

SẢN XUẤT CHẾ PHẨM NẤM MEN GIÀU SELEN BẰNG *SACCHAROMYCES PASTORIANUS* NHẪM ỨNG DỤNG TRONG DƯỢC PHẨM, THỰC PHẨM CHỨC NĂNG

VŨ NGUYỄN THÀNH, ĐINH THỊ MỸ HẰNG, ĐỖ THỊ YẾN

Viện Công nghiệp Thực phẩm, Bộ Công thương

NGUYỄN QUANG THƯỜNG

Công ty TNHH MTV dược phẩm Trung ương 2

Selen là một thành phần khoáng chất không thể thiếu trong dinh dưỡng của con người. Thuốc, thực phẩm chứa nấm men giàu selen được khuyến cáo sử dụng nhằm tăng sức đề kháng, chống lại bệnh tật, dùng dự phòng và điều trị các quá trình viêm, bệnh tim mạch, ung thư, chống lão hoá. Các chế phẩm giàu selen bán ở Việt Nam phần lớn có nguồn gốc nhập khẩu hoặc sử dụng nguyên liệu nhập khẩu. Trên thực tế, nhiều nguồn selen nguyên liệu không đảm bảo tiêu chí an toàn do chứa hàm lượng selen tự do cao. Nghiên cứu sản xuất chế phẩm nấm men chứa selen hữu cơ tại Việt Nam đã được thực hiện từ những năm 90 của thế kỷ trước. Dựa vào các kết quả nghiên cứu trước đây ở quy mô phòng thí nghiệm, nhóm nghiên cứu đã thực hiện mô hình tối ưu và thử nghiệm sản xuất ở quy mô pilot 300 lít tạo sản phẩm chứa 1000 ppm selen sử dụng chủng nấm men bia *Saccharomyces pastorianus* CNTP 7192. Chế độ lên men như sau: nồng độ selen trong môi trường nuôi cấy 115 ppm; lượng men giống 8%; nồng độ cơ chất dịch nuôi cấy 13%; thời gian nuôi cấy 17 giờ; số lần bổ sung dịch nuôi cấy 3 lần. Mô hình có thể được áp dụng ở quy mô 1500 lít. Sản phẩm đáp ứng các tiêu chuẩn cho nguyên liệu dược phẩm và thực phẩm chức năng. Chế phẩm nấm men chứa nồng độ selen hữu cơ 1000 ppm của Viện Công nghiệp Thực phẩm đã được nhiều công ty dược phẩm trong nước sử dụng làm nguyên liệu đầu vào cho sản xuất thuốc và thực phẩm chức năng.

Từ khóa: nấm men, selen, dược phẩm, *Saccharomyces pastorianus*, bia.

Đặt vấn đề

Nấm men thuộc chi *Saccharomyces* là nhóm vi sinh vật đã được con người ứng dụng từ thời tiền sử. Hiện nay, đây cũng là nhóm vi sinh vật có giá trị sản xuất lớn và được nghiên cứu kỹ lưỡng nhất. Trước hết phải kể tới *S. cerevisiae* với phổ ứng dụng rộng trong sản xuất rượu từ ngũ cốc, cồn nhiên liệu, rượu vang, bánh mì, bia alle và nhiều lĩnh vực trong công nghệ sinh học. Hai loài khác có ứng dụng đặc thù hơn là *S. uvarum* và *S. bayanus*, chủ

yếu trong sản xuất rượu vang và một số loại bia. Riêng nấm men *S. pastorianus* mới chỉ xuất hiện trong đời sống con người từ thế kỷ XVI, với loại bia lên men lạnh xứ Bavaria (bia lager). Những nghiên cứu về di truyền gần đây cho thấy *S. pastorianus* là sản phẩm lai tạo giữa loài phổ biến nhất là *S. cerevisiae* và *S. eubayanus*, một loài nấm men chịu lạnh của vùng Andes (Argentina) [1]. Bia lager nhanh chóng phổ biến khắp thế giới và hiện là dòng bia thịnh hành nhất hiện nay. Hầu hết các loại bia sản

