

Điều kiện nuôi thích hợp cho sinh trưởng của vi khuẩn probiotic *Lactobacillus acidophilus* VTCC 12257 ở quy mô phòng thí nghiệm và thiết bị lên men 30 l

Đào Thị Lương*, Hà Thị Hằng, Dương Văn Hợp

Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 7/1/2020; ngày chuyển phản biện 10/1/2020; ngày nhận phản biện 13/2/2020; ngày chấp nhận đăng 9/3/2020

Tóm tắt:

Đặc tính probiotic trong điều kiện *in vitro* của chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) VTCC 12257 phân lập từ tôm lên men đã được đánh giá dựa vào các đặc điểm sinh học và khả năng chống chịu trong môi trường ruột mô phỏng. Trong nghiên cứu này, chủng VTCC 12257 được nghiên cứu về động học sinh trưởng cho sản xuất sinh khối cao ở quy mô phòng thí nghiệm và trong thiết bị lên men 30 l. Nuôi ở quy mô phòng thí nghiệm, sinh khối cao nhất thu được trên môi trường SPY, nhiệt độ 37°C, pH 6,5, tỷ lệ giống cấy 3%, nguồn cacbon là glucose, nguồn nitơ là hỗn hợp của pepton và cao nấm men, thời gian nuôi 32 giờ, khối lượng tế bào đạt 0,59 g/l. Nuôi trong thiết bị lên men 30 l, sinh khối đạt cao nhất ở tốc độ khuấy 50 v/ph, thời gian lên men 16-24 giờ, đạt 0,72 g/l dưới điều kiện pH được kiểm soát và 0,64 g/l khi pH không kiểm soát. Đây được coi là bước khởi đầu để sản xuất ở quy mô công nghiệp cho vi khuẩn probiotic này.

Từ khóa: *L. acidophilus* VTCC 12257, lợi khuẩn, quy mô phòng thí nghiệm và 30 l probiotic, sinh khối.

Chỉ số phân loại: 2.8

Đặt vấn đề

Ngày nay, vai trò của các sản phẩm tự nhiên trong việc thúc đẩy sức khỏe và bảo vệ con người chống lại sự gia tăng của bệnh tật ngày càng nhận được sự quan tâm của cộng đồng. Trong đó, các sản phẩm sử dụng vi sinh vật sống (probiotic) như các thực phẩm dinh dưỡng ngày càng gia tăng trên thế giới [1]. Probiotic là các vi sinh vật sống mà khi được dùng đủ lượng sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ [2]. Các vi sinh vật probiotic thuộc các nhóm khác nhau được sử dụng dưới dạng các chủng đơn lẻ hoặc kết hợp. Tuy nhiên, vi khuẩn thuộc nhóm *Lactobacillus* và *Bifidobacteria* là các nhóm điển hình được sử dụng trong nhiều sản phẩm probiotic cho người và động vật. Hầu hết các sản phẩm probiotic thương mại bao gồm các chủng *Lactobacillus* khác nhau như *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* và *Lactococcus lactis*. Các nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả của hoạt tính probiotic và lợi ích sức khỏe khi sử dụng *Lactobacillus* với số lượng khoảng 10^7 - 10^9 CFU/ngày [3]. Điều này dựa trên thực tế là một số lượng lớn vi sinh vật sẽ bị ngừng hoạt động trong quá trình đi qua đường tiêu hóa (GIT) có axit cao và bị ảnh hưởng bởi muối mật. Để sản phẩm probiotic hữu ích, cần có một số lượng lớn tế bào cho mỗi liều. Do vậy, các nghiên cứu về động học sinh

trưởng và nuôi cấy các chủng probiotic tạo sinh khối tế bào cao đang được các ngành công nghiệp lên men sản xuất probiotic và giống cấy ngày càng quan tâm [4].

Trong số các loài *Lactobacillus*, các chủng thuộc loài *L. acidophilus* được sử dụng làm probiotic nhiều nhất. *L. acidophilus* là nhóm vi khuẩn không gây bệnh và có mặt trong hệ vi sinh vật đường ruột, được sử dụng phổ biến làm giống khởi động lên men sữa với các hoạt tính có lợi nhờ khả năng cân bằng vi sinh vật đường tiêu hóa. Chúng cũng được sử dụng trong các thực phẩm lên men và làm probiotic trong các thuốc và thực phẩm bổ sung [5]. Các hợp chất protein như bacteriocin hoặc tương tự bacteriocin do *L. acidophilus* sản xuất phần lớn được biết đến và được tìm thấy có hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với các vi khuẩn có quan hệ họ hàng gần và các vi sinh vật gây hại không mong muốn. Chúng rất hữu ích trong các lĩnh vực bảo quản thực phