



(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) 
2-0002118

(51)⁷ **C12N 1/00, 1/20, A23L 17/00, 27/00** (13) **Y**

(21) 2-2017-00410

(22) 19.12.2017

(45) 25.09.2019 378

(43) 26.02.2018 359

(73) **VIỆN NGHIÊN CỨU HẢI SẢN (VN)**

224 Lê Lai, Ngõ Quyền, thành phố Hải Phòng

(72) **Bùi Thị Thu Hiền (VN), Phạm Thị Điềm (VN), Vũ Thị Quyên (VN), Bùi Thị Minh Nguyệt (VN)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH VẬT DÙNG ĐỂ SINH HƯƠNG
NƯỚC MẮM TRUYỀN THỐNG**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống bao gồm các bước: i) hoạt hóa chủng sản xuất; ii) nhân giống cấp 1; iii) nhân giống cấp 2; iv) nuôi cấy tạo sinh khối; v) thu sinh khối; và vi) tạo chế phẩm vi sinh vật. Trong đó, quy trình theo sáng chế sử dụng 06 chủng vi khuẩn thuần chủng bao gồm *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN01, *Lysinibacillus pakistanensis* MN21, *Rummeliibacillus stabekisii* MN15, *Virgibacillus dokdonensis* MNJ7, *Staphylococcus arlettae* MN18 và *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08 được phân lập từ các mẫu chượp mắm truyền thống. Nước mắm truyền thống thu được sau khi sử dụng chế phẩm này đạt chất lượng cao hơn với sản phẩm nước mắm truyền thống.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống. Cụ thể là quy trình này sử dụng vi sinh vật là các giống vi khuẩn được phân lập từ các chượp nước mắm truyền thống.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mỗi một loài vi sinh vật chỉ có thể sinh trưởng trong một số môi trường nuôi cấy nhất định. Thành phần công thức và các nguyên tố có mặt trong môi trường nuôi cấy được gọi là chất dinh dưỡng hay những chất cần thiết cho sinh trưởng của vi sinh vật. Hầu hết các loài vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* đều có thể sinh trưởng tốt trên các loại môi trường nuôi cấy thông dụng như môi trường NA (nutrient agar) hoặc môi trường TSA (trypticase soy agar). Tuy nhiên, một số loài chỉ có khả năng sinh trưởng trên các loại môi trường ít chất dinh dưỡng hơn hay môi trường có nồng độ chất dinh dưỡng chỉ bằng 1/2 hoặc 1/10 so với công thức của môi trường TSA (Forsyth và Logan, 2002). Đa số các loài vi khuẩn *Bacillus* có thể sử dụng đường glucoza như nguồn cacbon cho sinh trưởng (Logan, 2002). Tuy nhiên, một số loài như *Bacillus azotoformans* chỉ sử dụng các axit hữu cơ làm nguồn cacbon chứ không thể sử dụng được glucoza hoặc cacbon hydrat khác. *Bacillus badius* và *Bacillus benzoovorans* chỉ sinh trưởng khi môi trường có axit amin và axit hữu cơ (De vos và cộng sự, 2009). *Bacillus benzoovorans* không có khả năng sinh trưởng trên môi trường có chứa pepton hoặc trypton nhưng lại có thể sinh trưởng trên môi trường có cao nấm men (Pichinoty và cộng sự, 1984). *Bacillus fastidiosus* sử dụng axit alantoic, alantoin hoặc axit uric như là nguồn cacbon và nguồn nitrogen nhưng một số chủng sinh trưởng vẫn phải cần pepton (Andersch và cộng sự, 1994). *Bacillus psychrodurans* và *Bacillus psychrotolerans* không sinh trưởng hoặc sinh trưởng rất yếu trên môi trường NA, và chúng thường đòi hỏi có chứa casein - pepton và soymeal - pepton (Abd El - Rahman và cộng sự, 2002). *Bacillus sporothermodurans* sinh trưởng chậm trên môi trường NA và chỉ có thể sinh trưởng trên môi trường BHIA (brain heart infusion agar) hoặc môi trường NA có bổ sung vitamin B₂ (Pettersson và cộng sự, 1996).

Staphylococcus là một nhóm các loài thường cư trú ở trên da người và một số loại động vật khác. Tuy nhiên, một số loài khác có thể cư trú ở trong đất, nước, bề mặt trái cây, rau quả hoặc một số các loại thực phẩm lên men (De vos và cộng sự, 2009). *Staphylococcus carnosus* là loài phổ biến thường gặp trong thịt lên men. Hơn 50 năm qua, loài vi khuẩn này đã được sử dụng cùng với *Lactobacillus* và *Pediococcus* để tạo giống khởi động cho lên men lạp xương (Götz, 1990; Liepe and Porobic, 1983).

Staphylococcus condimentii thường được tìm thấy trong đậu tương lên men tạo nước chấm (Probst và cộng sự, 1998), *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* và *Staphylococcus succinus* subsp. *casei* thường tìm thấy trên bề mặt phô mát (Place và cộng sự, 2002; Place và cộng sự, 2003) hoặc *Staphylococcus piscifermentans* trong lên men tôm và thịt (Tanasupawat và cộng sự, 1992). Gần đây, chủng *Staphylococcus carnosus* FS19 cũng đã được sử dụng cùng với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* FS05 để tạo giống khởi động cho lên men nước mắm cá ở Malaysia (Zaman và cộng sự, 2011). Phân lập và đánh giá khả năng sinh trưởng cũng như khả năng tạo sinh khối vi khuẩn *Staphylococcus* thường sử dụng các loại môi trường BHIA (brain heart infusion agar), TSA (trypticase soy agar), P agar hoặc PC skim agar (De vos và cộng sự, 2009).

Tetragenococcus là nhóm vi khuẩn lactic có khả năng chịu muối cao (>18%). Do đó, các loài trong chi *Tetragenococcus* thường được tìm thấy trong các loại thực phẩm lên men có nồng độ muối cao (Kobayashi và cộng sự, 2003; Thongsant và cộng sự, 2002; Chen và cộng sự, 2006). Một số loài khác cũng có thể được phân lập ở mẫu có nồng độ đường cao như *Tetragenococcus halophilus* và *Tetragenococcus muriaticus* (Willems và cộng sự, 2003; Juste và cộng sự, 2008). Một số loài *Tetragenococcus* thường được ứng dụng trong bảo quản một số loại thực phẩm (Kobayashi và cộng sự, 2004) hoặc có thể tạo nên những hương vị đặc trưng cho thực phẩm lên men (Orji và cộng sự, 2003; Uchida và cộng sự, 2005; Chen và cộng sự, 2006). *Tetragenococcus* có thể sinh trưởng ở điều kiện hiếu khí, vi hiếu khí hoặc kỵ khí. Chúng có thể sinh trưởng tốt trên môi trường tổng hợp thường sử dụng cho các loại vi khuẩn lactic như môi trường MRS. Một số loài có thể sinh trưởng tốt trên môi trường TSA (De vos và cộng sự, 2009).

Ở Việt Nam chưa có quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật sinh hương nước mắm truyền thống. Đặc biệt là các vi sinh vật bản địa được phân lập từ các chượp nước mắm truyền thống. Vì vậy, vẫn cần có nhu cầu phát triển một quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật sinh hương nước mắm truyền thống có hiệu suất cao, rút ngắn thời gian chế biến, duy trì được hương thơm của nước mắm truyền thống và có thể kiểm soát được vệ sinh an toàn thực phẩm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là sản xuất được chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống từ nguồn nguyên liệu sẵn có trong nước, đồng thời chế phẩm được tạo ra đáp ứng các chỉ tiêu để dùng trong thực phẩm. Để đạt được mục đích đó, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống bao gồm các bước: (i) hoạt hóa chủng sản xuất; (ii) nhân

giống cấp 1; (iii) nhân giống cấp 2; (iv) nuôi cấy tạo sinh khối; (v) thu sinh khối; và (vi) tạo chế phẩm.

Vi sinh vật được sử dụng cho quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống theo sáng chế là 06 chủng vi khuẩn thuần chủng bao gồm *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN01, *Lysinibacillus pakistanensis* MN21, *Rummeliibacillus stabekisii* MN15, *Virgibacillus dokdonensis* MN17, *Staphylococcus arlettae* MN18 và *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08 được phân lập từ các mẫu chượp mắm truyền thống. Các chủng này được lưu giữ tại phòng thí nghiệm thuộc Viện Nghiên cứu Hải sản.

Chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống thu được đã được phân tích kiểm tra tại Viện Vi sinh và Công nghệ Sinh học – Đại học Quốc Gia Hà Nội.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình nuôi cấy 06 chủng vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống.

Hình 2 là ảnh chụp hình dạng khuẩn lạc và tế bào chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN01.

Hình 3 là ảnh chụp hình dạng khuẩn lạc và tế bào chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08.

Hình 4 là ảnh chụp hình dạng khuẩn lạc và tế bào chủng *Rummeliibacillus stabekisii* MN15.

Hình 5 là ảnh chụp hình dạng khuẩn lạc và tế bào chủng *Virgibacillus dokdonensis* MN17.

Hình 6 là ảnh chụp hình dạng khuẩn lạc và tế bào chủng *Staphylococcus arlettae* MN18.

Hình 7 là ảnh chụp hình dạng khuẩn lạc và tế bào chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vi sinh vật được sử dụng cho quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống theo sáng chế là 06 chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu chượp mắm truyền thống.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Amyloliquefaciens* MN01 được cấy trên môi trường thạch NB, khuẩn lạc có màu trắng sữa, mép hình răng cưa, bề mặt khô

và nhăn nheo, kích thước từ 2,5 đến 3,0mm. Tế bào hình que (kích thước $0,7 - 0,9 \times 1,8 - 3,0\mu\text{m}$), sắp xếp với nhau thành chuỗi, bắt màu Gram dương và nội bào tử nằm ở giữa tế bào.

Chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21 được cấy trên môi trường thạch NB, khuẩn lạc có màu trắng đục, hình dạng không rõ ràng, bề mặt trơn bóng, kích thước từ 3,0 đến 3,5mm. Tế bào hình que (kích thước $0,8 - 1,5 \times 3,0 - 5,0\mu\text{m}$), sắp xếp với nhau thành chuỗi, bắt màu Gram dương, nội bào tử nằm lệch ở 1 phía tế bào và tế bào phình to tại vị trí nội bào tử.

Chủng *Rummeliibacillus stabekisii* MN15 được cấy trên môi trường thạch NB, khuẩn lạc tròn, có màu trắng đục, mép trơn, bề mặt trơn bóng, kích thước từ 2,5 đến 3,0mm, không tạo sắc tố trên môi trường nuôi cấy. Tế bào hình que (kích thước $1,0 - 1,2 \times 3,7 - 3,5\mu\text{m}$), sắp xếp với nhau thành chuỗi, bắt màu Gram dương, nội bào tử nằm lệch ở 1 phía tế bào và tế bào phình to tại vị trí nội bào tử.