PRODUCTION OF SELENIUM ENRICHED YEAST USING *SACCHAROMYCES PASTORIANUS* FOR APPLICATION IN PHARMACEUTICAL AND FUNCTIONAL FOOD PRODUCTS

Summary

Selenium is one of the essential trace minerals in human nutrition. Products enriched with organic selenium is recommended for immunostimulation, prophylaxis and treatment of inflammatory and cardiovascular diseases, prevention of cancer, anti-aging. Selenium enriched products available in Vietnam are imported or based on imported ingredients. Several of such selenium sources are of low quality due to the high content of free and toxic inorganic selenium. Attempt of producing selenium yeast in Vietnam has been done since 1990s. In this report, based on data obtained by previous studies at laboratory scale, selenium enriched (1000 ppm) yeast production has been scaled-up and optimized using a 300 liter pilot fermentor utilizing the beer yeast strain *Saccharomyces pastorianus* CNTP 7192. The optimal fermentation parameters are as follows: selenium content in the fermentation medium 115 ppm, yeast inoculation rate 8%, nutrient content in the fermentation medium 13%, fermentation time 17 hours, feeding 3 times. The same production parameters could be scaled-up to the 1500 liter model. The obtained product has met technical requirements as an ingredient for pharmaceutical and functional food production. Selenium enriched (1000 ppm) yeast manufactured by Food Industries Research Institute has been used as an ingredient for the production of drugs and functional foods by a number of pharmaceutical companies in Vietnam.

Keyword: yeast, selenium, pharmaceutical, *Saccharomyces pastorianus*, beer.

xuất tại Việt Nam sử dụng nấm men *S. pastorianus*. Trong nghiên cứu này, *S. pastorianus* được ứng dụng nhằm sản xuất chế phẩm nấm men giàu selen làm nguyên liệu trong dược phẩm và thực phẩm chức năng.

Selen là một thành phần khoáng chất không thể thiếu trong dinh dưỡng của con người. Trong thực phẩm, selen là yếu tố vi lượng và tồn tại chủ yếu ở dạng selenomethionine. Acid amin chứa selen này được hấp thụ dễ dàng và chuyển hóa thành các hợp chất chứa selen khác cần thiết cho cơ thể. Các nước có nền công nghiệp phát triển đã sử dụng nấm men chứa selen để làm thuốc dự phòng và điều trị bệnh tật khá sớm. Pháp có Celium (làm tăng cơ địa chống bệnh tật). Nấm men giàu selen được một số hãng dược phẩm dập thành viên nén, đóng trong các chai khoảng vài trăm viên dưới dạng thực phẩm bổ sung. Phối hợp nấm men chứa selen với các vitamin C, E, β -carotene ở Đức có Protecton; Hàn Quốc có Saylom, Belaf, Cigelton, Youngton... Các thuốc này đều là hỗn hợp trong dầu chứa β -carotene (15 mg), vitamin E (400 IU), vitamin C (500 mg) và nấm men chứa selen (50 μ g). Hiện nay, thuốc chứa nấm men giàu selen được khuyến cáo dùng để tăng sức đề kháng, chống lại bệnh tật, dùng dự phòng và điều trị các quá trình viêm, bệnh tim mạch, ung thư, chống lão hóa [2, 3, 4]. Các chế phẩm này đã được bán ở Việt Nam và ngày càng được nhiều người ưa chuộng.

