

TỐI ƯU QUÁ TRÌNH NUÔI CẤY THU SINH KHỐI *LACTOBACILLUS CASEI* TRÊN MÔI TRƯỜNG MRS CẢI BIÊN

Đào Thị Mỹ Linh – Nguyễn Hải Nam – Nguyễn Thị Quỳnh Mai

Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm TP.HCM

TÓM TẮT

Lactobacillus casei là lợi khuẩn được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, vì vậy nhu cầu sử dụng sinh khối của vi khuẩn này là rất lớn. Trong nghiên cứu này, quá trình nuôi cấy thu sinh khối *Lactobacillus casei* trên môi trường MRS cải biên được tối ưu bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm. Thành phần glucose trong môi trường MRS được thay thế bằng dịch chiết dừa như một nguồn cung cấp cacbon cùng với một số vitamin và khoáng chất cần thiết cho vi khuẩn để giảm giá thành sản phẩm. 11 yếu tố ảnh hưởng đến lượng sinh khối được sàng lọc bằng phương pháp Plackett – Burman và chọn ra 3 yếu tố có ảnh hưởng nhiều nhất. Bằng phương pháp leo dốc Box – Wilson, điều kiện tối ưu được xác định bao gồm: dịch chiết dừa 55% (v/v), cao nấm men 47,5 (g/L) và tỷ lệ giống 9,5% (v/v). Kết quả cho thấy mật độ tế bào *Lactobacillus casei* sau 18h nuôi cấy trong môi trường cải biên tối ưu là 9,280 Log (CFU/mL), so với trong môi trường MRS broth là 9,178 Log (CFU/ml).

Từ khóa: *Lactobacillus casei*, tối ưu hóa, sinh khối, probiotics, MRS, Plackett – Burman.

1. MỞ ĐẦU

Probiotics là những vi sinh vật sống có ảnh hưởng tốt đến vật chủ bằng cách giúp cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột (Michail S, 2005). Phần lớn các chế phẩm probiotics là các vi khuẩn lactic như *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum*... Probiotics giúp hoàn thiện hệ tiêu hóa, kháng các vi khuẩn gây bệnh thông qua các chất kháng khuẩn (acid, bacteriocins, H₂O₂...), tăng cường hệ thống miễn dịch, giảm cholesterol trong máu, khắc phục hiện tượng không dung nạp lactose, giảm tiêu chảy....

Do những tính năng hữu ích trên nên sinh khối probiotics đã và đang được quan tâm nghiên cứu để ứng dụng rộng rãi trong việc sản xuất các loại sữa lên men có bổ

sung lợi khuẩn, thức ăn chăn nuôi có bổ sung probiotics nhằm hạn chế việc sử dụng các chất kháng sinh, giảm tác động đến con người. Việc tận dụng các nguyên liệu rẻ tiền thay thế một phần hay hoàn toàn cho môi trường MRS để nuôi cấy thu nhận sinh khối probiotics sẽ góp phần giảm bớt giá thành sản phẩm. Một số nghiên cứu cho thấy rằng dịch cà rốt được sử dụng làm cơ chất khả thi cho sản xuất sinh khối bốn chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* (Yoon et al., 2005); bột chà là được sử dụng thay thế glucose trong môi trường MRS như là nguồn cacbon rẻ tiền để nuôi cấy thu sinh khối *Lactobacillus casei* ATCC 334 nhằm giảm giá thành sản phẩm (A.Shahravy et al.,

2012); môi trường dịch chiết dứa được sử dụng để nuôi cấy *Lactobacillus delbrueckii* cố định trong hạt canxi alginate để sản xuất acid lactic (Dr Roslina Rashid, 2008).

Một quá trình nuôi cấy thường bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau như các điều kiện nuôi cấy và thành phần dinh dưỡng của môi trường. Việc tối ưu các yếu tố sẽ giúp tăng năng suất sản phẩm (Lim, C.H *et al.*, 2007). Cách đơn giản để thực hiện việc tối ưu là tối ưu từng yếu tố trong khi giữ nguyên các yếu tố khác, tuy nhiên cách thực hiện này tốn thời gian và không xác định được sự tác động đồng thời giữa các yếu tố, do đó phương pháp quy hoạch thực nghiệm được áp dụng cho việc tối ưu.

