



(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)



2-0002295

(51)⁷ **C12P 1/04; C12R 1/07; C12N 1/00; C12N 9/00** (13) **Y**

(21) 2-2019-00234

(22) 24/12/2015

(67) 1-2015-04932

(45) 27/04/2020 385

(43) 25/03/2016 336A

(73) **VIỆN VI SINH VẬT VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC - ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ
NỘI (VN)**

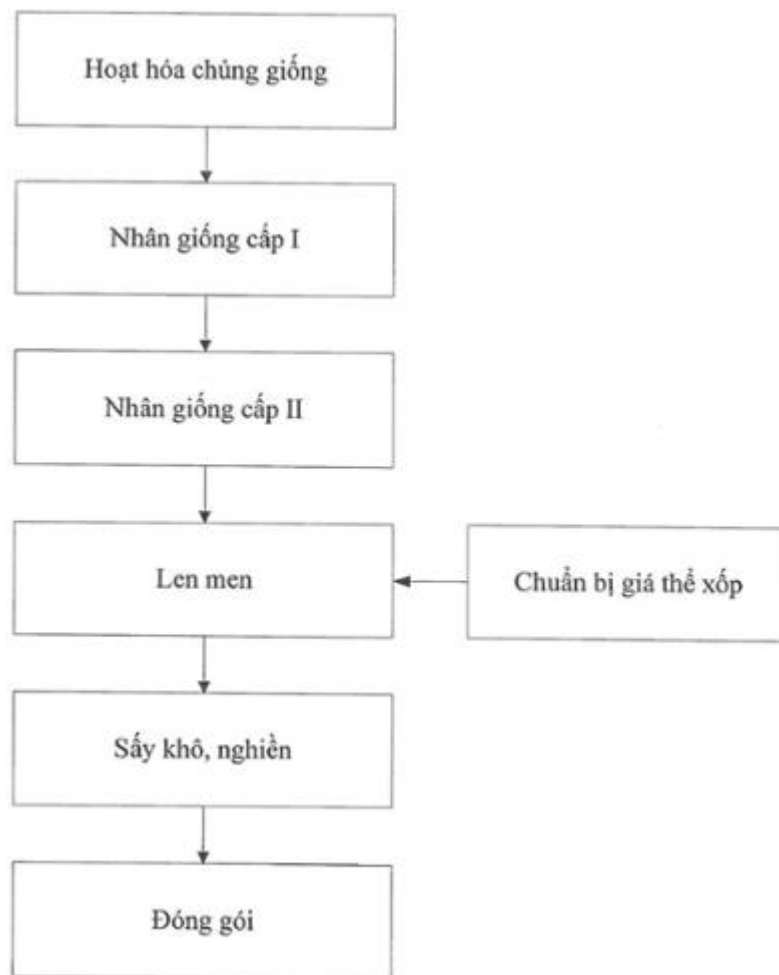
Nhà E2 - 144 đường Xuân Thủy, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Đào Thị Lương (VN); Dương Văn Hợp (VN); Trịnh Thành Trung (VN)**

(74) **Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM PROBIOTIC-ĐA ENZYM TỪ CHỦNG VI
KHUẨN BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS SUBSP. PLANTARUM SP1901**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình lên men xộp sản xuất chế phẩm probiotic-đa enzym từ chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901. Theo giải pháp hữu ích, chế phẩm probiotic-đa enzym được sản xuất theo quy trình này chứa sinh khối tế bào của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 và ít nhất ba enzym phytaza, proteaza và xylaza được sản sinh từ chủng này, và được sử dụng làm chất bổ sung trong ngành công nghiệp sản xuất thức ăn chăn nuôi.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm probiotic-đa enzym từ chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901. Chế phẩm probiotic-đa enzym được sản xuất từ quy trình này chứa sinh khối tế bào của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 và ít nhất ba enzym phytaza, proteaza và xylaza.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Sự gia tăng dân số thế giới kéo theo nhu cầu thực phẩm cho con người ngày càng gia tăng. Điều đó đòi hỏi ngành công nghiệp chăn nuôi phải phát triển và có những bước tiến nhất định về công nghệ để đáp ứng nhu cầu cho con người. Trong hệ thống chăn nuôi thì thức ăn thường chiếm chi phí lớn nhất, lên đến 70% tổng chi phí, và lợi nhuận thu được phụ thuộc vào giá thành và giá trị dinh dưỡng của các thành phần thức ăn có sẵn. Nếu thức ăn không được các động vật tiêu hóa một cách hiệu quả nhất có thể thì không những gây lãng phí cho nhà sản xuất mà còn ảnh hưởng đến môi trường. Trong khi đó, quá trình tiêu hóa của động vật thường không đạt 100% hiệu quả và thường vẫn còn 15-25% lượng thức ăn chúng ăn vào không tiêu hóa được. Điều này có thể là do các thành phần thức ăn chứa các yếu tố kháng dinh dưỡng không thể tiêu hóa được và làm nhiễu quá trình tiêu hóa, hoặc do động vật không có các enzym đặc hiệu phá vỡ các thành phần nào đó trong thức ăn. Khi đó thức ăn tồn đọng trong dạ dày có thể làm ảnh hưởng đến quá trình tiêu hóa bình thường, dẫn đến làm giảm sản lượng thịt, trứng và còn có thể gây rối loạn tiêu hóa.

Nhờ những cải tiến về công nghệ chăn nuôi, những nghiên cứu và ứng dụng enzym vào quá trình chế biến thức ăn chăn nuôi ngày càng được quan tâm. Cho đến nay, khoảng 65% thức ăn cho gia cầm trên toàn thế giới có bổ sung enzym. Việc cung cấp thức ăn cùng với các enzym đặc hiệu làm cải thiện giá trị dinh dưỡng của các thành phần thức ăn giúp tăng hiệu quả tiêu hóa. Các enzym chăn nuôi giúp phá vỡ các yếu tố kháng dinh dưỡng (ví dụ như chất xơ, phytat) có mặt trong nhiều thành phần thức ăn chăn nuôi, đồng thời nhằm làm tăng khả năng tiêu hóa tinh bột, protein, các axit amin và các khoáng chất như phospho, canxi từ các thành phần trong thức ăn. Ngoài ra, chúng có thể được

sử dụng để bổ sung cho các vật nuôi còn non, do hệ thống tiêu hóa của chúng chưa trưởng thành. Enzym là các protein được tiêu hóa cuối cùng hoặc bị bài tiết ra bởi vật nuôi, do vậy mà nó không để lại dư lượng trong trứng hoặc thịt. Việc bổ sung enzym trong thức ăn chăn nuôi mang lại nhiều lợi ích bao gồm làm tăng hiệu quả tiêu hóa thức ăn dẫn đến giảm chi phí sản xuất và giá thành sản phẩm, ít gây ảnh hưởng đến môi trường nhờ việc tiêu hóa và hấp thu tốt chất dinh dưỡng có thể làm giảm lượng chất thải chăn nuôi và hạn chế sự bài tiết phospho và nitơ, cải thiện tính nhất quán và tạo nên thức ăn phù hợp hơn cho sự tăng trưởng và sản xuất trứng, thịt của vật nuôi đồng đều hơn, đồng thời giúp duy trì sức khỏe đường tiêu hóa cho vật nuôi.

Các enzym thường được sử dụng trong chăn nuôi bao gồm: amylaza, xenlulaza, phytaza, proteaza, xylanaza, v.v. và được phân loại theo cơ chất mà chúng tác động. Hiện nay, trong dinh dưỡng vật nuôi, các nhóm enzym được sử dụng bao gồm các nhóm phân giải tinh bột-carbohydraza, chất xơ-xylanaza, các protein-proteaza và phytat-phytaza.

Ngoài ra, bên cạnh các enzym, người ta còn bổ sung vào thức ăn chăn nuôi một số vi sinh vật sống được gọi là probiotic mà khi dùng với số lượng hợp lý sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho người và vật nuôi. Các vi khuẩn probiotic làm cải thiện các chức năng hoặc thành phần vi sinh vật đường ruột và đáp ứng miễn dịch, giúp các vật chủ khỏe để duy trì một “trạng thái sinh lý ổn định” trong ruột hoặc kiểm soát một số bệnh nhiễm trùng, viêm và các phản ứng miễn dịch.

Việt Nam là nước nông nghiệp với rất nhiều loại nông sản được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu cho chế biến thực phẩm như sản xuất đồ uống, thực phẩm chức năng cũng như chế biến thức ăn chăn nuôi. Thực tế, công nghệ chế biến những sản phẩm này đều cần enzym như proteaza, xylanaza, phytaza, v.v.. Tuy nhiên, Việt Nam chưa chủ động sản xuất được các enzym đó mà đa số phải nhập khẩu các nguồn enzym từ nước ngoài.

Hơn nữa, mặc dù đã có nhiều công trình nghiên cứu các enzym khác nhau trên các chủng vi sinh vật phân lập từ nhiều nguồn khác nhau nhưng các nghiên cứu phát triển công nghệ quy mô công nghiệp thì rất ít. Các đề tài nghiên cứu chủ yếu tập trung vào công nghệ sử dụng kỹ thuật gen để tạo chủng vi sinh vật sản xuất enzym tái tổ hợp.

Ngoài ra, hiện nay một số cơ sở sản xuất ở Việt Nam cũng đang áp dụng quy trình sản xuất chế phẩm đa probiotic-đa enzym từ các chủng vi sinh vật probiotic và các chủng vi sinh vật có khả năng sản sinh enzym cao. Hạn chế của các quy trình này là cần tuyển chọn các chủng vi sinh vật sản sinh từng loại enzym cụ thể và sau đó lên men và thu sinh khối tế bào và các enzym được thu riêng rẽ rồi phối trộn theo tỷ lệ xác định để thu sản phẩm probiotic-đa enzym. Với quy trình này, sản phẩm được tạo ra có chất lượng ổn định, và có thể phối trộn với các tỷ lệ phù hợp với nhu cầu. Tuy nhiên, quy trình phức tạp do phải thực hiện lên men và thu sinh khối tế bào cũng như các enzym một cách riêng rẽ, dẫn đến tốn thời gian cũng như cần sử dụng nhiều chủng giống cũng như trang thiết bị.

Do đó, nhóm tác giả giải pháp hữu ích đã triển khai các nghiên cứu để nhằm tạo ra các chế phẩm enzym cho chăn nuôi ở quy mô công nghiệp với quy trình đơn giản, dễ thực hiện dựa trên các nguyên liệu trong nước, hạn chế nhập khẩu.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Với mong muốn nêu trên, mục đích của giải pháp hữu ích là đưa ra quy trình sản xuất chế phẩm probiotic-đa enzym dùng cho chăn nuôi ở quy mô công nghiệp, đơn giản, dễ thực hiện từ một chủng vi sinh vật duy nhất, an toàn và có nguồn gốc trong nước. Mục đích khác của giải pháp hữu ích là đề xuất chế phẩm probiotic-đa enzym có chứa sinh khối tế bào của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 và ít nhất ba enzym phytaza, proteaza và xylaza được sản xuất từ quy trình theo giải pháp hữu ích.

Để đạt được mục đích nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm probiotic-đa enzym từ chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 bằng cách nuôi cấy trên giá thể xốp. Theo giải pháp hữu ích, quy trình bao gồm hoạt hóa chủng giống; nhân giống cấp I; nhân giống cấp II; phối trộn cơ chất với dịch khoáng PSM-K₂HPO₄ để tạo ra giá thể lên men xốp, cấy giống lên men vào giá thể lên men này và thực hiện lên men xốp để thu sản phẩm lên men; và sấy khô và nghiền nhỏ sản phẩm lên men để thu sản phẩm cuối cùng.

Các dấu hiệu và các đặc điểm nổi bật của giải pháp hữu ích sẽ được hiểu đầy đủ và được đánh giá đúng từ phần mô tả chi tiết sau đây dựa trên các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là lược đồ thể hiện quy trình sản xuất chế phẩm probiotic-đa enzym theo giải pháp hữu ích;

Fig.2a thể hiện cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn SP1901 và các loài *Bacillus* có quan hệ họ hàng gần dựa vào trình tự gen 16S ARNr;

Fig.2b thể hiện cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn SP1901 và các loài thuộc nhóm *Bacillus subtilis* dựa vào trình tự kết nối 6 gen *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL* và 16S ARNr; và

Các Fig.3a, Fig.3b, Fig.3c và Fig.3d là các đồ thị thể hiện ảnh hưởng của tỷ lệ giống, tốc độ khuấy, lưu lượng khí và thời gian đến mật độ tế bào thu được trong bước nhân giống chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được thể hiện rõ ràng hơn trong phần mô tả chi tiết các phương án thực hiện sau đây. Tuy nhiên, giải pháp hữu ích không bị giới hạn ở các phương án đó.