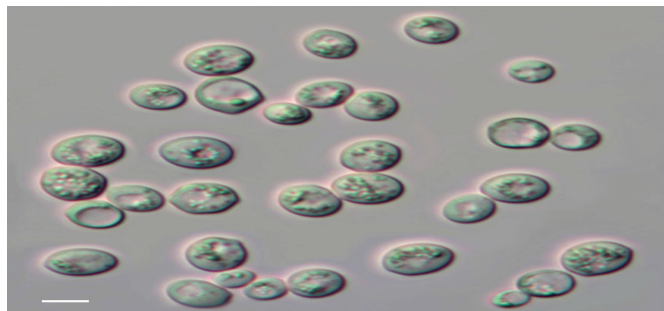
Ở Việt Nam, những nghiên cứu đầu tiên về sản xuất nấm men giàu selen đã được thực hiện vào thập kỷ 90 của thế kỷ trước tại Trường Đại học Dược Hà Nội [5, 6]. Năm 2000-2002, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển khoa học công nghệ dược, Tổng công ty Dược Việt Nam đã thực hiện đề tài "Nghiên cứu sản xuất nấm men giàu selen quy mô phòng thí nghiệm". Các tác giả đã thu được men bia chứa selen hàm lượng từ 400-600 ppm đã được Viện Kiểm nghiệm, Bộ Y tế thẩm định [7]. Năm 2000-2003, nguyên liệu nấm men chứa selen đã được phối hợp với β -carotene, vitamin C, vitamin E để tạo viên nang mềm BECELEN. Nang mềm chứa nấm men giàu selen này đã được thử tác dụng trên các vận động viên điền kinh chạy 3000 m, tại Trường Đại học Thể dục thể thao (Tứ Sơn, Bắc Ninh) [8].

Thừa hưởng những thành tựu đạt được trước đó trong nghiên cứu ở quy mô phòng thí nghiệm, Trung tâm Vi sinh vật công nghiệp và Trường Đại học Dược Hà Nội đã hợp tác nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất nấm men giàu selen hữu cơ ở quy mô pilot. Báo cáo này đề cập tới những kết quả đã đạt được.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Chủng *Saccharomyces pastorianus* CNTP 7192 phục vụ nghiên cứu được lấy từ bộ sưu tập giống vi sinh vật công nghiệp thực phẩm (Viện Công nghiệp Thực phẩm). Đây là chủng đang được sử dụng phổ biến trong sản xuất bia (hình 1). Các hóa chất sử dụng ở quy mô phòng thí nghiệm đều

thuộc nhóm hóa chất tinh khiết phục vụ phân tích. Các hóa chất phục vụ sản xuất ở quy mô pilot thuộc nhóm hóa chất công nghiệp, phù hợp với các yêu cầu cho sản xuất thực phẩm.



Hình 1: nấm men *Saccharomyces pastorianus* CNTP 7192 phục vụ sản xuất chế phẩm nấm men giàu selen đang được bảo tồn lưu giữ tại Trung tâm Vi sinh vật công nghiệp (Viện Công nghiệp Thực phẩm), thanh chèn tương ứng với 5 μm

Nhằm sản xuất nấm men với hàm lượng selen 1000 ppm, mô hình thực nghiệm Taguchi với các bước chủ chốt sau được sử dụng:

- Tìm sự liên quan giữa hàm lượng selen trong nấm men, hiệu suất sinh khối nấm men với nồng độ của selen, nồng độ cơ chất của dịch nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, số lần bổ sung dịch nuôi cấy và tỷ lệ men giống đưa vào.
- Sử dụng phần mềm phân tích để tìm ra các thông số tối ưu.
- Áp dụng các thông số tối ưu tiến hành nuôi cấy men bia chứa selen hàm lượng 1000 ppm trên thiết bị lên men dung tích 300 lít (hình 2).



Hình 2: hệ thống lên men tự động ứng dụng trong sản xuất chế phẩm nấm men giàu selen

Việc thiết kế mô hình thực nghiệm được thực hiện bằng phần mềm Design Expert V6.06, liên quan nhân quả (định tính và định lượng) bằng Form Rules V3.2. Tối ưu hoá các thông số, ước tính giới hạn min/max của các thông số và dự đoán các tình huống xấu được giải quyết bằng phần mềm INForm V3.3.

Định lượng selen được tiến hành theo phương pháp đo quang (theo USP 24). Quy trình tóm tắt như sau: mẫu được đốt trong bình ôxy, hấp thụ bằng HNO_3 30%, sau đó cho phản ứng với 2-3 diamionaphtalene, chiết bằng cyclohexan và đo độ hấp thụ ở bước sóng 380 nm. Chất chuẩn và mẫu trắng được sử dụng làm đối chứng. Ngoài ra, mẫu còn được gửi tới Viện Kiểm nghiệm, Bộ Y tế để xác định hàm lượng selen hữu cơ và selen tự do bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ nguyên tử. Các chỉ tiêu vi sinh vật được xác định tại Viện Công nghiệp Thực phẩm dựa trên Tiêu chuẩn Việt Nam. Một số chỉ tiêu khác được xác định theo Dược điển Việt Nam (hàm ẩm - ĐVNN III, phụ lục 5.16; tro sulphate - ĐVNN III, phụ lục 7.7; Nitrogen amin - ĐVNN III, phụ lục 7.7).

Kết quả và bàn luận

Trong nghiên cứu trước đây trên thiết bị BioFlo5000 sử dụng chủng *Saccharomyces cerevisiae* trong môi trường selen 10 $\mu\text{g/ml}$, men giống 10%, khí 200 ml/phút, ở 30°C, chúng tôi đã thu được hàm lượng selen từ 400 đến 600 ppm [7]. Tương tự như vậy, với các nồng độ selen ban đầu khác nhau, chúng tôi đã thiết lập được mối quan hệ giữa 2 thông số. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: liên quan giữa nồng độ selen trong môi trường với hàm lượng selen trong tế bào nấm men (điều kiện: T° khoảng 28-30°C, men giống 5%, thời gian nuôi cấy 14 giờ)

TT	Selen/môi trường ($\mu\text{g/ml}$)	Selen/nấm men (ppm)
1	70	800
2	100	1100
3	150	1150
4	160	1210
5	170	1340
6	180	1470

Mô hình thực nghiệm tìm các điều kiện tối ưu

Mô hình thực nghiệm Taguchi trong sản xuất chế phẩm nấm men giàu selen hữu cơ được thực hiện với năm biến số độc lập đó là: x_1 - nồng độ selen trong môi trường, $\mu\text{g/ml}$; x_2 - lượng men giống, %; x_3 - nồng độ đường của dịch nuôi cấy, %; x_4 - thời gian nuôi cấy, giờ; x_5 - số

lần bổ sung dịch nuôi cấy, lần. Hai biến số phụ thuộc của mô hình là: y_1 - hàm lượng selen trong nấm men, ppm; y_2 - sinh khối nấm men, g. Nội dung sơ đồ được thực hiện trong bảng 2.

Bảng 2: các giá trị gán trong mô hình thực nghiệm Taguchi

Mã gán	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5
1	40	4,5	9	8	1
2	70	5,0	11	12	2
3	100	5,5	13	16	3
4	130	6,0	15	24	4

Dựa trên mô hình thực nghiệm Taguchi, 16 thí nghiệm thực tế được tiến hành với các thông số x_1, x_2, x_3, x_4, x_5 định trước và thu được 16 cặp kết quả về hàm lượng selen (y_1) và sinh khối (y_2) (bảng 3).

Bảng 3: dữ liệu thực nghiệm thu được từ mô hình Taguchi

Thực nghiệm	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	y_1	y_2
1	70	5,5	15	8	2	876,9	16,5
2	40	6,0	15	24	4	717,8	16,6
3	70	4,5	11	16	4	1057,6	10,0
4	130	5,0	13	8	4	1445,4	12,7
5	100	4,5	13	24	2	784,4	10,4
6	70	5,0	9	24	3	1197,0	12,1
7	40	5,0	11	12	2	421,2	12,4
8	130	4,5	15	12	3	1731,6	10,8
9	70	6,0	13	12	1	780,5	18,5
10	100	5,0	15	16	1	730,0	13,6
11	100	5,5	9	12	4	1407,6	15,6
12	40	5,5	13	16	3	591,5	16,1
13	130	6,0	9	16	2	1216,1	17,3
14	70	4,5	9	8	1	333,0	10,7
15	130	5,5	11	24	1	1491,5	14,4
16	100	6,0	11	8	3	1224,7	17,5