Trong nghiên cứu này, quá trình nuôi cấy *Lactobacillus casei* được tối ưu trên môi trường MRS, với glucose được thay thế bằng dịch chiết dứa như một nguồn cung cấp cacbon đồng thời bổ sung các vitamin, muối khoáng cần thiết cho vi sinh vật phát triển để thu nhận sinh khối và loại bỏ đi các thành phần cũng như yếu tố không ảnh hưởng nhiều đến lượng sinh khối để tiết kiệm hóa chất, thời gian.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật: *Lactobacillus casei* (bộ sưu tập giống probiotic của Bộ môn Công nghệ sinh học, trường ĐH Công nghiệp Thực phẩm TP HCM) được phân lập từ hạt Kefir và định danh bằng phương pháp rDNA 16s, giữ giống trên môi trường MRS-agar ở 4°C và trong glycerol 10% ở -18°C.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy: Dứa gọt vỏ, ép lấy dịch, lọc, đun sôi 5 phút, để lắng và tiếp tục lọc để lấy dịch trong. Sử dụng thành phần cơ bản của MRS-agar, bổ sung dịch dứa và thiết kế các môi trường khác nhau để nuôi cấy *Lactobacillus casei* thu sinh khối ở 37°C.

Xác định mật độ tế bào: Tiến hành dựng đường chuẩn thể hiện mối quan hệ tuyến tính giữa mật độ tế bào và giá trị D_{600nm} (Michail S, 2005). Vi sinh vật được tăng sinh trong môi trường MRS broth, sau đó được pha loãng ở các nồng độ và thời gian khác nhau, tiến hành đo OD_{600nm} (A) bằng máy SP-3000 nano và trải đĩa trên môi trường MRS agar ủ ở 37°C, 48 giờ sau đó tiến hành đếm khuẩn lạc (CFU). Sử dụng phần mềm Excel của Microsoft để xử lý số liệu, kết quả đường chuẩn:

$$\text{Log}\left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}}\right) = 1.9791 + 8.2389$$

Ở các thí nghiệm xác định mật độ tế bào, tiến hành đo OD sau khi kết thúc thời gian nuôi cấy, dựa vào đường chuẩn để suy ra mật độ tế bào.

Xác định hàm lượng đường: Hàm lượng đường trong dịch chiết từ quả dứa và cùi dứa được định lượng dựa trên phương pháp DNS (dinitrosalicylic acid). Phương pháp DNS này dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử dinitrosalicylic acid. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ đường khử trong một phạm vi nhất định. So màu tiến hành ở bước sóng 540nm (Lê Thanh Mai, 2009).

Sàng lọc các yếu tố có ảnh hưởng quan trọng đến sự tạo sinh khối bằng thiết kế Plackett – Burman: Thí nghiệm được thiết kế theo quy hoạch Plackett – Burman 11 yếu tố với 12 thí nghiệm (bảng 2) để sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng quan trọng nhất đến hàm mục tiêu là log (CFU/mL). Mức thấp (-1) và cao (+1) của 11 yếu tố được thể hiện trong bảng 1. Sử dụng phần mềm Design Expert 7.0.0[®] của Stat – Ease Inc. USA để phân tích số liệu.

Tối ưu nồng độ các yếu tố được chọn bằng phương pháp leo dốc (phương pháp

Box – Wilson): Sau khi sàng lọc, ba yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối nhiều nhất được chọn, thiết lập ở 3 mức (-1, 0, +1) (bảng 3) trong 12 thí nghiệm (bảng 4).

Hàm mục tiêu được chọn là Log(CFU/mL). Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 1:

$$\tilde{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

Trong đó: b_1, b_2, b_3 là các hệ số bậc 1; b_{12}, b_{13}, b_{23} là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; x_1, x_2, x_3 là các biến độc lập. Tính toán các hệ số hồi quy theo phương

pháp bình phương cực tiểu, kiểm định hệ số hồi quy của mô hình và sự tương thích của mô hình tối ưu 2^3 theo chuẩn Student và chuẩn Fisher (Bùi Minh Trí, 2005; Nguyễn Cảnh, 2010). Sau khi xây dựng được mô hình phù hợp, tiến hành thí nghiệm leo dốc nhằm mục đích tìm ra điểm tối ưu của các yếu tố khảo sát. Chọn bước chuyển động một yếu tố và tính toán các bước chuyển động các yếu tố khác (bảng 5) nhằm bố trí thí nghiệm (bảng 6) và xác định giá trị tối ưu của các yếu tố nuôi cấy.