Theo giải pháp hữu ích, các môi trường dinh dưỡng được sử dụng bao gồm:

1. Môi trường dịch dinh dưỡng (Nutrient Broth-NB): pepton – 10g; cao thịt – 3g; NaCl – 8g; nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH là 7.
2. Môi trường thạch dinh dưỡng (Nutrient agar-NA): pepton – 10g; cao thịt – 3g; thạch – 16g; NaCl – 5g; nước cất vừa đủ 1000ml; độ pH là 7.
3. Môi trường thạch PSM-Na-phytat: Glucoza – 10g; Na-phytat – 4g; CaCl₂ – 2g; NH₄NO₃ – 5g; KCl – 0,5g; MgSO₄.7H₂O – 0,5g; FeSO₄ – 0,01g; MnSO₄ – 0,01g; thạch – 16g; nước cất vừa đủ 1000ml.
4. Dịch khoáng MA1: MgSO₄.7H₂O – 0,5g; K₂HPO₄ – 1,5g; nước cất vừa đủ 1000ml.
5. Dịch khoáng MA5: (NH₄)₂SO₄ – 0,4g; MgSO₄.7H₂O – 0,2g; CaCl₂ – 2,2g; nước cất vừa đủ 1000ml.
6. Dịch khoáng PSM: Glucoza – 10g; CaCl₂ – 2g; NH₄NO₃ – 5g; KCl – 0,5g; MgSO₄.7H₂O – 0,5g; FeSO₄ – 0,01g; MnSO₄ – 0,01g; nước cất vừa đủ 1000ml.

7. Dịch khoáng PSM-K₂HPO₄: Glucoza – 10g; CaCl₂ – 2g; NH₄NO₃ – 5g; KCl – 0,5g; MgSO₄.7H₂O – 0,5g; FeSO₄ – 0,01g; MnSO₄ – 0,01g; K₂HPO₄ – 1,5g; nước cất vừa đủ 1000ml.

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, quy trình lên men xộp sản xuất chế phẩm probiotic-đa enzym từ chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 bao gồm: hoạt hóa chủng giống; nhân giống cấp I trong phòng thí nghiệm; nhân giống cấp II trong thiết bị lên men; lên men trên giá thể xộp với cơ chất đã được làm ẩm với dịch khoáng PSM-K₂HPO₄; và sấy khô và nghiền nhỏ để thu sản phẩm cuối cùng. Quy trình sản xuất theo giải pháp hữu ích có thể được tóm lược như được thể hiện vắn tắt trên Fig.1.

Theo giải pháp hữu ích, chủng giống được sử dụng ở đây là chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 (chủng SP1901). Đây là chủng vi khuẩn được đánh giá là chủng vi sinh vật an toàn, không gây bệnh và được sử dụng rất phổ biến trong các chế phẩm probiotic. Chủng SP1901 là chủng vi khuẩn được nhóm tác giả giải pháp hữu ích lần đầu tiên phân lập được trong hệ sinh thái tự nhiên ở Việt Nam từ mẫu đất ở rừng Quốc gia Hoàng Liên. Đây là vi khuẩn hiếu khí có hình que, kích thước tế bào (3,2 - 3,9) x (0,9 - 1,0)µm, đứng riêng rẽ hoặc xếp đôi, có khả năng sinh nội bào tử hình trụ. Trên môi trường thạch NA, khuẩn lạc có dạng tròn, màu trắng sữa với bề mặt khô, lồi và sần sùi, mép có dạng hình răng cưa. Khi phân tích trình tự gen 16S ARNr (1500bp), so sánh độ tương đồng với trình tự của các loài có quan hệ họ hàng gần bằng cách xây dựng cây phả hệ phát sinh chủng loài (thể hiện trên Fig.2a) cho thấy chủng SP1901 nằm cùng vị trí với *Bacillus amyloliquefaciens*_NR041455 (giá trị lặp lại 77%) với mức độ tương đồng ở trình tự 16S ADN là 99,9%. Phân tích trình tự 6 gen (gyrA subunit A-gyrA, ARN polymeraza subunit B-rpoB, phosphoibosylaminoimidazolecarbox-amit formyltransferaza-purH, ADN polymeraza III subunit alpha-polC, 60kDa heat-shock protein groEL-groEL và 16S ARNr), kết quả được thể hiện trên Fig.2b, cho thấy chủng SP1901 được xếp vào nhóm dưới loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (tương đồng 99% trình tự 6 gen), phân tách rõ ràng với nhóm dưới loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (tương đồng 97% trình tự 6 gen) và những loài khác trong nhóm *B. subtilis*.

Như vậy, dựa vào đặc điểm hình thái và so sánh mức độ tương đồng 16S ADN và trình tự 6 gen kết nối (*gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL* và 16S ARNr) của chủng

ngiên cứu và các loài có quan hệ họ hàng gần, chủng SP1901 được định danh là *B. amyloliquefacienss* subsp. *plantarum* và được lưu giữ tại Bảo tàng giống Vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội với mã hiệu VTCC-B-1089. Trình tự 6 đoạn gen được đăng tải trên ngân hàng gen NCBI với mã hiệu là JX403999 (gyraza subunit A-*gyrA*), JX404000 (ARN polymeraza subunit B-*rpoB*), JX404001 (phosphoribosylaminoimidazolecarbox-amit formyltransferaza- *purH*), JX404002 (ADN polymeraza III subunit alpha- *polC*), JX404003 (60 kDa heat-shock protein groEL -*groEL*) và JX404004 (16S ARNr).

Ngoài ra, hoạt tính enzym và khả năng sinh chất kháng sinh của chủng *B. amyloliquefacienss* subsp. *plantarum* SP1901 được khảo sát theo các phương pháp đã biết đến trong lĩnh vực tương ứng, xác định được chủng này có khả năng sinh các loại enzym ngoại bào như amylaza, xenluloza, lipaza, phytazae, proteaza, xylanaza, esteraza (C 4), esteraza lipaza (C 8), lipaza (C 14), axit phosphataza, naphthol-AS-BI-phosphohydrolaza và α -glucosidaza; sinh các chất kháng sinh kháng lại các loại vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) gây bệnh trên người như *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, hoặc nấm gây bệnh cây là *Fusarium oxysporum*.

Hơn nữa, loài *Bacillus amyloliquefacienss* đã được biết đến với nhiều ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm thương mại như sản xuất enzym công nghiệp và đã được công nhận là vi sinh vật an toàn (GRAS), sản phẩm của nó được liệt kê vào danh mục các chất an toàn được dùng trong thực phẩm do Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan quản lý an toàn thực phẩm châu Âu (EFSA) cho phép sử dụng. Từ đó, với các kết quả thu được như nêu trên cho thấy chủng *B. amyloliquefacienss* subsp. *plantarum* SP 1901 có tiềm năng cao trong sản xuất chế phẩm probiotic-đa enzym.

Để có thể được sử dụng làm giống sản xuất, chủng SP1901 được sử dụng cần phải hoàn toàn thuần khiết về mặt sinh học và có hoạt tính sản sinh enzym cao. Do đó, sau khi hoạt hóa chủng giống từ giống gốc, tiến hành kiểm tra lại độ thuần chủng và hoạt tính sản sinh enzym của chủng giống. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tương ứng hoàn toàn có thể dễ dàng lựa chọn cách thức hoạt hóa và các phương pháp kiểm tra cũng như các môi trường nuôi cấy và xác định hoạt tính phù hợp với chủng giống. Theo giải pháp hữu ích, môi trường được sử dụng để hoạt hóa chủng giống là môi trường NA. Sau khi kiểm tra, giống thuần khiết và có hoạt tính enzym cao được tiến

hành nhân giống và sử dụng để sản xuất tiếp theo. Theo phương án của giải pháp hữu ích, các enzym được sản sinh là phytaza, proteaza và xylanaza, và hoạt độ của dịch nuôi cấy cần đạt: proteaza $\geq 300\text{U/ml}$ và xylanaza $\geq 50\text{U/ml}$; vòng trong phân giải Na-phytat trên môi trường thạch PSM-Na-phytat là 8mm.

Chủng vi khuẩn SP1901 được nhân giống cấp I trong phòng thí nghiệm sử dụng bình tam giác chứa môi trường NB, nuôi lắc ở tốc độ 200 vòng/phút và nhiệt độ 40°C . Trong thời gian nuôi 12 – 16 giờ, cấy ria vào môi trường NA. Sau 24 giờ, thu dịch nuôi cấy làm giống cấp I. Kiểm tra mật độ tế bào có trong dịch nuôi cấy, lô giống đảm bảo chất lượng khi mật độ tế bào đạt $\text{OD}_{600} \geq 2,0$ ($\approx 10^9$ cfu/ml) và quan sát khuẩn lạc vi khuẩn trên đĩa thạch NA để kiểm tra độ thuần khiết.

Quá trình nhân giống cấp II được thực hiện trong thiết bị lên men dung tích 10 lít hoặc lớn hơn, chứa 70% thể tích môi trường. Cấy giống cấp I vào môi trường NB ở điều kiện độ pH là 6, nuôi khuấy liên tục đồng thời sục khí vô trùng liên tục ở nhiệt độ 40°C . Theo giải pháp hữu ích, tỷ lệ giống được sử dụng ở bước này với tỷ lệ 5% (tính theo thể tích), được khuấy liên tục ở tốc độ 200 vòng/phút. Ngoài ra, lưu lượng khí tốt nhất là 1,0 lít khí/lít dịch lên men/phút. Sau 12 – 16 giờ nuôi cấy, cấy ria vào môi trường NA. Sau 24 giờ, thu dịch nuôi cấy làm giống cấp II. Kiểm tra mật độ tế bào có trong dịch nuôi cấy, lô giống đảm bảo chất lượng khi mật độ tế bào đạt $\text{OD}_{600} \geq 2,0$ ($\approx 10^9$ cfu/ml) và quan sát khuẩn lạc vi khuẩn trên đĩa thạch NA để kiểm tra độ thuần khiết.

Cơ chất được sử dụng làm giá thể lên men xộp theo giải pháp hữu ích là ngô mảnh được làm ẩm 40% bằng dung dịch khoáng PSM- K_2HPO_4 và khử trùng trong thiết bị khử trùng. Cấy 15% (v/w) giống cấp II vào giá thể đã khử trùng, trộn đều, nuôi ủ ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 96 giờ để thu sản phẩm lên men.

Sản phẩm sau lên men xộp được sấy khô đến khi độ ẩm đạt 8%, và nghiền thành bột mịn. Tiến hành xác định hoạt độ các enzym và số lượng tế bào bằng các phương pháp đã biết. Xác định sản phẩm đạt tiêu chuẩn khi hoạt độ phytaza đạt $3,2\text{U/g}$, proteaza 850U/g , xylanaza đạt 600U/g , và số lượng tế bào đạt 10^9 cfu/g. Cuối cùng đóng gói bột thành phẩm thành sản phẩm với các lượng phù hợp.

Theo giải pháp hữu ích, chế phẩm probiotic-đa enzym được sản xuất theo quy trình nêu trên có chứa sinh khối chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp.

plantarum SP1901 và ít nhất ba enzym phytaza, proteaza và xylaza được sản sinh từ chủng này.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Xác định điều kiện nhân giống cấp II tối ưu

Để xác định điều kiện nhân giống cấp II tối ưu, thực hiện nhân giống chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 sử dụng thiết bị sản xuất thử dung tích 10 lít. Khảo sát lần lượt trong các thiết bị lên men 10 lít chứa 7 lít môi trường NB, ở điều kiện độ pH là 6, nhiệt độ 40°C, với tỷ lệ giống cấy lần lượt là 2, 5, 7, 10 và 15%, ở các tốc độ khuấy trộn bao khác nhau bao gồm 50, 100, 150, 200 và 250 vòng/phút, và với các lượng khí cung cấp lần lượt là 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 và 1,4 lít khí/lít dịch/phút. Thực hiện kiểm tra mật độ tế bào tại các thời điểm 12, 24, 36, 48, 60 và 72 giờ sau khi nuôi cấy trên máy đo quang phổ ở bước sóng 600nm. Các kết quả được tóm tắt bằng các đồ thị được thể hiện trên các Fig.3a-d. Như được thể hiện trên Fig.3a, mật độ tế bào tăng nhanh trong thời gian 24 giờ, đạt cao nhất tại thời điểm 24 giờ ($OD_{600} = 2,1$) và sau đó bắt đầu giảm dần. Tương tự, như được thể hiện trên Fig.3b, Fig.3c, và Fig.3d, mật độ tế bào thay đổi theo tốc độ khuấy, lưu lượng khí đưa vào và tỷ lệ giống cấy, đạt giá trị cao nhất ở tốc độ khuấy 200 vòng/phút, lưu lượng khí 1,0 lít khí/lít dịch/phút và tỷ lệ cấy giống 5%.

Với các kết quả như trên, xác định được điều kiện nhân giống tối ưu của chủng SP1901 trong thiết bị lên men 10 lít cho mật độ tế bào lớn nhất là trên môi trường NB, nhiệt độ 40°C, độ pH là 6, tốc độ khuấy 200 vòng/phút, lượng khí đưa vào 1,0 lít khí/lít dịch/phút, tỷ lệ giống cấy 5% và thời gian nuôi là 24 giờ.

Ví dụ 2: Xác định điều kiện lên men xốp tối ưu

Dịch khoáng

Chuẩn bị các túi giá thể lên men chứa 2kg cơ chất là ngô mảnh, bổ sung thêm 1% glucoza và casein và được làm ẩm lần lượt bằng các dịch khoáng MA1, MA5, PSM và PSM- K_2HPO_4 . Cấy chủng SP1901 với tỷ lệ giống 10% (v/w) vào các túi giá thể đã chuẩn bị, trộn đều và nuôi ở nhiệt độ 40°C. Sau 96 giờ lên men, tiến hành xác định hoạt độ phytaza, proteaza và xylanaza và mật độ tế bào của mẫu lên men. Kết quả được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch khoáng lên khả năng sinh tổng hợp các enzym của chủng SP1901

Dung dịch khoáng	Hoạt tính enzym (U/g)			Số lượng tế bào (cfu/g)
	Phytaza	Proteaza	Xylanaza	
MA1	0	742	523	5×10^8
MA5	1,9	812	437	8×10^8
Dịch PSM	2,8	728	415	2×10^8
Dịch PSM-K ₂ HPO ₄	2,6	787	507	4×10^8

Kết quả cho thấy khi sử dụng 4 dung dịch khoáng đều cho kết quả khá tốt cho cả 2 loại proteaza và xylanaza, tuy nhiên không có phytaza đối với khoáng MA1. Khi làm ẩm cơ chất bằng dịch môi trường PSM-K₂HPO₄ cho kết quả tốt cho cả 3 enzym vì trong dịch này có chứa glucoza, Ca²⁺ và Mg²⁺ thích hợp cho proteaza; Mg²⁺ và PO₄³⁺ kích thích cho xylanaza; hơn nữa các ion này đều kích thích cho sinh phytaza. Số lượng tế bào thay đổi không đáng kể trên cả 4 loại khoáng vì dinh dưỡng được đáp ứng đầy đủ cho sinh trưởng. Từ đó xác định được dịch khoáng PSM-K₂HPO₄ là môi trường dinh dưỡng tối ưu để lên men xốp.

Nhiệt độ lên men

Chuẩn bị các túi giá thể lên men chứa 2kg cơ chất là ngô mảnh, bổ sung thêm 1% glucoza và casein và được làm ẩm lần lượt bằng dịch khoáng PSM-K₂HPO₄. Cây chủng SP1901 vào các túi giá thể đã chuẩn bị với tỷ lệ giống 10% (v/w), trộn đều và nuôi ở các nhiệt độ thay đổi từ 30-45°C. Sau 96 giờ nuôi cấy, tiến hành xác định hoạt độ phytaza, proteaza và xylanaza và mật độ tế bào của mẫu lên men. Kết quả được thể hiện trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy xốp lên khả năng sinh tổng hợp các enzym của chủng SP1901

Nhiệt độ nuôi (°C)	Hoạt tính enzym (U/g)			Số lượng tế bào (cfu/g)
	Phytaza	Proteaza	Xylanaza	
30	3,0	796	527	4×10^9
35	3,2	825	548	2×10^9
40	2,7	759	498	5×10^8
45	2,0	587	402	2×10^8

Kết quả cho thấy, hoạt độ các enzym tăng dần khi tăng nhiệt độ nuôi và bắt đầu giảm khi nhiệt độ nuôi tăng lên 40°C; mật độ tế bào cũng thay đổi theo nhiệt độ nuôi và đạt lớn nhất ở nhiệt độ nuôi 40°C. Như vậy, với mục đích tối ưu khả năng sinh tổng hợp enzym, nhiệt độ lên men xộp thích hợp là 35°C.

Độ ẩm

Từ các kết quả nêu trên, khảo sát ảnh hưởng của độ ẩm lên hiệu quả lên men xộp trên cơ chất ngô mảnh với dịch khoáng PSM-K₂HPO₄. Cấy chủng SP1901 với tỷ lệ giống 10% (v/w) vào các túi giá thể được chuẩn bị như trên với độ ẩm lần lượt thay đổi từ 30 đến 70%. Trộn đều và nuôi ở nhiệt độ 35°C. Sau 96 giờ nuôi cấy, tiến hành xác định hoạt độ phytaza, proteaza và xylanaza và mật độ tế bào của mẫu sau khi lên men. Kết quả được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Ảnh hưởng của độ ẩm lên khả năng sinh tổng hợp các enzym của chủng SP1901

Độ ẩm (%)	Hoạt tính enzym (U/g)			Số lượng tế bào (cfu/g)
	Phytaza	Proteaza	Xylanaza	
30	2,8	824	567	5x10 ⁸
40	3,5	909	620	2x10 ⁹
50	3,1	855	586	2x10 ⁹
60	2,8	783	541	6x10 ⁸
70	2,1	692	452	1x10 ⁸

Kết quả cho thấy hoạt tính enzym tăng khi độ ẩm tăng từ 30-40% và giảm dần khi độ ẩm tiếp tục tăng. Hoạt tính của các enzym cao nhất ở độ ẩm 40% trong khi số lượng tế bào đạt cao nhất ở các độ ẩm 30 - 50%. Tuy nhiên, với mục đích tối ưu khả năng sinh tổng hợp enzym, có thể xác định độ ẩm thích hợp nhất cho quá trình lên men xộp là 40°C.

Tỷ lệ giống

Khảo sát tương tự đối với sự ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến khả năng sinh tổng hợp enzym của chủng SP1901. Cấy chủng SP1901 vào giá thể lên men xộp được chuẩn bị với các điều kiện tối ưu như đã được xác định như trên với tỷ lệ giống thay đổi từ 5

đến 25%. Trộn đều và nuôi ở nhiệt độ 35°C. Sau 96 giờ nuôi cấy, tiến hành xác định hoạt độ phytaza, proteaza và xylanaza và mật độ tế bào của mẫu sau khi lên men.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống lên khả năng sinh tổng hợp enzym của chủng SP1901

Tỷ lệ giống (%)	Hoạt tính enzym (U/g)			Số lượng tế bào (cfu/g)
	Phytaza	Proteaza	Xylanaza	
5	2,3	684	518	7×10^8
10	3,1	837	579	2×10^9
15	3,4	905	628	2×10^9
20	3,4	912	615	8×10^8
25	3,2	864	576	4×10^8

Như được thể hiện trong bảng 4, hoạt tính các enzym phytaza và proteaza tăng khi tỷ lệ giống tăng từ 5-20% và bắt đầu giảm ở tỷ lệ giống 25%, hoạt tính xylanaza tăng khi tỷ lệ giống tăng từ 5-15% và bắt đầu giảm khi tỷ lệ giống tăng lên 20%, trong khi số lượng tế bào thay đổi và đạt cao nhất ở các tỷ lệ giống 10-15%. Lựa chọn tỷ lệ giống 15% cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thời gian lên men

Khảo sát tương tự đối với sự ảnh hưởng của tỷ lệ giống lên khả năng sinh tổng hợp enzym của chủng SP1901. Cấy chủng SP1901 vào giá thể lên men xốp được chuẩn bị với các điều kiện tối ưu như đã được xác định như trên. Trộn đều và nuôi ở nhiệt độ 35°C. Tiến hành xác định hoạt độ phytaza, proteaza và xylanaza và mật độ tế bào của mẫu lên men tại các thời điểm 24, 48, 72, 96, 120 và 144 giờ sau khi nuôi cấy. Kết quả được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian lên men lên khả năng sinh tổng hợp các enzym của chủng SP1901

Thời gian (giờ)	Hoạt tính enzym (U/g)			Số lượng tế bào (cfu/g)
	Phytaza	Proteaza	Xylanaza	
24	1,2	148	118	6×10^7
48	2,4	496	403	2×10^9
72	3,3	797	542	4×10^9
96	3,5	915	635	1×10^9

120	3,3	908	612	7×10^8
144	3,0	854	587	4×10^8

Kết quả cho thấy, hoạt tính các enzym tăng nhanh sau 48 và 72 giờ, đạt tối đa vào 96 giờ và bắt đầu giảm sau 120 giờ nuôi, trong khi số lượng tế bào thay đổi và đạt cao nhất ở các thời gian 48-96 giờ. Lựa chọn thời gian lên men xối thích hợp là 96 giờ.

Như vậy, điều kiện lên men xối thích hợp cho sản xuất phytaza, proteaza, xylanaza và số lượng tế bào của chủng SP1901 là cơ chất ngô mảnh được làm ẩm 40% bằng dung dịch khoáng PSM-K₂HPO₄; tỷ lệ giống cấy 15%, nhiệt độ 35°C và thời gian nuôi 96 giờ.

Ví dụ 3: Sản xuất chế phẩm probiotic-đa enzym quy mô 50kg/mẻ

Chủng giống *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 được lưu trữ tại Bảo tàng giống Vi sinh vật Việt Nam ở điều kiện lạnh -80°C với mã số chủng là VTCC-B-1089. Hoạt hóa chủng giống bằng cách đưa nhanh vào tủ ấm 37°C trong 40-60 giây và cấy ria trên đĩa NA. Sau khi nuôi cấy 48 giờ ở 40°C, chọn khuẩn lạc riêng rẽ, kiểm tra hình thái tế bào trên kính hiển vi để xác định độ thuần chủng và đồng thời cấy vào các ống nghiệm chứa môi trường NA, nuôi trong thời gian 48 giờ ở 40°C.

Giống từ ống nghiệm được cấy chuyển vào các bình tam giác 100ml chứa 10ml môi trường NB dịch thể có bổ sung casein với lượng 5g/l và môi trường NB dịch thể có bổ sung xylan với lượng 2g/l, nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 40°C trong 48 giờ, ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút và thu lấy dịch trong để xác định hoạt độ enzym proteaza và xylanaza theo các phương pháp của Su và Lee (2001) và Bailey và cộng sự (1992). Hoạt độ của dịch nuôi cấy cần đạt: proteaza ≥ 300 U/ml và xylanaza ≥ 50 U/ml. Tương tự, xác định hoạt độ enzym phytaza bằng cách cấy chuyển giống từ ống nghiệm vào môi trường thạch PSM-Na-phytat, nuôi ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 48 giờ. Quan sát vòng phân giải phytat trong được tạo thành. Hoạt độ phytaza đạt yêu cầu khi đường kính vòng phân giải khoảng 8mm.

Cấy chuyển giống từ ống nghiệm vào các bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường NB, nuôi lắc ở tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 40°C. Sau 12-16 giờ, kiểm tra độ tinh sạch bằng cách cấy ria vào môi trường thạch NA. Sau 24 giờ, kiểm tra mật độ tế bào có trong dịch nuôi cấy trên máy đo quang phổ ở bước sóng 600nm. Lô giống đảm

bảo chất lượng khi mật độ tế bào đạt $OD_{600} \geq 2,0$ ($\approx 10^9$ cfu/ml) và có hình thái khuẩn lạc tương tự với dạng khuẩn lạc ban đầu và không bị nhiễm bất kỳ vi sinh vật nào khác. Thu dịch nuôi làm giống cấp I.

Cấy 350ml giống cấp I vào thiết bị lên men 10 lít chứa 7 lít môi trường NB, nuôi khuấy liên tục 200 vòng/phút đồng thời sục khí vô trùng liên tục ở tốc độ 1,0 lít khí/lít dịch lên men/phút ở nhiệt độ 40°C. Sau 12-16 giờ, kiểm tra độ tinh sạch bằng cách cấy ria vào môi trường thạch NA. Đến 24 giờ kết thúc lên men, lấy 1ml dịch nuôi kiểm tra mật độ tế bào trên máy đo quang phổ ở bước sóng 600nm. Giống đảm bảo chất lượng khi mật độ tế bào đạt $OD_{600} \geq 2,0$ ($\approx 10^9$ cfu/ml) và có hình thái khuẩn lạc tương tự với dạng khuẩn lạc ban đầu và không bị nhiễm bất kỳ vi sinh vật nào khác. Thu dịch nuôi cấy để làm giống cấp II.

Cho 50kg ngô mảnh vào 25 túi nilon (kích thước 35 x 50cm). Mỗi túi bao gồm hỗn hợp 2kg ngô mảnh được làm ẩm bằng 1,6 lít dung dịch môi trường PSM-K₂HPO₄. Thanh trùng trong thiết bị khử trùng 100 lít. Để nguội, cấy 300ml giống cấp II của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 vào các túi cơ chất đã khử trùng, trộn đều. Nuôi ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 96 giờ và thu sản phẩm.

Sản phẩm sau lên men xộp được sấy khô trong thiết bị cô sấy chân không 5kg mẻ/8 giờ hoặc sấy khô 45°C trong 2 ngày đến khi độ ẩm đạt 8%. Sau đó nghiền thành bột và xác định hoạt độ enzym và mật độ tế bào của bột thành phẩm. Xác định được hoạt độ phytaza đạt 3,2 U/g, proteaza đạt 850 U/g, xylanaza đạt 600 U/g, và số lượng tế bào đạt 109 cfu/g. Cuối cùng đóng gói bột thành phẩm thành sản phẩm với các lượng phù hợp.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích hướng tới sản xuất enzym cho chăn nuôi ở quy mô công nghiệp để sản xuất chế phẩm probiotic-đa enzym từ chủng bản địa, an toàn và từ các nguồn nông sản sẵn có trong nước thay thế dần cho hàng nhập ngoại. Theo giải pháp hữu ích, chế phẩm probiotic-đa enzym có thể được sản xuất chỉ từ một chủng vi sinh vật duy nhất là *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 mà vẫn đạt được hoạt độ các enzym phytaza, proteaza và xylanaza cao, đồng thời không cần phải thực hiện bước thu riêng rẽ sinh khối tế bào và các dịch enzym ngoại bào. Kết quả của giải pháp hữu

ích có ý nghĩa quan trọng cho việc khai thác nguồn vi sinh vật bản địa, an toàn phục vụ cho sản xuất các enzym công nghiệp từ các nguồn nông sản sẵn có trong nước.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm probiotic-đa enzym từ chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

hoạt hóa giống từ chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 bảo quản;

nhân giống cấp I bằng cách cấy chủng giống đã được hoạt hóa vào bình nhân giống chứa môi trường dịch dinh dưỡng (NB) trong thời gian 24 giờ ở điều kiện độ pH là 6 và nhiệt độ 40°C trong điều kiện lắc liên tục ở tốc độ 200 vòng/phút và thu dịch nuôi cấy làm giống cấp I;

nhân giống cấp II bằng cách cấy giống cấp I vào thiết bị lên men chứa môi trường NB dịch thể với tỷ lệ giống 5%, nuôi trong thời gian 24 giờ ở điều kiện độ pH là 6 và nhiệt độ 40°C trong điều kiện khuấy liên tục ở tốc độ 200 vòng/phút và sục khí liên tục với tốc độ 1,0 lít khí/lít dịch/phút để thu dịch nuôi cấy làm giống lên men;

phối trộn cơ chất với dịch khoáng PSM-K₂HPO₄ để tạo ra giá thể lên men xốp với độ ẩm 40%, cấy giống lên men vào giá thể lên men đã được chuẩn bị và thực hiện lên men xốp ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 96 giờ để thu sản phẩm lên men; và

sấy khô sản phẩm lên men, nghiền nhỏ thành bột mịn và đóng gói để thu sản phẩm cuối cùng.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó sau khi hoạt hóa chủng giống, còn bao gồm kiểm tra độ thuần chủng và hoạt tính enzym của chủng giống.

3. Quy trình theo điểm 2, trong đó ở bước lên men xốp, tỷ lệ giống được sử dụng là 15%.

4. Quy trình theo các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm được sản xuất theo quy trình này chứa sinh khối chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP1901 và ít nhất ba enzym phytaza, proteaza và xylaza.

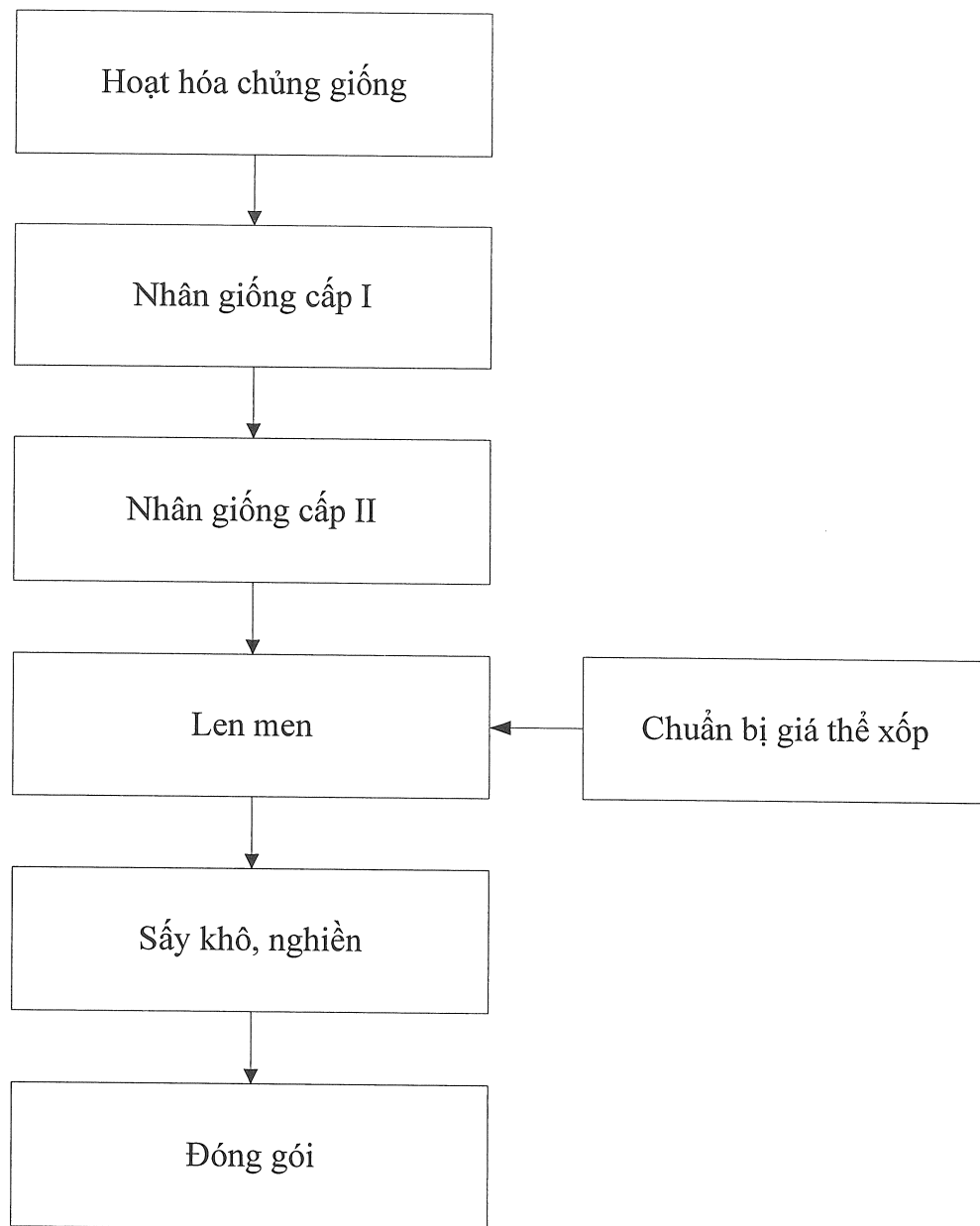


Fig.1

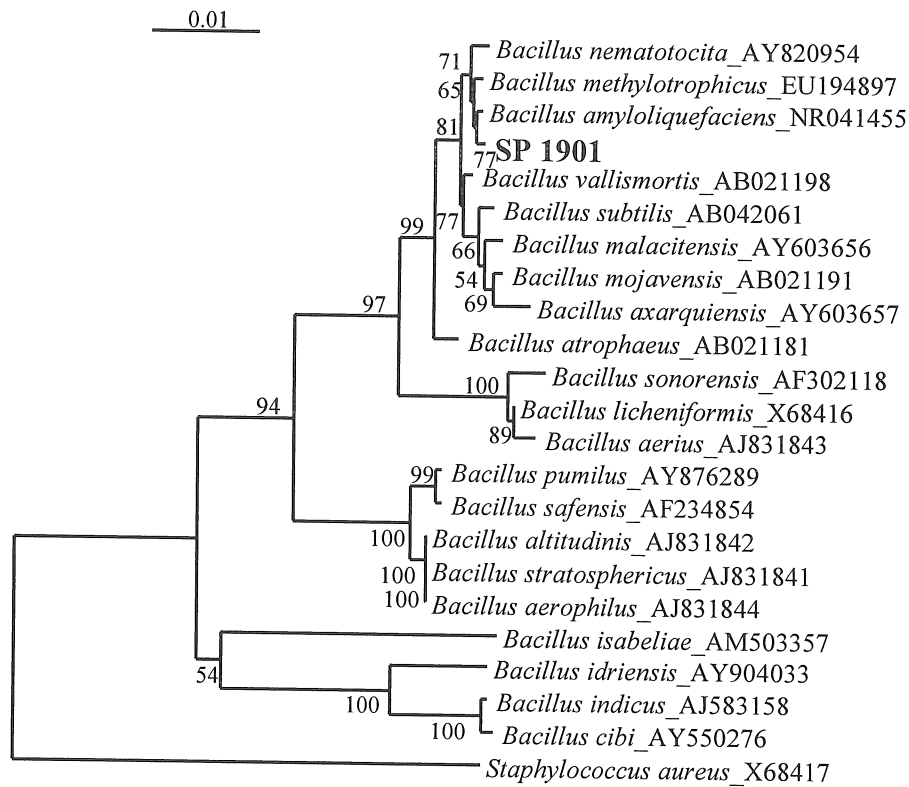


Fig.2a

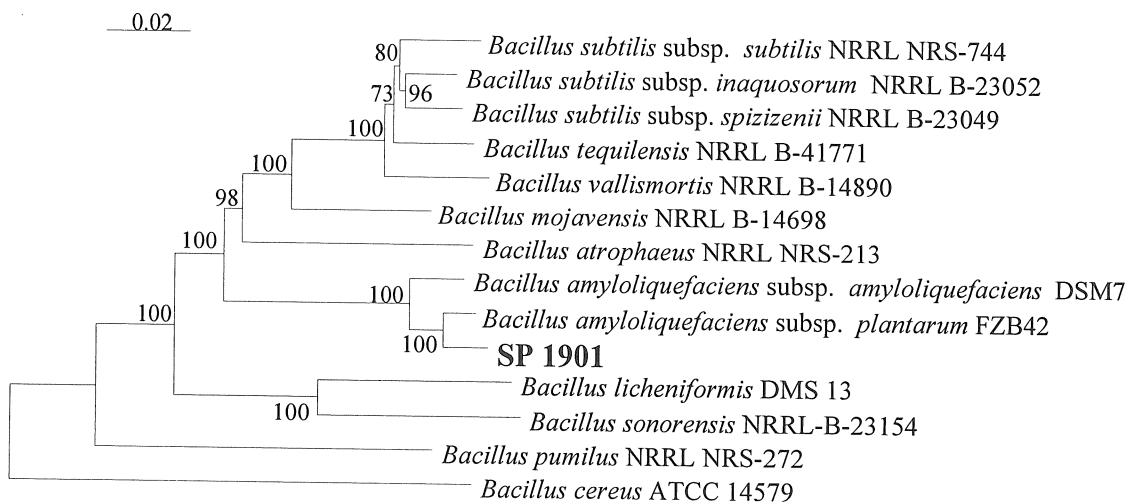


Fig.2b

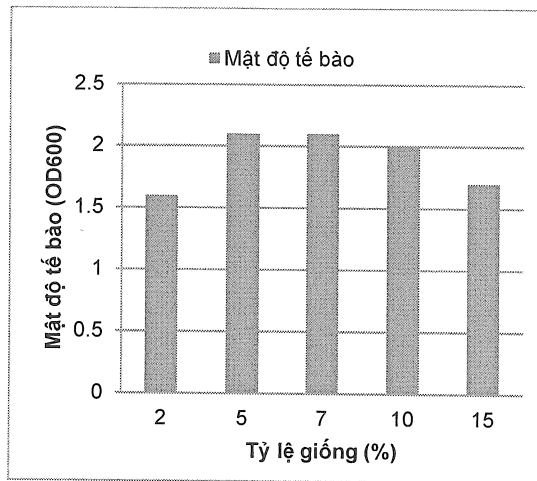


Fig.3a

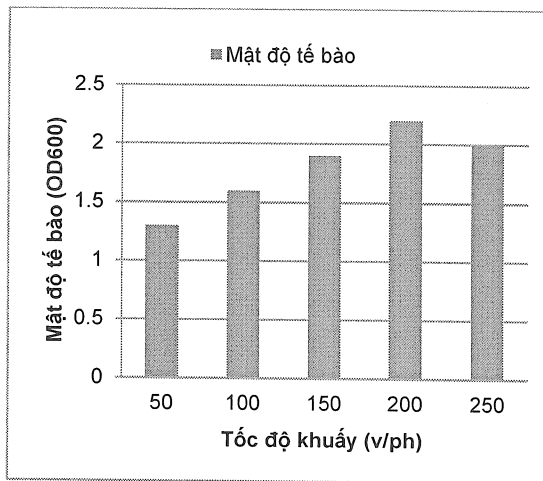


Fig.3b

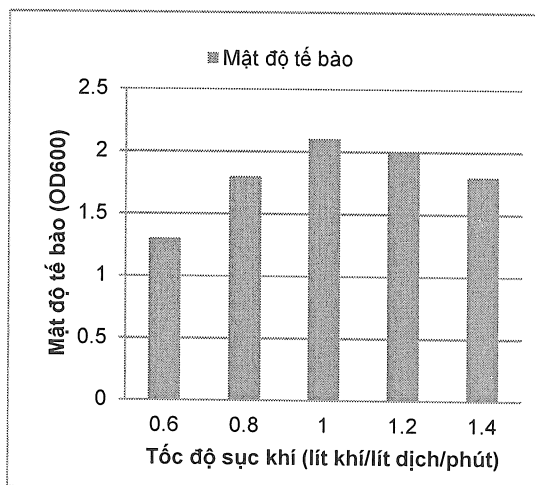


Fig.3c

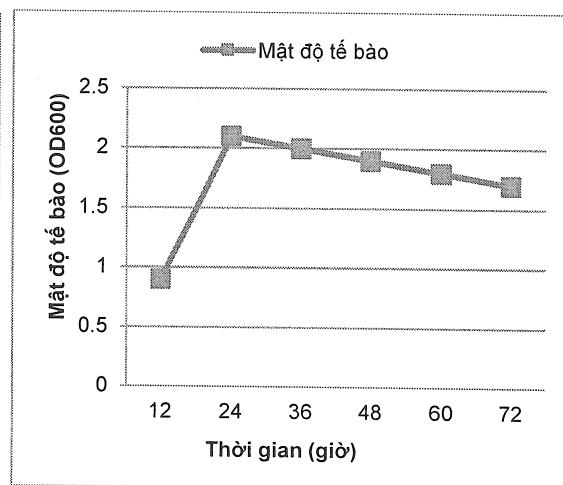


Fig.3d