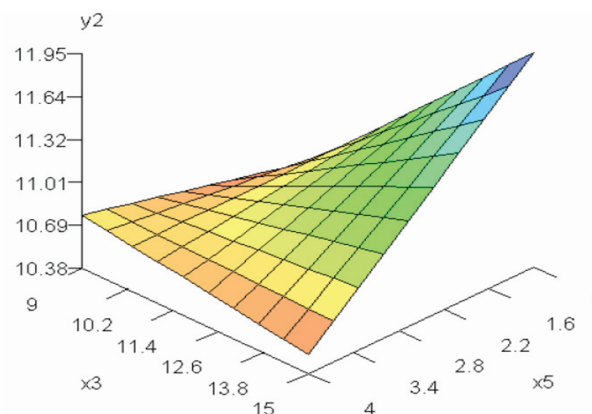
Phân tích kết quả mô hình thực nghiệm

- Hàm lượng selen trong tế bào nấm men chỉ bị ảnh hưởng bởi nồng độ selen (X_1) và số lần bổ sung dịch nuôi cấy. Hàm lượng selen trong nấm men cao khi nồng độ

selen và tần số bổ sung dịch nuôi cấy cao và ngược lại.

- Lượng sinh khối men thu được bị ảnh hưởng bởi: lượng men giống đưa vào (x_2), nồng độ cơ chất (x_3), thời gian nuôi cấy (x_4) và số lần bổ sung dịch nuôi cấy (x_5), không bị ảnh hưởng bởi nồng độ selen (x_1). Khối lượng nấm men sinh được cao khi: lượng men giống đưa vào nhiều và thời gian nuôi cấy ngắn, nồng độ cơ chất của dịch nuôi cấy cao và tần số bổ sung dịch nuôi cấy thấp.

Điều đáng chú ý là ảnh hưởng trái ngược của x_5 : nếu bổ sung dịch nuôi cấy nhiều lần thì hàm lượng selen trong tế bào nấm men y_1 sẽ cao, trong khi khối lượng nấm men y_2 thu được có thể thấp. Nói chung, các điều kiện (x_1), (x_2), (x_4) ảnh hưởng đến y_1, y_2 đều theo những quy luật đơn giản tuyến tính. Riêng (x_3) và (x_5) ảnh hưởng đến khối lượng nấm men sinh được theo những quy luật phức tạp hơn (không tuyến tính). Ảnh hưởng của x_3 và x_5 tới khối lượng men sinh được minh họa bởi hình 3.



Hình 3: ảnh hưởng của nồng độ cơ chất của dịch nuôi cấy và tần số bổ sung dịch lên khối lượng nấm men thu được

Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy men bia chứa selen 1000 ppm

Dữ liệu bảng 3 được dùng cho đầu vào tối ưu hoá các điều kiện nuôi cấy sử dụng: thuật toán RPROP; nhóm thử 10 và 14; 1 lớp ẩn; 2 nút; hàm truyền lớp ẩn - Assymmetric Sigmoid; hàm truyền lớp ra - tuyến tính; yếu tố moment 0,8; vận tốc truyền 0,7; số vòng lặp tối đa 1000; sai số bình phương trung bình 0,0001; mẫu ngẫu nhiên 10000. Các yếu tố ràng buộc bao gồm: thời gian nuôi cấy (giờ) $x_4 < 24$; tần số bổ sung dịch nuôi cấy $x_5 < 4$. Mục tiêu đạt được: hàm lượng selen trong tế bào nấm men sinh được càng cao càng tốt. Kết quả các điều kiện tối ưu hoá dùng cho việc nuôi cấy men bia chứa selen 1000 ppm tìm được là:

- Nồng độ selen ở môi trường nuôi cấy: 115 µg/ml
- Lượng men giống: 8%
- Nồng độ cơ chất dịch nuôi cấy: 13%
- Thời gian nuôi cấy: 17 giờ
- Số lần bổ sung dịch nuôi cấy: 3 lần

Kết quả tính toán về điều kiện tối ưu được kiểm chứng bằng sản xuất ở quy mô pilot. Chúng tôi đã tiến hành 5 mẻ thí nghiệm trên thiết bị lên men 300 lít. Hàm lượng selen trung bình đạt được là 1067 ± 73 ppm. Với cách nuôi cấy ở điều kiện tối ưu đã nêu, dự đoán theo phần mềm INForm thì hàm lượng selen trong tế bào nấm men là 925 ppm. Như vậy, kết quả thực nghiệm là phù hợp với dự đoán.