Bảng 1: Các biến trong ma trận Plackett – Burman và ảnh hưởng của chúng đến hàm mục tiêu

Ký hiệu	Yếu tố	Mức		Mức độ ảnh hưởng		
		Thấp (-)	Cao (+)	Ảnh hưởng	Prob>F	% Tác động
X_1	Dịch chiết dừa (%)	60	100	-0,170 ^a	<0,0001	55,36
X_2	Cao nấm men (g/L)	20	50	0,110 ^a	<0,0001	22,64
X_3	Triamoniunhydrogen citrate (g/L)	0	2	0,010 ^b		0,18
X_4	K_2HPO_4 (g/L)	0	2	0,022 ^a	0,0412	0,94
X_5	Sodium acetate (g/L)	0	5	-0,006 ^b		0,073
X_6	Tween 80 (ml)	0	1	0,005 ^b		0,039
X_7	$MgSO_4$ (g/L)	0	0,2	0,003 ^b		0,015
X_8	$MnSO_4$ (g/L)	0	0,2	0,010 ^b		0,20
X_9	pH	5	6	0,022 ^a	0,0435	0,91
X_{10}	Thời gian (giờ)	18	24	0,013 ^b		0,33
X_{11}	Tỷ lệ giống (%)	5	10	0,100 ^a	<0,0001	19,31

^a Có ý nghĩa ở độ tin cậy $\alpha = 0,05$; ^b Không có ý nghĩa ở độ tin cậy $\alpha = 0,05$. (A.Shahravy et al., 2012; Carla Araya-Cloutier et al., 2012; Đào Minh Châu, 2012; J.C. De Man et al.1960)

Bảng 2:Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett – Burman

N ^o	Các biến											Log (CFU/mL)	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	Thực nghiệm	Mô hình
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	8,958	8,950
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	8,989	8,980
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	9,231	9,230
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	8,963	8,950
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	9,041	9,060
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	8,940	8,940
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	9,153	9,150
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	9,035	9,020
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	9,136	9,140
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	8,849	8,850
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	9,223	9,210
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,983	9,000

(+): Mức cao, (-): Mức thấp dựa theo bảng 1 của các yếu tố: X_1 : Dịch chiết dừa, X_2 : Cao nấm men, X_3 : Triamoniunhydrogen citrate, X_4 : K_2HPO_4 , X_5 : Sodium acetate, X_6 : Tween 80, X_7 : $MgSO_4$, X_8 : $MnSO_4$, X_9 : pH, X_{10} : Thời gian, X_{11} : Tỷ lệ giống (Nguyễn Hữu Lộc, 2011).

Bảng 3: Nồng độ của các yếu tố khảo sát

Các mức	Các yếu tố ảnh hưởng		
	x_1 (g/L)	x_2 (%)	x_3 (g/L)
Mức thấp (-)	20	60	5
Mức cơ sở (0)	35	80	7,5
Mức cao (+)	50	100	10
Khoảng biến thiên (λ)	30	40	5

x_1 : cao nấm men; x_2 : dịch chiết dừa, x_3 : tỷ lệ giống

Bảng 4: Kế hoạch thực nghiệm quy hoạch nhân tố toàn phần 2^3

Thí nghiệm	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$	y_i
1	+	+	+	+	+	+	+	9,069
2	-	+	+	-	-	+	-	8,967
3	+	-	+	-	+	-	-	9,244
4	-	-	+	+	-	-	+	9,152
5	+	+	-	+	-	-	-	8,982
6	-	+	-	-	+	-	+	8,868
7	+	-	-	-	-	+	+	9,164
8	-	-	-	+	+	+	-	9,011
9	0	0	0	0	0	0	0	9,086
10	0	0	0	0	0	0	0	9,076
11	0	0	0	0	0	0	0	9,084

(+): Mức cao, (-): Mức thấp dựa theo bảng 3 của các yếu tố: x_1 : Cao nấm men, x_2 : Dịch chiết dừa, x_3 : Tỷ lệ giống. y_i : Hàm mục tiêu khảo sát log (CFU/mL).

Bảng 5: Các điều kiện cần thiết để tiến hành thí nghiệm leo dốc

Các chỉ tiêu	x_1 (g/L)	x_2 (%)	x_3 (%)
Mức cơ sở	35	80	7,5
Khoảng biến thiên (Δ_i)	30	40	5
Hệ số b_i	0,058	-0,086	0,051
$ b_j \cdot \Delta_j $	1,74	3,44	0,255
Bước chuyển động (δ_j)	2,53	-5,00	0,37
Làm tròn bước chuyển động (δ_j)	2,5	-5,0	0,4

x_1 (g/L): cao nấm men, x_2 (%): dịch chiết dừa, x_3 (%): tỷ lệ giống.

Bảng 6: Thí nghiệm theo hướng leo dốc

Thí nghiệm	Các yếu tố ảnh hưởng			Hàm mục tiêu
	x_1 (g/L)	x_2 (%)	x_3 (%)	Y
1 (TN tại tâm)	35	80	7,5	9.084 ± 0,011 ^a
2	37,5	75	7,9	9.100 ± 0,006 ^{ab}
3	40	70	8,3	9.120 ± 0,011 ^b
4	42,5	65	8,7	9.154 ± 0,022 ^c
5	45	60	9,1	9.229 ± 0,009 ^d
6	47,5	55	9,5	9.277 ± 0,016 ^e
7	50	50	9,9	9.237 ± 0,008 ^d
8	52,5	45	10,3	9.223 ± 0,008 ^d

x_1 (g/L): cao nấm men, x_2 (%): dịch chiết dừa, x_3 (%): tỷ lệ giống.

Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n=2$). ^{abcde} là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p<0,05$).

Kiểm chứng kết quả tối ưu với thể tích 50ml: Thực hiện thí nghiệm kiểm chứng kết quả ở môi trường tối ưu thu được, so sánh với môi trường cơ sở và môi trường MRS dựa trên hàm mục tiêu là log (CFU/mL) của chủng *Lactobacillus casei*.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc các yếu tố có ảnh hưởng quan trọng đến khả năng tạo sinh khối bằng thiết kế Plackett – Burman

Ma trận Plackett – Burman thu được hàm mục tiêu từ 8,850 – 9,230 Log (CFU/mL) (bảng 1). Giá trị ảnh hưởng của từng yếu tố lên lượng sinh khối của *Lactobacillus casei* được tính toán bằng phần mềm Design expert[®] 7.0.0 (bảng 2). Giá trị hàm mục tiêu theo thực nghiệm và tiên đoán theo mô hình được trình bày trong bảng 2. Sau khi phân tích ANOVA, phương trình hồi quy được dùng như là một mô hình dự đoán lượng sinh khối thu được. Mô hình:

$$Y = 9,04 - 0,085X_1 + 0,054X_2 + 0,011X_4 + 0,011X_9 + 0,050X_{11}$$

Trong đó Y là hàm mục tiêu (log (CFU/mL)), X_1 , X_2 , X_4 , X_9 , X_{11} lần lượt là dịch chiết dừa (%), cao nấm men (g/L), K_2HPO_4 (g/L), pH và tỷ lệ giống (%). Hệ số R^2 tính được là 0,9916, điều này thể hiện rằng có 99,16% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu suy ra từ mô hình. Giá trị $R^2 > 0,75$ thể hiện mô hình tương thích với thực nghiệm. Giá trị R^2 tiên đoán là 0,9664 phù hợp với R^2 hiệu chỉnh là 0,9846 (độ lệch 0,0182 < 0,2). Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 36,195 > 4 chỉ ra rằng tín hiệu đã đầy đủ.

Để xác định mức ảnh hưởng của các yếu tố và chọn ra những yếu tố có ảnh hưởng nhất đến hàm mục tiêu Log(CFU/mL), các mức ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố khảo sát ở bảng 1 đã được đưa ra. Yếu tố nào có giá trị ảnh hưởng và % tác động lớn sẽ ảnh hưởng tới lượng sinh khối. Ở độ tin cậy $\alpha = 0,05$ có 5 yếu tố có ý nghĩa, bao gồm: dịch chiết dừa, cao nấm men, K_2HPO_4 , pH và tỷ lệ giống. Trong đó 3 yếu tố có ảnh hưởng nhiều nhất đến hàm mục tiêu là: dịch chiết dừa (mức ảnh hưởng: -0,170, % tác động: 55,36%), cao nấm men (mức ảnh hưởng: 0,110, % tác động: 22,64%), tỷ lệ giống (mức ảnh hưởng: 0,100, % tác động: 19,31%). Ba yếu tố này có độ tin cậy nhỏ hơn 0,05 cho thấy rằng có sự khác biệt đáng kể giữa mức thấp và mức cao của yếu tố khảo sát với mức độ tin cậy 95%. Ngoài 3 yếu tố trên thì K_2HPO_4 và pH cũng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%, tuy nhiên tác động của chúng đến hàm mục tiêu rất ít (0,94% với K_2HPO_4 và 0,91% với pH). Các yếu tố còn lại bao gồm: Triamoniumhydrogen citrate, Sodium acetate, Tween 80, $MgSO_4$, $MnSO_4$ và thời gian thì không có ý nghĩa ở độ tin cậy 0,05 có nghĩa là các yếu tố này với mức cao (+) và mức thấp (-) của chúng khi tiến hành nuôi cấy vi sinh vật thì không có sự khác biệt đáng kể đến hàm mục tiêu ở mức độ tin cậy 95%.

Chọn 3 yếu tố: dịch chiết dừa, cao nấm men, tỷ lệ giống để tối ưu. K_2HPO_4 và pH có ảnh hưởng dương lên hàm mục tiêu, do đó sẽ bổ sung cố định ở mức cao (+) 2 g/L đối với K_2HPO_4 và điều chỉnh pH=6 trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật ở các thí nghiệm sau. Các yếu tố Triamoniumhydrogen citrate, Sodium acetate, Tween 80, $MgSO_4$, $MnSO_4$ và thời gian do không có sự khác biệt ở độ tin cậy 0,05 nên

sẽ được điều chỉnh cố định ở mức thấp (-) để tiết kiệm hóa chất, thời gian.

Tối ưu nồng độ các yếu tố được chọn bằng phương pháp leo dốc (phương pháp Box – Wilson)

Ba yếu tố được lựa chọn là cao nấm men, dịch chiết dừa, tỷ lệ giống được thiết lập ở 3 mức khảo sát với 12 thí nghiệm

Bảng 7: Giá trị của các hệ số b trong mô hình hồi quy

Hệ số	b_0	b_1	b_2	b_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_{123}
Kết quả	9,057	0,058	-0,086	0,051	-0,004	-0,009	-0,004	0,006

Bảng 8: Giá trị các chuẩn Student thực nghiệm

Hệ số	t_{b0}	t_{b1}	t_{b2}	t_{b3}	t_{b12}	t_{b13}	t_{b23}	t_{b123}
Kết quả	4841,17	31,00	45,97	27,26	2,13	4,81	2,13	3,20

Tra bảng phân bố vị chuẩn Student (t_α) (Nguyễn Cảnh, 2010).

$t(\alpha, f)$; với $\alpha = 0,05$ và $f = 2 \rightarrow t_{0,05;2} = 4,3$

Trong đó: α là mức ý nghĩa và f là bậc tự do.

So sánh chuẩn Student thực nghiệm và chuẩn Student tra bảng, đối chiếu với các giá trị Student đã tính, ta thấy rằng: $\checkmark t_{b0}, t_{b1}, t_{b2}, t_{b3}, t_{b13} > t_\alpha(f)$ nên hệ số $b_0, b_1, b_2, b_3, b_{13}$ có ý nghĩa; $\checkmark t_{b12}, t_{b23}, t_{b123} < t_\alpha(f)$ nên hệ số b_{12}, b_{23}, b_{123} không có ý nghĩa, loại các hệ số này ra khỏi mô hình hồi quy. Mô hình hồi quy có dạng:

$$\hat{Y} = 9,057 + 0,058x_1 - 0,086x_2 + 0,051x_3 - 0,009x_1x_3$$

Để đánh giá tính phù hợp của mô hình, cần kiểm định sự tương thích của mô hình theo tiêu chuẩn Fisher (F):

$$\hat{F} = \frac{S_{du}^2}{S_{ts}^2} \quad \text{Suy ra: } \hat{F} = \frac{0,000187}{0,000028} = 6,779$$

Chọn mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$, $f_1 = 3$, $f_2 = 2$, tra bảng phân bố Fisher (A. Shahravy et al., 2012) được kết quả: $F_{(0,05; 3; 2)} = 19,13$.

So sánh $\hat{F}$ với $F_{(0,05; 3; 2)}$ ta thấy $\hat{F} < F_{(0,05; 3; 2)}$

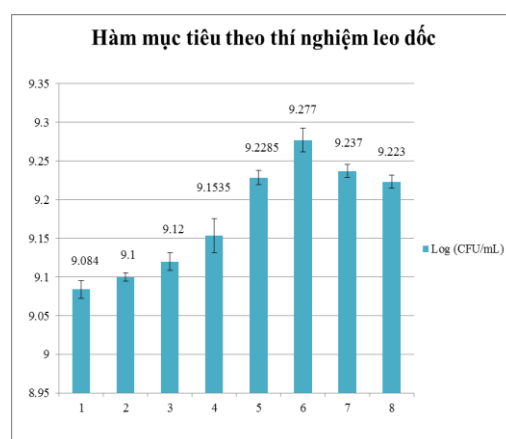
nhằm xây dựng mô hình tối ưu bậc 1 (bảng 3, 4).

Từ kết quả thu được ở bảng 4, tiến hành tính toán các hệ số hồi quy (bảng 7), kiểm định ý nghĩa của các hệ số hồi quy theo chuẩn Student (bảng 8) để xây dựng mô hình tối ưu và kiểm định sự phù hợp của mô hình theo chuẩn Fisher.

Vậy mô hình hồi quy phù hợp theo chuẩn Fisher.

Kết quả thí nghiệm theo hướng leo dốc

Từ bảng 6 và hình 1 có thể nhận thấy giá trị log (CFU/mL) tại thí nghiệm 6 gồm: x_1 (cao nấm men): 47,5 g/L, x_2 (dịch chiết dừa): 55% và x_3 (tỷ lệ giống): 9,5% đạt giá trị cao nhất với log (CFU/mL) = 9,277. Đồng thời kết quả phân tích phương sai One – Way ANOVA bằng phần mềm STATGRAPHICS Centurion XV.I cho thấy sự khác biệt của giá trị log (CFU/mL) tại 3 điểm trên so với các điểm còn lại.



Hình 1: Biểu đồ biểu diễn hàm mục tiêu theo thí nghiệm leo dốc

Kết quả thu được trong thí nghiệm này khá tương thích với nghiên cứu của Lim, C.H. *et al.*(2007) nghiên cứu sản xuất sinh khối chủng *Lactobacillus salivarius* I 24 bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) Tác giả đã xác định được điều kiện tối ưu của các yếu tố cho sự phát triển của *L. salivarius* I 24 là glucose: 33,24 g/L, cao nấm men: 43,1 g/L.

Căn cứ vào kết quả quy hoạch thực nghiệm cho thấy rằng hướng leo dốc ở thí nghiệm 6 (bảng 6) cho kết quả tốt nhất với:

Cao nấm men: 47,5 g/L, dịch chiết dứa: 55% và tỷ lệ giống: 9,5% .

Kiểm chứng kết quả tối ưu với thể tích 50 ml

Thí nghiệm kiểm chứng với thành phần ba môi trường tối ưu, cơ sở, MRS như bảng 9. Kết quả từ bảng 9 cho thấy hàm Log mật độ tế bào của môi trường tối ưu là Log (CFU/mL) = 9,280, cao hơn so với môi trường cơ sở có Log (CFU/mL) = 9,092 và môi trường MRS với Log (CFU/mL) = 9,178.

Bảng 9: Các thông số và kết quả của ba môi trường nuôi cấy

Yếu tố	Giá trị của các yếu tố thành phần môi trường		
	Tối ưu	Cơ sở	MRS
Dịch chiết dứa (%)	55	80	-
Glucose (g/L)	-	-	20
Cao nấm men (g/L)	47,5	35	5
Peptone (g/L)	-	-	10
Cao thịt bò (g/L)	-	-	10
Triamoniunhydrogen citrate (g/L)	-	-	5
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2	2	2
Sodium acetate (g/L)	-	-	5
Tween 80 (mL/L)	-	-	1
MgSO ₄ (g/L)	-	-	0,2
MnSO ₄ (g/L)	-	-	0,05
pH	6,0	6,0	6,0
Thời gian (giờ)	18	18	18
Tỷ lệ giống (%)	9,5	7,5	9,5
Log (CFU/ml)	9,280 ± 0,011^a	9,092 ± 0,006^c	9,178 ± 0,009^b

“-”: Các yếu tố không được bổ sung vào quá trình nuôi cấy.

Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n=2).

^{abc} là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê (p<0,05).

Hiện nay để có 1 lít môi trường tối ưu cần phải có 3 quả dứa (12000 VNĐ/3 quả); 47,5 gam cao nấm men (650000 VNĐ/500 gam theo bảng báo giá của công ty Hóa Nam cho chế phẩm cao nấm men của hãng HIMEDIA®), 2 gam K₂HPO₄ (70000 VNĐ/500 gam theo bảng báo giá của công ty Hóa Nam của hãng Xi Long.) Vậy chi phí cho 1 lít môi trường tối ưu là 74030

VNĐ. Đối với môi trường MRS broth của hãng HIMEDIA® cần 55,15 gam cho 1 lít môi trường, theo bảng báo giá của công ty Hóa Nam 1150000 VNĐ/500 gam MRS broth, chi phí cho 1 lít môi trường là khoảng 127000 VNĐ. Vậy chi phí cho 1 lít môi trường tối ưu rẻ hơn 53000 VNĐ so với môi trường MRS broth của hãng HIMEDIA®

Bảng 10. Tính toán giá thành cho 1 lít môi trường tối ưu và môi trường MRS

Thành phần	Môi trường	Tối ưu		MRS	
		Số lượng	Giá thành (VNĐ)	Số lượng	Giá thành (VNĐ)
Dứa (quả)		3	12000	0	0
Cao nấm men (HIMEDIA®) (gam)		47,5	61750	0	0
K ₂ HPO ₄ (Xi Long) (gam)		2	280	0	0
MRS Broth(HIMEDIA®) (gam)		0	0	55,15	127000
Tổng cộng thành tiền (VNĐ)			74030		127000

Dứa: 4000 VNĐ/quả, cao nấm men (HIMEDIA®): 650000 VNĐ/500 gam, K₂HPO₄ (Xi Long): 70000 VNĐ/500 gam, MRS Broth(HIMEDIA®): 1150000 VNĐ/500 gam.

Tuy nhiên mục đích đề tài này muốn hướng đến là tận dụng nguồn dịch chiết dứa từ phế phẩm cùi dứa của các công ty sản xuất dứa khoanh đóng hộp, khi đó thì giá thành cho 1 lít môi trường tối ưu sẽ tiết kiệm được hơn nữa. Chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng đường trong dịch chiết từ quả dứa và từ cùi dứa bằng phương pháp DNS, kết quả cho thấy hàm lượng đường trong dịch chiết từ quả dứa là 70 g/L cao hơn so với dịch chiết từ cùi dứa với 50 g/L, để phù hợp với kết quả tối ưu yêu cầu 55% dịch chiết từ quả dứa tương ứng với 38,5 g/L đường thì khi sử dụng dịch chiết từ cùi dứa hàm lượng dịch chiết bổ sung vào môi trường là 77%.

Kết quả kiểm chứng của môi trường tối ưu là Log (CFU/mL) = 9,280 tương đương với kết quả thí nghiệm leo dốc là Log (CFU/mL) = 9,277 và kết quả của môi trường tối ưu cao hơn so với môi trường cơ sở và môi trường MRS. Giá thành của 1 lít môi trường tối ưu rẻ hơn 53000 VNĐ so với môi trường MRS broth của HIMEDIA®.

Qua kết quả thu nhận được chúng tôi nhận thấy rằng phương pháp Plackett – Burman và phương pháp leo dốc Box – Wilson là những phương pháp có ứng dụng tốt trong việc sàng lọc và tối ưu hóa giá trị của các yếu tố khảo sát làm cho hàm mục

tiêu đạt cực đại. Thực hiện các phương pháp này giúp loại bỏ được các yếu tố ít ảnh hưởng và chọn được các yếu tố ảnh hưởng chính, từ đó tiết kiệm được hóa chất và thời gian, đồng thời khảo sát được sự tác động qua lại giữa các yếu tố, thu được kết quả tốt hơn các phương pháp tối ưu từng nhân tố.

Trong 3 nhân tố ảnh hưởng chính thì cao nấm men đóng vai trò quan trọng, tuy nhiên giá thành của loại này khá cao so với các nguồn cung cấp Nitrogen khác, điều này sẽ ảnh hưởng đến giá thành của chế phẩm khi tiến hành mở rộng ở quy mô công nghiệp. Do đó cần tiến hành nghiên cứu và khảo sát thêm các nguồn Nitrogen thay thế để hạ giá thành sản phẩm.

Do nhu cầu ứng dụng lớn nên Probiotics được sử dụng tạo nhiều loại chế phẩm vì vậy cần tiến hành mở rộng khảo sát trên nhiều chủng lợi khuẩn khác nhau.

4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp quy hoạch Plackett – Burman từ 11 yếu tố khảo sát sàng lọc được 3 yếu tố có ảnh hưởng nhiều nhất đến sinh khối của *Lactobacillus casei* là dịch chiết dứa, cao nấm men và tỷ lệ giống.

Xây dựng được mô hình tối ưu hóa bậc 1 tương thích với thực nghiệm. Bằng phương pháp leo dốc (phương pháp Box – Wilson) đã xác định được điểm tối ưu của các yếu tố là

cao nấm men 47,5 (g/L), dịch chiết dứa 55% (v/v) và tỷ lệ giống 9,5% (v/v).

Kết quả kiểm chứng ở thể tích 50 ml cho thấy mật độ tế bào thu được từ môi

trường tối ưu cao hơn môi trường cơ sở và môi trường MRS, giá thành của môi trường tối ưu rẻ hơn MRS broth của HIMEDIA.

OPTIMIZATION OF BIOMASS PRODUCTION BY *LACTOBACILLUS CASEI* USING THE MODIFIED- MRS MEDIUM

Dao Thi My Linh – Nguyen Hai Nam – Nguyen Thi Quynh Mai

Ho Chi Minh City University of Food Industry

ABSTRACT

Lactobacillus casei is applied in many fields, so the demand for its biomass is huge. This study was conducted to optimize culture conditions for economic production of *Lactobacillus casei* biomass on modified MRS medium. Glucose is replaced with pineapple extract, as a low-cost main carbon source with vitamins and minerals to provide nutrients. 11 factors on bacterial growth was investigated using the Plackett – Burman experimental design, and pineapple extract, yeast extract, inoculation rate were found to be the most significant parameters. The optimum conditions including pineapple extract concentration, 55%(v/v); yeast extract concentration 47,5 (g/L); and an inoculation rate of 9,5% (v/v) were determined by Box – Wilson method. The maximum log value of the viable cells *Lactobacillus casei* in the optimized alternative medium was 9,280 Log (CFU/mL) at 18 h of incubation which was comparable to that obtained in the complex and expensive MRS medium 9,178 Log (CFU/mL).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.Shahravy, F. Tabandeh, B. Bambai, H.R. Zamanizadeh and M. Mizani (2012), *Optimization of probiotic Lactobacillus casei ATCC 334 production using date powder as carbon source*, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran Faculty of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
- [2] Carla Araya-Cloutier, Carolina Rojas-Garbanzo, and Carmela Velázquez-Carrillo, (2012), *Effect of initial sugar concentration on the production of l (+) lactic acid by simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of an agro-industrial waste product of pineapple (ananas comosus) using lactobacillus casei subspecies rhamnosus*, Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), Universidad de Costa Rica (UCR), Postal address 11501-2060 San José, Costa Rica.
- [3] Nguyễn Cảnh (2010), *Quy hoạch thực nghiệm*, NXB Đại Học Quốc gia TP.HCM
- [4] Đào Thị Minh Châu (2012), *Khảo sát ảnh hưởng của phương pháp vi gói bằng Natri alginate lên số lượng và hoạt tính probiotic của Lactobacillus casei trong quá trình tạo bột sữa chua*, luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Bách Khoa TP. HCM.
- [5] J.C. De Man et al, “*A medium for cultivation of Lactobacilli*,” *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 23, no. 1, pp 130-135, Apr. 1960.

- [6] Nguyễn Hữu Lộc (2011), *Quy hoạch và phân tích thực nghiệm*, NXB Đại học Quốc gia TP.HCM.
- [7] Lim, C.H., Rahim, R.A., Ho, Y.W. and Arbakariya, B.A, *Optimization of Growth medium for Efficient Cultivation of Lactobacillus salivarius I 24 using Response Surface Method* , *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 3(2) 2007, pp. 41-47.
- [8] Lê Thanh Mai (2009), *Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men*, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- [9] Michail S (2005), *The Mechanism of Action of Probiotics*, Wright State University School of Medicine, The Children's Medical Center, Dayton, Ohio
- [10] Trần Linh Thước (2011), *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*, NXB Giáo dục Việt Nam.
- [11] PGS. TS. Bùi Minh Trí (2005), *Xác suất thống kê và quy hoạch thực nghiệm*, NXB Khoa học và Kỹ thuật.