Chủng *Virgibacillus dokdonensis* MN17 được cấy trên môi trường thạch NB, khuẩn lạc có dạng tròn, màu trắng đục, ở giữa có vòng đồng tâm hơi ngà vàng, bề mặt trơn bóng, mép trơn, kích thước từ 3,0 đến 3,5mm. Tế bào hình que (kích thước $0,5 - 0,7 \times 2,0 - 3,5\mu\text{m}$), đứng đơn lẻ, xếp đôi hoặc sắp xếp với nhau thành chuỗi, bắt màu Gram dương, nội bào tử nằm lệch ở 1 phía tế bào và tế bào phình to tại vị trí nội bào tử.

Chủng *Staphylococcus arlettae* MN 18 được cấy trên môi trường thạch NB, khuẩn lạc có dạng tròn, màu trắng hơi ngà vàng, bề mặt trơn, kích thước từ 2,5 đến 3,0mm. Tế bào hình cầu (kích thước $1,0 - 1,5\mu\text{m}$), đứng riêng lẻ hoặc sắp xếp với nhau thành đám, bắt màu Gram dương.

Chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08 được cấy trên môi trường thạch MRS, khuẩn lạc có dạng tròn, màu trắng đục, bề mặt trơn, kích thước từ 1,5 đến 2,0mm. Tế bào hình cầu (kích thước $0,7 - 1,0\mu\text{m}$), đứng riêng lẻ và bắt màu Gram dương.

Các môi trường nuôi cấy được sử dụng có thành phần như sau:

- Môi trường thạch NA bao gồm các thành phần (g/L): cao bò 3g; pepton 5g; agar 15g; và nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH là $6,5 \pm 0,2$.
- Môi trường thạch NB bao gồm các thành phần (g/L): cao bò 3g; pepton 5g; và nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH là $6,5 \pm 0,2$.
- Môi trường MRS bao gồm các thành phần (g/L): proteoza pepton No.3 10g; cao bò 10g; cao men 5g; dextroza 20g; polysorbat 80 1g; amoni xitrat 2g; natri axetat 5g; magiê sulfat 0,1g; mangan sulfat 0,05g; kali phosphat 2g; agar 15g; và nước cất vừa đủ 1000ml.

– Môi trường TSA bao gồm các thành phần (g/L): casein thủy phân 15g; đậu tương thủy phân 5g; NaCl 5g; agar 15g; và nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH là $6,5 \pm 0,2$.

– Môi trường TSB bao gồm các thành phần (g/L): casein thủy phân 15g; đậu tương thủy phân 5g; NaCl 5g; và nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH là $6,5 \pm 0,2$

Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống theo sáng chế bao gồm các bước như sau:

i) Hoạt hóa chủng sản xuất

06 chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* MN01, *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08, *Rummeliibacillus stabekisii* MN15, *Virgibacillus dokdonensis* MN17, *Staphylococcus arlettae* MN18, *Lysinibacillus pakistanensis* MN21 thuần chủng, có khả năng sinh hương nước mắm, có tần suất bắt gặp cao trong các thảng được phân lập, tuyển chọn từ các chượp mắm truyền thống, được lưu giữ và bảo quản trong môi trường LB chứa 20% glyxerol ở nhiệt độ -80°C . Để hoạt hóa các chủng này, 05 chủng bao gồm *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN01, *Lysinibacillus pakistanensis* MN21, *Rummeliibacillus stabekisii* MN15, *Virgibacillus dokdonensis* MM17 và *Staphylococcus arlettae* MN18 được cấy vạch 3 pha trên môi trường thạch NA; chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MM 08 được cấy vạch 3 pha trên môi trường thạch MRS.

Các chủng sau khi hoạt hóa được tiến hành kiểm tra độ thuần khiết và đặc điểm hình thái của chủng trước khi nhân giống.

Độ thuần khiết của 06 chủng được kiểm tra dựa vào hình dạng khuẩn lạc mọc trên đường cấy ria 3 pha. Nếu các khuẩn lạc mọc đều, giống nhau về màu sắc, hình dạng bề mặt khuẩn lạc, mép khuẩn lạc cũng như bề mặt khuẩn lạc, đồng đều nhau về kích thước ở các pha cấy thì được xem như là thuần khiết tức không bị tạp nhiễm.

ii) Nhân giống cấp 1

Sau khi được hoạt hóa trên môi trường thạch NA hoặc MRS và kiểm tra độ thuần khiết, cấy riêng từ 02 đến 04 khuẩn lạc thuần chủng của 06 chủng vi khuẩn lần lượt vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường, trong đó môi trường TSA cho các chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN01, *Rummeliibacillus stabekisii* MN15, *Virgibacillus dokdonensis* MN17, *Staphylococcus arlettae* MN18; môi trường NB cho chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21 và môi trường MRS cho chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08.

Sau 18-24 giờ nuôi cấy lắc tại tốc độ 160 vòng/phút ở 30°C, mật độ tế bào được đo trên máy quang phổ ở bước sóng 600nm, nếu mật độ tế bào đạt $OD_{600} \geq 1,5$, quá trình nhân giống cấp 1 được hoàn thành. Dịch nuôi cấy được nhuộm soi dưới kính hiển vi để đảm bảo độ thuần khiết của giống cấy.

iii) Nhân giống cấp 2

Nuôi cấy lắc chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN01: lấy 1% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày.

Nuôi cấy lắc chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08: lấy 2% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường MRS, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 3 ngày.

Nuôi cấy lắc chủng *Rummeliibacillus stabekisii* MN15: lấy 1,5% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày.

Nuôi cấy lắc chủng *Virgibacillus dokdonensis* MN17: lấy 2% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày.

Nuôi cấy lắc chủng *Staphylococcus arlettae* MN18: lấy 1% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày.

Nuôi cấy lắc chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21: lấy 2% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường NB, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày.

Dịch nuôi cấy được sử dụng làm giống cấy cho các nồi lên men với công suất nuôi sinh khối là 10 lít/mẻ.

iv) Nuôi cấy tạo sinh khối

Lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* MN01 trong môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 0,5%, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày.

Lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08 trong môi trường MRS với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, thời gian nuôi cấy là 3 ngày.

Lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Rummeliibacillus stabekisii* MN15 trong môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 1,5%, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày.

Lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Virgibacillus dokdonensis* MN17 trong môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày.

Lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Staphylococcus arlettae* MN18 trong môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày.

Lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21 trong môi trường NB với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày.

Sau khi tiến hành nuôi cấy, thời điểm vi khuẩn tạo sinh khối cao nhất (dựa OD₆₀₀), dịch nuôi cấy được thu hồi sinh khối.

v) Thu sinh khối

Sinh khối lên men của 06 chủng nêu trên được li tâm với tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút. 2/3 phần dịch trong phía trên được từ từ loại bỏ và tế bào vi khuẩn được trộn đều nhẹ nhàng để làm tan vi khuẩn vào trong 1/3 phần dịch trong còn lại. Sau đó, dịch huyền phù của 06 chủng vi khuẩn này được trộn lẫn với nhau theo tỷ lệ thể tích 1:1:1:1:1:1 để thu được hỗn hợp sinh khối.

vi) Tạo chế phẩm vi sinh vật

Hỗn hợp sinh khối của các chủng vi khuẩn thu được được trộn với hỗn hợp chất mang theo tỷ lệ trọng lượng 1:10, trong đó hỗn hợp chất mang bao gồm bột đậu tương, bột cám gạo và bột ngô với tỷ lệ trọng lượng 1:1:1. Sau khi trộn đều xong, hỗn hợp được ủ ở 30°C trong 24 giờ nhằm ổn định tế bào vi khuẩn và cũng nhằm kích thích sự tăng sinh của vi khuẩn trong giai đoạn này. Kết thúc quá trình ủ, hỗn hợp chất mang và vi khuẩn được sấy khô ở nhiệt độ 40°C. Sau đó, chế phẩm được nghiền to trước khi đem đi định lượng vi sinh vật và bảo quản.

Sau khi làm khô và sau khi bảo quản 3 tháng, số lượng tế bào của các chủng vi khuẩn đếm được như sau:

Chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* MN01 có số lượng tế bào sau làm khô là $8,7 \times 10^{11}$ CFU/gram chế phẩm. Sau 3 tháng bảo quản, số lượng tế bào là $2,6 \times 10^{11}$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ thường và $4,3 \times 10^{11}$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ 4°C.

Chủng vi khuẩn *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08 có số lượng tế bào sau làm khô là $1,1 \times 10^{10}$ CFU/gram chế phẩm. Sau 3 tháng bảo quản, số lượng tế bào vi khuẩn duy trì được ở nồng độ $1,5 \times 10^6$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ thường và $1,4 \times 10^9$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ 4°C.

Chủng vi khuẩn *Rummeliibacillus stabekisii* MN15 có số lượng tế bào sau làm khô là $3,8 \times 10^{11}$ CFU/gram chế phẩm. Sau 3 tháng bảo quản, số lượng tế bào vi khuẩn duy trì được ở nồng độ $1,1 \times 10^{11}$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ thường và $2,9 \times 10^{11}$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ 4°C.

Chủng vi khuẩn *Virgibacillus dokdonensis* MN17 có số lượng tế bào sau làm khô là $6,7 \times 10^{11}$ CFU/gram chế phẩm. Sau 3 tháng bảo quản, số lượng tế bào vi khuẩn duy trì được ở nồng độ $1,9 \times 10^{11}$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ thường và $8,1 \times 10^{11}$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ 4°C.

Chủng vi khuẩn *Staphylococcus arlettae* MN18 có số lượng tế bào sau làm khô là $4,1 \times 10^{11}$ CFU/gram chế phẩm. Sau 3 tháng bảo quản, số lượng tế bào vi khuẩn duy trì được ở nồng độ $2,1 \times 10^8$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ thường và $2,4 \times 10^{10}$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ 4°C.

Chủng vi khuẩn *Lysinibacillus pakistanensis* MN21 có số lượng tế bào sau làm khô là $8,5 \times 10^9$ CFU/gram chế phẩm. Sau 3 tháng bảo quản, số lượng tế bào vi khuẩn duy trì được ở nồng độ $3,6 \times 10^9$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ thường và $6,5 \times 10^9$ CFU/gram chế phẩm ở nhiệt độ 4°C.

Chế phẩm khô thu được của 06 chủng nêu trên được tiến hành bao gói trong túi kín và bảo quản ở nhiệt độ thường hoặc nhiệt độ mát.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống

Hoạt hóa 06 chủng vi khuẩn thuần chủng trên đĩa thạch NA hoặc MRS, kiểm tra độ thuần khiết của các chủng dựa vào hình dạng khuẩn lạc mọc trên đường rìa 3 pha. Nếu các khuẩn lạc mọc đều, giống nhau về màu sắc, hình dạng bề mặt khuẩn lạc, mép khuẩn lạc cũng như bề mặt khuẩn lạc, đồng đều nhau về kích thước ở các pha cấy thì được xem như là thuần khiết tức không bị tạp nhiễm.

Nhân giống cấp 1: Sử dụng từ 02 đến 04 khuẩn lạc thuần chủng của 06 chủng vi khuẩn lần lượt vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSA cho các chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN01, *Rummeliibacillus stabekisii* MN15, *Virgibacillus dokdonensis* MN17 và *Staphylococcus arlettae* MN18; môi trường NB cho chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21 và môi trường MRS cho chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08. Sau 18 - 24 giờ nuôi cấy

lắc tại tốc độ 160 vòng/phút ở 30°C, mật độ tế bào được đo trên máy quang phổ ở bước sóng 600nm, nếu mật độ tế bào đạt $OD_{600} \geq 1,5$, quá trình nhân giống cấp 1 được hoàn thành. Dịch nuôi cấy được nhuộm soi dưới kính hiển vi để đảm bảo độ thuần khiết của giống cấy.

Nhân giống cấp 2: cũng được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy lắc, từ dịch nuôi cấy cấp 1, trong đó nuôi cấy lắc chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN01: lấy 1% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày; nuôi cấy lắc chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08: lấy 2% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường MRS, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 3 ngày; nuôi cấy lắc chủng *Rummeliibacillus stabekisii* MN15: lấy 1,5% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày; nuôi cấy lắc chủng *Virgibacillus dokdonensis* MN17: lấy 2% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày; nuôi cấy lắc chủng *Staphylococcus arlettae* MN18: lấy 1% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày; nuôi cấy lắc chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21: lấy 2% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường NB, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày. Dịch nuôi cấy được sử dụng làm giống cấy cho các nồi lên men với công suất nuôi sinh khối là 10 lít/mẻ.

Nuôi cấy tạo sinh khối: lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* MN01 trong 10 lít môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 0,5%, độ pH là $6,5 \pm 0,2$, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày; lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08 trong 10 lít môi trường MRS với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, thời gian nuôi cấy là 3 ngày; lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Rummeliibacillus stabekisii* MN15 trong 10 lít môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 1,5%, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày; lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Virgibacillus dokdonensis* MN17 trong 10 lít môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày; lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Staphylococcus arlettae* MN18 trong 10 lít môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày; lên men

dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21 trong 10 lít môi trường NB với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

Thu sinh khối: Sau khi tiến hành nuôi cấy đến thời điểm vi khuẩn tạo sinh khối cao nhất, dịch nuôi cấy được gom lại và đưa đi ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút. 2/3 phần dịch trong phía trên được từ từ loại bỏ và tế bào vi khuẩn được trộn đều nhẹ nhàng để làm tan vi khuẩn vào trong 1/3 phần dịch trong còn lại. Dịch huyền phù vi khuẩn thu được khoảng 100gram/10 lít môi trường nuôi cấy. Sau đó, dịch huyền phù của 06 chủng vi khuẩn này được trộn lẫn với nhau theo tỷ lệ thể tích 1:1:1:1:1:1 để thu được hỗn hợp sinh khối.

Tạo chế phẩm: hỗn hợp sinh khối thu được sau đó được trộn với hỗn hợp chất mang là bột đậu tương, bột cám gạo và bột ngô (tỷ lệ 1:1:1) với tỷ lệ trọng lượng 1:10 để tạo chế phẩm vi sinh, sao cho hỗn hợp trộn cuối cùng có độ ẩm khoảng 60%. Sau khi trộn xong, hỗn hợp được ủ ở 30°C trong 24 giờ nhằm ổn định tế bào vi khuẩn và cũng nhằm kích thích sự tăng sinh của vi khuẩn trong giai đoạn này. Kết thúc quá trình ủ, hỗn hợp chất mang và vi khuẩn được sấy khô ở nhiệt độ 40°C. Sau đó, chế phẩm được nghiền to trước khi đem đi định lượng vi sinh vật và bảo quản.

Chế phẩm khô thu được ở trên được đóng túi kín và bảo quản chế phẩm ở 2 điều kiện là (i) điều kiện thường (trong phòng khô ráo, thoáng mát, tránh ánh sáng mặt trời) và (ii) điều kiện 4°C trong ngăn mát tủ lạnh. Sau thời gian bảo quản là 1 tháng, 2 tháng và 3 tháng, tế bào vi khuẩn được định lượng lại để so sánh với lượng tế bào ban đầu.

Ví dụ 2: Thử nghiệm chế phẩm

Sau quá trình thủy phân cá bằng enzym proteaza, dịch chượp được bơm hút ra bể, bổ sung chế phẩm vi sinh theo sáng chế với tỷ lệ 0,2% (khối lượng) so với khối lượng chượp (1 tấn chượp cần 2kg chế phẩm vi sinh), trộn đảo đều và ủ, chăm sóc. Sau 1 tháng, chượp xuất hiện hương mắm nhẹ (theo phương pháp thông thường thì sau 3 tháng mới xuất hiện hương mắm). Hương mắm của sản phẩm cuối cùng có mùi đặc trưng, không có mùi đậm thối, không "khắm" như mắm truyền thống thông thường, nhưng vẫn giữ được hương mắm. Sản phẩm đã được phân tích hương mắm tại Đại học Bách Khoa Hà Nội.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Lần đầu tiên tại Việt Nam tạo ra được quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống bao gồm hỗn hợp 06 chủng vi khuẩn. Sản

phẩm đã được Phòng thí nghiệm của Viện Vi sinh và Công nghệ Sinh học – Đại học Quốc Gia Hà Nội kiểm định.

Quy trình theo sáng chế góp phần tạo ra sản phẩm chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống đáp ứng nhu cầu thị trường nước mắm truyền thống trong nước.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng để sinh hương nước mắm truyền thống, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) hoạt hóa chủng sản xuất

hoạt hóa 06 chủng vi khuẩn thuần chủng bao gồm *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* MN01, *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08, *Rummeliibacillus stabekisii* MN15, *Virgibacillus dokdonensis* MN17, *Staphylococcus arlettae* MN18, *Lysinibacillus pakistanensis* MN21 đã được phân lập từ các chượp mắm truyền thống, được lưu giữ và bảo quản trong môi trường LB chứa 20% glycerol ở nhiệt độ -80°C, trong đó cấy vạch 3 pha trên môi trường thạch NB với 05 chủng bao gồm *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN 01, *Lysinibacillus pakistanensis* MN 21, *Rummeliibacillus stabekisii* MN 15, *Virgibacillus dokdonensis* MN 17 và *Staphylococcus arlettae* MN 18 ; và cấy vạch 3 pha trên môi trường thạch MRS với chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MM 08;

sau khi hoạt hóa, kiểm tra lại độ thuần khiết và đặc điểm hình thái của các chủng này dựa vào hình dạng khuẩn lạc mọc trên đường cấy ria 3 pha;

ii) nhân giống cấp 1

sau khi được hoạt hóa trên môi trường thạch NA hoặc MRS, lấy 02 đến 04 khuẩn lạc thuần chủng của 06 chủng vi khuẩn để lần lượt cấy riêng vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường, trong đó môi trường TSA cho các chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN01, *Rummeliibacillus stabekisii* MN15, *Virgibacillus dokdonensis* MN17 và *Staphylococcus arlettae* MN18, môi trường NB cho chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21 và môi trường MRS cho chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08; sau 18 - 24 giờ nuôi cấy lắc tại tốc độ 160 vòng/phút ở 30°C, đo mật độ tế bào trên máy quang phổ ở bước sóng 600nm, nếu mật độ tế bào đạt $OD_{600} \geq 1,5$, quá trình nhân giống cấp 1 được hoàn thành;

iii) nhân giống cấp 2

nuôi cấy lắc chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* MN01: lấy 1% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

nuôi cấy lắc chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08: lấy 2% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường MRS, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 3 ngày;

nuôi cấy lắc chủng *Rummeliibacillus stabekisii* MN15: lấy 1,5% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

nuôi cấy lắc chủng *Virgibacillus dokdonensis* MN17: lấy 2% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

nuôi cấy lắc chủng *Staphylococcus arlettae* MN18: lấy 1% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường TSB, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

nuôi cấy lắc chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21: lấy 2% tỷ lệ giống đã được nhân giống cấp 1 cấy vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường NB, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, tốc độ 160 vòng/phút và thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

iv) nuôi cấy tạo sinh khối

lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* MN01 trong môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 0,5%, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* MN08 trong môi trường MRS với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, thời gian nuôi cấy là 3 ngày;

lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Rummeliibacillus stabekisii* MN15 trong môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 1,5%, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Virgibacillus dokdonensis* MN17 trong môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Staphylococcus arlettae* MN18 trong môi trường TSB với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 35°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

lên men dịch nuôi cấy cấp 2 của chủng *Lysinibacillus pakistanensis* MN21 trong môi trường NB với tỷ lệ giống cấy 2,0%, nhiệt độ nuôi cấy 30°C, thời gian nuôi cấy là 2 ngày;

v) thu sinh khối

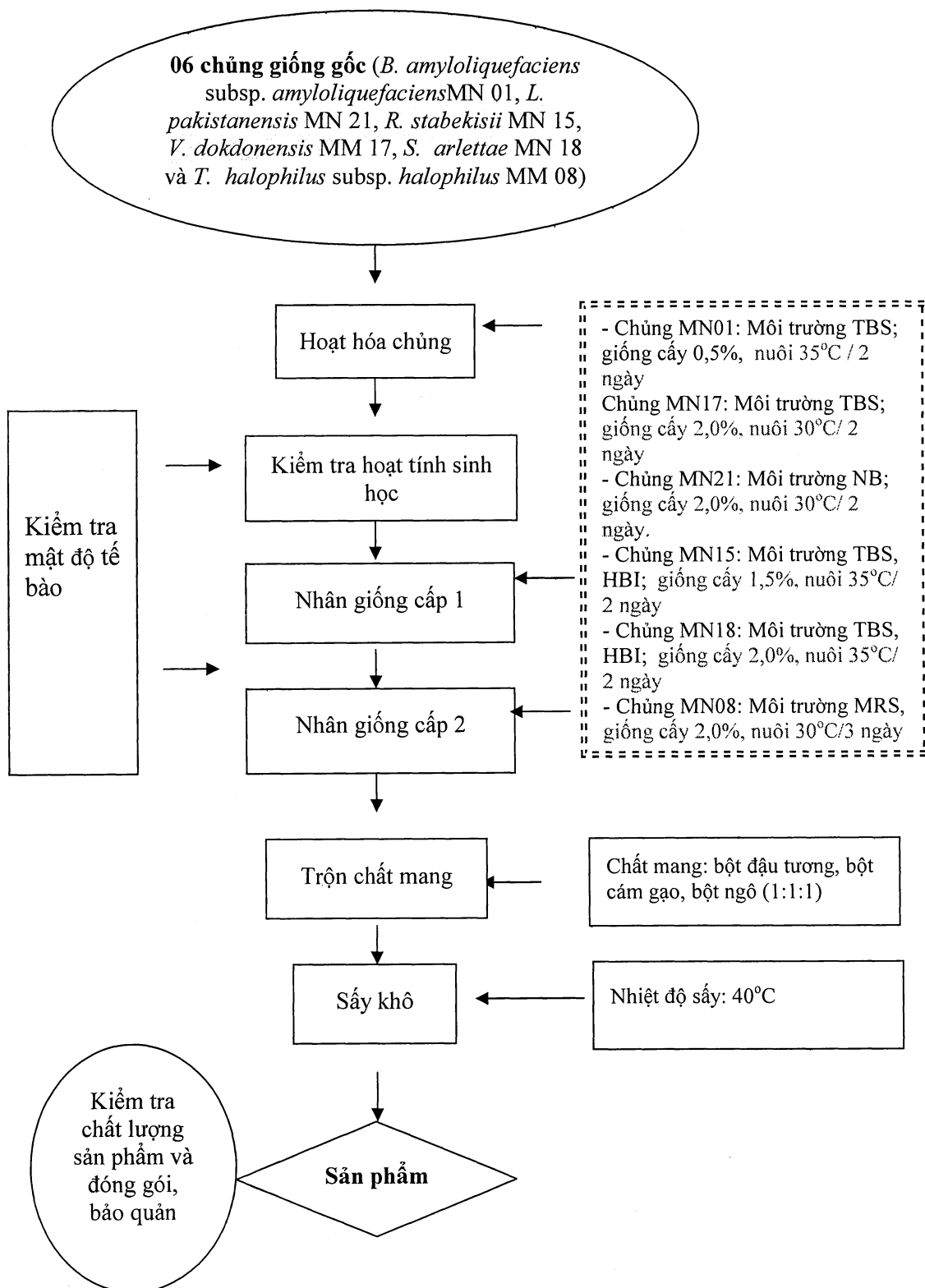
ly tâm sinh khối lên men của 6 chủng nêu trên với tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút; loại bỏ từ từ 2/3 phần dịch trong phía trên và tế bào vi khuẩn được trộn đều

nhẹ nhàng để làm tan vi khuẩn vào trong 1/3 phần dịch trong còn lại; sau đó, trộn lẫn dịch huyền phù của 6 chủng vi khuẩn này với nhau theo tỷ lệ thể tích 1:1:1:1:1:1 để thu được hỗn hợp sinh khối; và

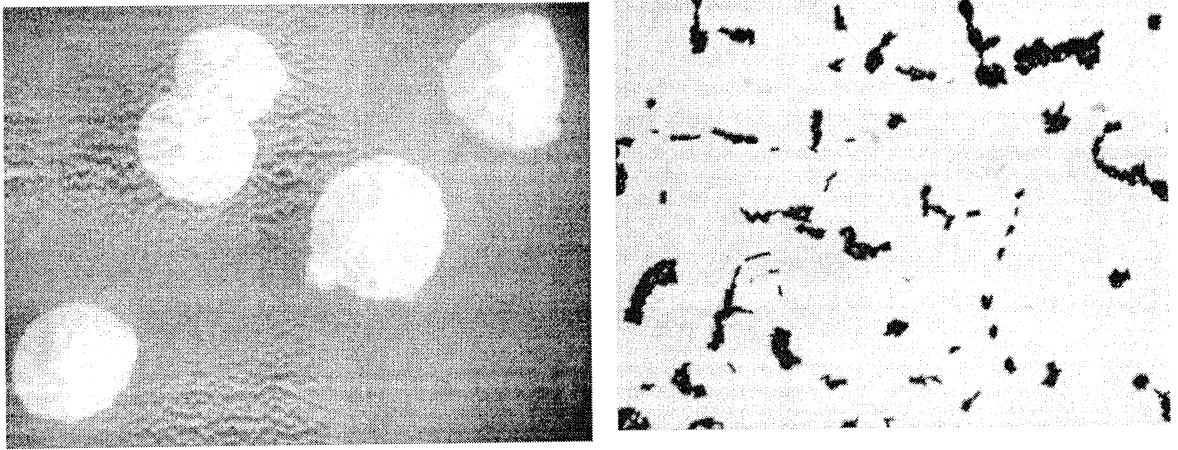
vi) tạo chế phẩm vi sinh vật

trộn hỗn hợp sinh khối của các chủng vi khuẩn thu được với hỗn hợp chất mang theo tỷ lệ trọng lượng 1:10, trong đó hỗn hợp chất mang bao gồm bột đậu tương, bột cám gạo và bột ngô với tỷ lệ trọng lượng 1:1:1; ủ ở 30°C trong 24 giờ, sấy khô hỗn hợp ở nhiệt độ 40°C; và nghiền tơi hỗn hợp để tạo ra chế phẩm dạng bột.

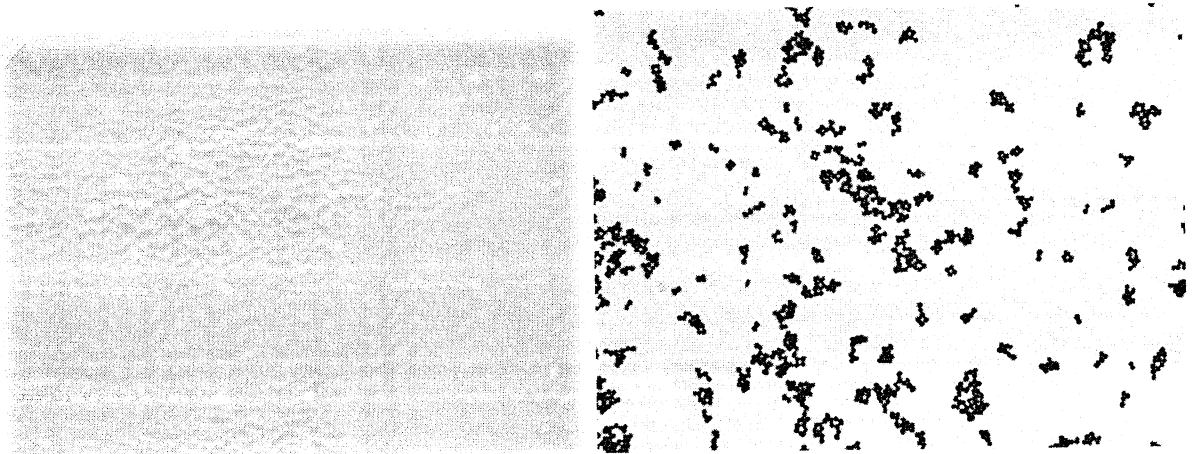
Hình 1



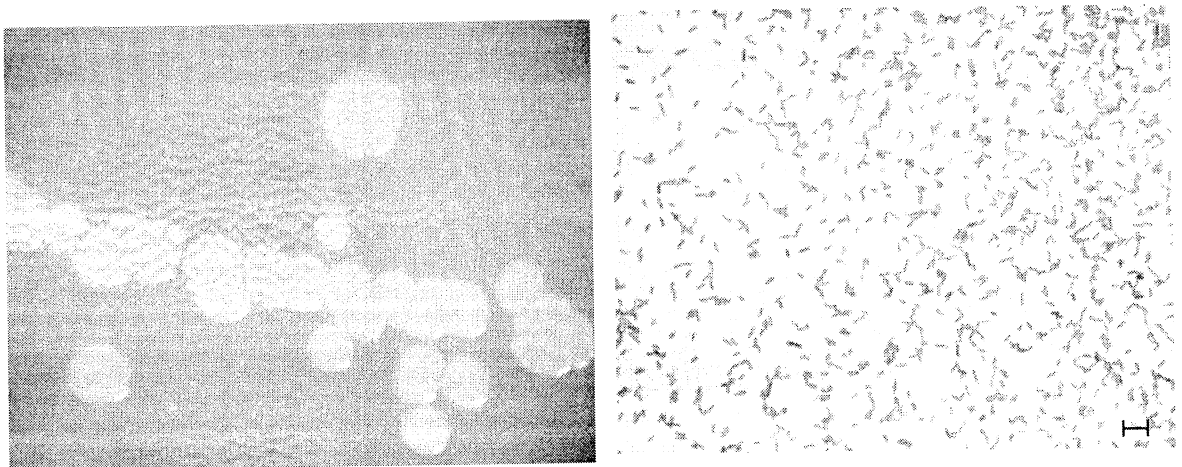
Hình 2



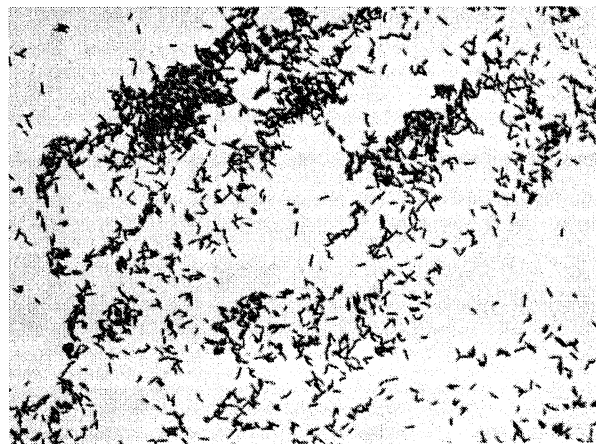
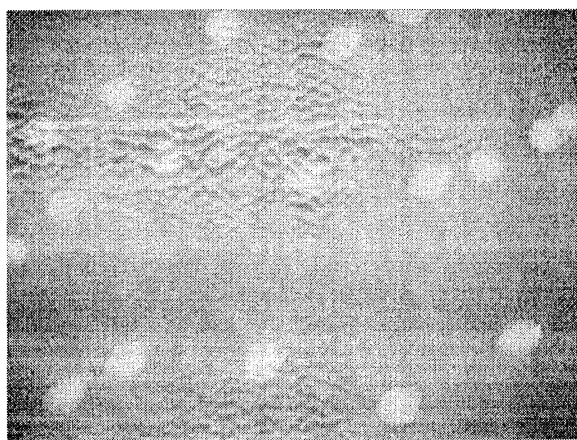
Hình 3



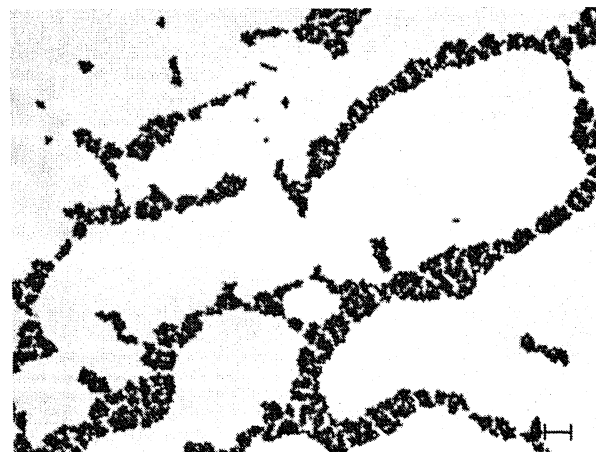
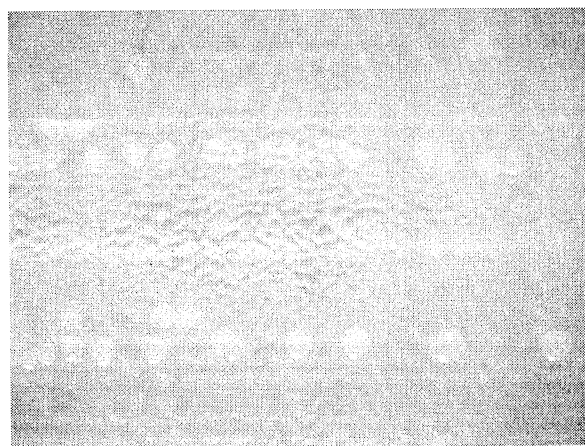
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7