Hiện nay, Trung tâm Vi sinh vật công nghiệp (Viện Công nghiệp Thực phẩm) đã bắt đầu sản xuất chế phẩm nấm men giàu selen ở quy mô 1500 lít cho một số công ty dược trong nước (Công ty Cổ phần dược phẩm Nam Hà, Công ty Cổ phần dược Trung ương Mediplantex, Công ty Cổ phần dược phẩm Gia Nguyễn, Công ty Cổ phần Bioscope Việt Nam). Sản phẩm nấm men selen của Viện sản xuất đáp ứng các tiêu chí sau:

- Tính chất: bột khô tơi, màu vàng nâu nhạt đồng nhất
- Định tính: chế phẩm có phản ứng định tính của selen
- Hàm ẩm: < 8%
- Tro sulfat: < 10%
- Nitrogen amin: < 5%
- Kim loại nặng: arsen: < 1 ppm; chì: < 10 ppm; cadimi: < 1 ppm; thủy ngân: < 1 ppm
- Muối selen hoà tan: < 20 ppm
- Hàm lượng selen trong chế phẩm từ 900-1200 ppm
- Độ nhiễm khuẩn: đạt theo mức 4, phụ lục 10.7 ĐVN

III



Chế phẩm nấm men chứa hàm lượng selen 1000 ppm sản xuất từ nấm men *S. pastorianus*.

Kết luận

Dựa trên các nghiên cứu trước đây ở quy mô phòng thí nghiệm, nhóm nghiên cứu đã xác định được các thông số cho sản xuất chế phẩm nấm men giàu selen ở quy mô pilot. Sản phẩm đáp ứng các yêu cầu nguyên liệu cho dược phẩm và thực phẩm chức năng. Hiện tại, Trung tâm Vi sinh vật công nghiệp đã bắt đầu cung cấp sản phẩm cho thị trường, góp phần giảm nhập khẩu nguyên liệu, phục vụ hiệu quả ngành sản xuất dược phẩm và thực phẩm chức năng trong nước.

Tài liệu tham khảo

- [1] Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., Sampaio J.P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:14539-14544.
- [2] Clark L.C., Combs G.F.Jr., Turnbull B.W., Slate E.H., Chalker D.K., Chow J., Davis L.S., Glover R.A., Graham G.F., Gross E.G., Krongrad A., Leshner J.L.Jr., Park H.K., Sanders B.B.Jr., Smith C.L., Taylor J.R. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. *Nutritional Prevention of Cancer Study Group. JAMA* 25:1957-1963.
- [3] Clausen J., Nielsen S.A. (1988). Comparison of whole blood selenium values and erythrocyte glutathione peroxidase activities of normal individuals on supplementation with selenate, selenite, L-selenomethionine, and high selenium yeast. *Biol Trace Elem Res* 15:125-138.
- [4] Kumpulainen J., Salmenperä L., Siimes M.A., Koivistoinen P., Perheentupa J. (1985). Selenium status of exclusively breast-fed infants as influenced by maternal organic or inorganic selenium supplementation. *Am J Clin Nutr* 42:829-835.
- [5] Nguyễn Quang Thường (1996), Những chế phẩm từ nấm men giàu selen. Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học cấp bộ. Trường Đại học Dược Hà Nội.
- [6] Thuong N.Q., Bao Đ.T., Muraviova D.A., Ogusob I.U. (1995). Etude d'une levure riche en sélénium. *Revue pharmaceutique* 1:21-26.
- [7] Nguyễn Quang Thường (2002), Nghiên cứu sản xuất nấm men giàu selen (quy mô phòng thí nghiệm). Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển khoa học công nghệ dược.
- [8] Nguyễn Văn Nguyên (2002), Nghiên cứu chế tạo các chế phẩm từ dược liệu trong nước có khả năng chống oxy hoá, chống lão hoá bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân độc hại từ môi trường. Báo cáo tổng kết đề tài độc lập cấp nhà nước, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường.