điều kiện thích hợp và chúng sẽ bị tiêu diệt trong lần hấp tiếp theo để môi trường đảm bảo vô trùng. Trong thời gian này, môi trường được nấu chín và ngấm hết nguồn dinh dưỡng, sau đó môi trường được để nguội xuống 30°C và được cấy giống vi sinh theo tỷ lệ 10% giống môi trường lỏng, tiếp đó là môi trường đã có giống được cho vào khay và chuyển vào buồng có điều kiện vô trùng để lên men. Thực hiện theo quy trình này sẽ gặp một số sai sót trong sản xuất cả về mặt học thuật cũng như các thao tác kỹ thuật, cụ thể là:

- Về mặt học thuật, tất cả các nguồn dinh dưỡng của môi trường được trộn đều để đưa đi khử trùng ở trong cùng nhiệt độ cao và thời gian dài là không thích hợp. Việc khử trùng như vậy chỉ phù hợp với các thành phần như cám gạo, bột ngô, bột đậu tương, trấu, than bùn, v.v., còn các thành phần như các nguồn đạm, lân, kali, vi lượng, v.v., thì sẽ bị phân hủy một phần, đặc biệt là các thành phần như cao nấm men, cao thịt, vitamin, axit amin, v.v., thì hoàn toàn bị phân hủy. Với quy trình

này thì thành phần môi trường sau khi khử trùng không còn như mong muốn của nhà nghiên cứu sản xuất và không đảm bảo đủ dinh dưỡng tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật như tính toán ban đầu.

- Việc cung cấp giống dạng lỏng một lần theo tỷ lệ 10% làm tăng độ ẩm của môi trường lên cao, kết hợp với các thao tác trộn giống, rải khay và nuôi cấy trong điều kiện không vô trùng tuyệt đối dẫn tới môi trường dễ bị nhiễm khuẩn, lên men chua, chất lượng chế phẩm bị giảm về mật độ vi sinh vật hữu ích và hoạt lực của các men ngoại bào.

Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp theo giải pháp hữu ích nhằm khắc phục các nhược điểm trên.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bản chất của quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp theo giải pháp hữu ích là đánh giá và phân chia các thành phần môi trường xốp thành 3 nhóm để tiến hành sử dụng 3 phương pháp khử trùng khác nhau: (1) khử trùng ở nhiệt độ cao 70-80°C theo chế độ lần 1 là 40 phút, lần 2 là 30 phút, hai lần cách nhau 24 giờ, nhằm mục đích tiệt trùng triệt để các vi sinh vật dại có trong môi trường xốp; (2) khử trùng ở nhiệt độ cao 70-80°C một lần nhằm mục đích giữ nguyên thành phần dinh dưỡng của môi trường; (3) không phải khử trùng mà chỉ lọc thanh trùng (đối với những thành phần môi trường dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao). Khi trộn và tạo thành môi trường sản xuất cũng sẽ được tiến hành theo thứ tự như sau: nhóm 1 khử trùng sau 24 giờ thì trộn cùng nhóm 2 để khử trùng vào ngày thứ 2, nhóm 1 và nhóm 2 khử trùng xong thì bổ sung nhóm thứ 3. Việc cấy giống được cho vào thùng lên men từ từ để độ ẩm của môi trường luôn đảm bảo tối ưu cho quá trình lên men xốp và khi thu hồi sản phẩm thùng lên men vẫn đảo trộn và tăng nhiệt để sấy khô, tạo được sản phẩm có chất lượng cao.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất các chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp theo giải pháp hữu ích gồm các bước:

(1) Chia nhóm nguyên liệu môi trường:

Căn cứ vào tính chất nguyên liệu và điều kiện khử trùng để lựa chọn vào 3 nhóm nguyên liệu: Nhóm 1 là các nguyên liệu bền với nhiệt độ cao và thường là các nguyên liệu thô như than bùn, cám gạo, bột ngô, v.v., được khử trùng ở nhiệt độ 70-80°C, không áp lực, được lặp lại hai lần cách nhau 24 giờ; thời gian khử trùng lần một là 40 phút, lần hai là 30 phút (tổng số 2 lần khử trùng là 70 phút); Nhóm 2 là các nguyên liệu môi trường khá bền nhiệt như đường, đạm, lân, kali, ri đường, v.v., được khử trùng ở nhiệt độ 70-80°C; và nhóm 3 là các nguyên liệu dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao và thường là các nguyên liệu ở dạng tinh như: vitamin, axit amin, khoáng, các nguyên tố vi lượng cần thiết khác, nhóm nguyên liệu này không phải khử trùng mà chỉ lọc qua dụng cụ lọc khuẩn. Do đặc tính của các loại nguyên liệu khác nhau, nên các điều kiện thực hiện khử trùng cho từng nhóm nguyên liệu đã được tác giả nghiên cứu để đảm bảo cho các nguyên liệu được khử trùng hiệu quả, đáp ứng tiêu chuẩn theo quy định và không bị phân hủy và biến tính do nhiệt.

(2) Trộn và khử trùng môi trường:

Cho nguyên liệu nhóm 1 vào thùng lên men, tăng nhiệt độ lên dần tới 70-80°C, khi đó cung cấp nước sạch qua hệ thống vô trùng để môi trường đạt độ ẩm $\leq 15\%$.

Thời gian khử trùng được tính từ khi đạt nhiệt độ 70-80°C và độ ẩm môi trường đạt $\leq 15\%$. Sau 40 phút, kết thúc khử trùng đợt 1, nhiệt độ được hạ về 30°C để cho những bào tử sống sót trong khử trùng đợt 1 sẽ nảy mầm khi gặp điều kiện độ ẩm và nhiệt độ thích hợp và chúng sẽ bị tiêu diệt trong khử trùng đợt 2.

Khử trùng đợt 2 sẽ được tiến hành sau 24 giờ và kết hợp với việc khử trùng nguyên liệu thuộc nhóm 2. Việc khử trùng này được thực hiện bằng cách nâng nhiệt độ thùng lên men với môi trường đã khử trùng đợt 1 lên dần tới 70-80°C, sau đó bổ sung dần nguyên liệu nhóm 2 ở dạng dịch môi trường lỏng qua hệ thống vô trùng, thời gian khử trùng là 30 phút. Khi kết thúc khử trùng, hạ nhiệt độ xuống 30°C và bổ sung nguyên liệu nhóm 3 thông qua hệ thống vô trùng, như thế cả nguyên liệu nhóm 2 và nhóm 3 đều không bị cháy, thành phần dinh dưỡng không bị thay đổi. Thành phần môi trường đạt tiêu chuẩn để tiếp nhận giống và lên men.

(3) Cấy giống và lên men:

Các giống vi sinh được lên men trên máy lắc trong bình tam giác vô trùng làm giống nguyên chủng để cấy vào thùng lên men giống cấp 1. Sau thời gian lên men đạt tiêu chuẩn giống cấp 1, giống được chuyển vào thùng lên men giống cấp 2 trên môi trường xốp. Sau thời gian lên men 48 giờ đạt tiêu chuẩn giống cấp 2, giống được chuyển vào thùng lên men sản xuất chế phẩm trên môi trường xốp. Tỷ lệ nhân giống của các cấp là 10%. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực lên men có thể tiến hành việc tiến hành nhân giống cấp 1 và cấp 2 này. Thời gian lên men sản xuất được kéo dài 72 giờ.

Trong quá trình lên men giống và lên men sản xuất môi trường xốp: luôn được trộn đều để tạo điều kiện thoáng khí và điều nhiệt để cho các vi sinh vật phát triển tốt. Chất lượng của sản phẩm lên men có thể được kiểm tra bằng cách lấy mẫu để kiểm tra theo Tiêu chuẩn ngành và Tiêu chuẩn quốc gia.

(4) Thu hồi chế phẩm:

Kết thúc giai đoạn lên men sản xuất, sản phẩm được tiếp tục đảo trộn và sấy khô ở nhiệt độ 45-50°C trong thùng lên men cho tới độ ẩm đạt 10-15%.

Sản phẩm sau khi sấy được nghiền nhỏ, thu được chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp.

Chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp thu được có thể được đóng bao và bảo quản trong điều kiện khô thoáng và mát.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Sản xuất 600 kg chế phẩm vi sinh vật phân giải hữu cơ trên môi trường xốp

Các nguyên liệu làm môi trường được sử dụng có thành phần như sau 100 kg than bùn, 225 kg cám gạo, 80 kg bột ngô, 15 kg bột đậu tương, 1,5 kg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 kg rỉ đường, 67,5 kg trấu và dung dịch nguyên tố vi lượng.

Chia nhóm các nguyên liệu làm môi trường, trong đó nhóm 1 gồm 100 kg than bùn, 225 kg cám gạo, 80 kg bột ngô, 15 kg bột đậu tương và 67,5 kg trấu; nhóm 2 gồm 1,5 kg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 6 kg rỉ đường và nhóm 3 là dung dịch nguyên tố vi lượng.

Giống gốc là các vi sinh vật phân giải hữu cơ thuộc các chi *Bacillus* sp.; *Cellvibrio* sp., *Trichoderma* sp., *Fusaiun* sp., *Aspergillus* sp., v.v., là các chủng thường được sử dụng trong quá trình lên men.

Các chủng giống gốc được nhân giống cấp 1 trên môi trường có thành phần tatrat amoni 9,0 g; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,0 g; cám gạo 125 g; bột ngô 200 g; rỉ đường 40 g; và nước máy 5 lít. Môi trường được khử trùng ở 0,8 atm (khoảng 81 kPa) trong thời gian 30 phút, độ pH môi trường nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,0. Tỷ lệ cấy chuyển là 10%, nhiệt độ lên men là 25-27°C và thời gian lên men giống trên môi trường lỏng là 4 ngày.

Lấy 10% lượng nguyên liệu làm môi trường ở trên làm nguyên liệu nhân giống cấp 2. Lấy 10 kg than bùn; 22,5 kg cám gạo; 8 kg bột ngô; 1,5 kg bột đậu tương và 6,5 kg trấu cho vào thùng lên men giống cấp 2, trộn đều và gia nhiệt tăng dần lên 70-80°C trong thời gian 40 phút thì kết thúc khử trùng đợt 1. Khử trùng đợt 2 được tiến hành sau 24 giờ nhưng được bổ sung dần 150 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 0,6 kg rỉ đường bằng cách được pha vào 20 lít nước, khử trùng đợt 2 được kéo dài 30 phút ở nhiệt độ 70-80°C. Sau khi kết thúc khử trùng nhiệt độ được hạ xuống dưới 30°C để cấy 5 lít giống môi trường lỏng đã được chuẩn bị ở phần trên. Thực hiện lên men trong 48 giờ ở nhiệt độ khoảng 25 – 27°C, thu được giống cấp 2.

Phần còn lại của nguyên liệu làm môi trường được thực hiện trộn và khử trùng. Cho nguyên liệu thuộc nhóm 1 (90 kg than bùn; 192,5 kg cám gạo; 72 kg bột ngô; 13,5 kg bột đậu tương và 61 kg trấu) vào thùng lên men sản xuất, gia nhiệt để tăng nhiệt độ lên dần tới 70-80°C, khi đó cung cấp nước sạch qua hệ thống vô trùng để môi trường đạt độ ẩm $\leq 15\%$. Thời gian khử trùng được tính từ khi đạt nhiệt độ 70-80°C và độ ẩm môi trường đạt $\leq 15\%$. Sau 40 phút, kết thúc khử trùng đợt 1, nhiệt độ được hạ về 30°C.

Sau 24 giờ, bổ sung nguyên liệu nhóm 2 (1,35 kg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 5,4 kg rỉ đường đã được pha vào 80 lít nước) vào thùng lên men sản xuất qua đường ống vô trùng, sau đó gia nhiệt thùng lên men để nâng nhiệt độ lên dần tới 70-80°C và thời gian tiến hành khử trùng kéo dài 30 phút. Sau khi kết thúc khử trùng, bổ sung dung

dịch nguyên tố vi lượng đã được lọc qua dụng cụ lọc khuẩn vào thùng lên men sản xuất, thu được môi trường lên men sau khử trùng.

Cấy giống nuôi cấy cấp 2 thu được ở trên vào môi trường lên men sau khử trùng trong thùng lên men sản xuất qua đường ống vô trùng, thực hiện lên men trong thời gian 72 giờ ở điều kiện nhiệt độ khoảng 25 – 27°C, sản phẩm được tiếp tục đảo trộn và sấy khô ở nhiệt độ 45-50°C trong thùng lên men cho tới độ ẩm đạt 10-15%, thu được 600 kg chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp.

Sản phẩm trước khi đóng gói kiểm tra chất lượng đều đạt được các chỉ tiêu chất lượng cao: (1) độ ẩm 10%; (2) độ tạp nhiễm 0%; (3) mật độ vi sinh vật hữu ích: 1.10^{10} (CFU/g); (4) hoạt tính men phân giải CMC đạt 3-4cm.

Ví dụ 2: Thử nghiệm so sánh

Chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp được sản xuất theo quy trình cũ (các điều kiện tương tự như trên Ví dụ, nhưng không được thực hiện chia nhóm và khử trùng theo các bước như trong quy trình theo giải pháp hữu ích) và chế phẩm được sản xuất bằng quy trình theo giải pháp hữu ích (có thực hiện chia nhóm và khử trùng theo các bước như nêu trong Ví dụ 1), được so sánh cho kết quả như sau:

Số TT	Các chỉ tiêu so sánh	Đơn vị tính	Chế phẩm được sản xuất theo quy trình cũ	Chế phẩm được sản xuất bằng quy trình theo giải pháp hữu ích
1	Độ ẩm	%	12-15	8-10
2	Độ tạp nhiễm	%	1,5-2,0	0
3	Mật độ vi sinh vật hữu ích	CFU/g	1.10^7 - 1.10^8	1.10^9 - 1.10^{10}
4	Hoạt tính phân giải CMC	Vòng phân giải (cm)	2-3	3-4
5	Số lượng đủ phân giải 10 tấn nguyên liệu hữu cơ trong 30 ngày	g	2000	1500

6	Giá thành so với sản phẩm cũ	%	100	50
---	------------------------------	---	-----	----

Những lợi ích có thể đạt được

Việc thực hiện khử trùng theo quy trình sản xuất các chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp theo giải pháp hữu ích đã đảm bảo cho thành phần dinh dưỡng của môi trường không bị thay đổi, giảm tuyệt đối độ tạp khuẩn trong môi trường, nâng cao năng suất và chất lượng sản phẩm. Chế phẩm thu được từ quy trình có mật độ và hoạt tính các vi sinh vật hữu ích cao cho nên có thể kéo dài thời gian bảo quản sản phẩm. Từ đó giúp hạ giá thành sản phẩm và nâng cao hiệu quả kinh tế trong sản xuất.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất các chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp bao gồm các bước:

(1) chia nhóm nguyên liệu môi trường:

căn cứ vào tính chất nguyên liệu và điều kiện khử trùng để lựa chọn vào 3 nhóm nguyên liệu: nhóm 1 là các nguyên liệu bền với nhiệt độ cao để khử trùng ở nhiệt độ 70-80°C, không áp lực, được lặp lại hai lần cách nhau 24 giờ; thời gian khử trùng lần một là 40 phút, lần hai là 30 phút; nhóm 2 là các nguyên liệu môi trường khá bền nhiệt để khử trùng ở nhiệt độ 70-80°C; và nhóm 3 là các nguyên liệu dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao để lọc qua dụng cụ lọc khuẩn;

(2) trộn và khử trùng môi trường:

cho nguyên liệu nhóm 1 vào thùng lên men, tăng nhiệt độ lên dần tới 70-80°C, khi đó cung cấp nước sạch qua hệ thống vô trùng để môi trường đạt độ ẩm $\leq 15\%$;

tính thời gian khử trùng từ khi đạt nhiệt độ 70-80°C và độ ẩm môi trường đạt $\leq 15\%$;

khử trùng đợt 1 có thời gian 40 phút;

kết thúc khử trùng đợt 1, nhiệt độ được hạ về 30°C;

sau 24 giờ thực hiện khử trùng đợt 2 kết hợp với việc khử trùng nguyên liệu thuộc nhóm 2 bằng cách: nâng nhiệt độ thùng lên men với môi trường đã khử trùng đợt 1 lên dần tới 70-80°C, sau đó bổ sung dần nguyên liệu nhóm 2 ở dạng dịch môi trường lỏng qua hệ thống vô trùng, thời gian khử trùng là 30 phút;

hạ nhiệt độ xuống 30°C và bổ sung nguyên liệu nhóm 3 thông qua hệ thống vô trùng, thu được môi trường lên men;

(3) cấy giống và lên men:

các giống vi sinh được lên men trên máy lắc trong bình tam giác vô trùng với tỷ lệ 10% làm giống nguyên chủng để cấy vào thùng lên men giống cấp 1;

giống cấp 1 được chuyển vào thùng lên men giống cấp 2 trên môi trường xốp, tỷ lệ cấp giống 10%, thời gian lên men 48 giờ, thu được giống cấp 2;

cấp giống cấp 2 vào thùng lên men chứa môi trường lên men, lên men sản xuất 72 giờ, có đảo trộn, thu được sản phẩm lên men; và

(4) thu hồi chế phẩm:

kết thúc giai đoạn lên men sản xuất, sản phẩm được tiếp tục đảo trộn và sấy khô ở nhiệt độ 45-50°C trong thùng lên men cho tới độ ẩm đạt 10-15%;

nghiền sản phẩm sau sấy, thu được chế phẩm vi sinh trên môi trường xốp.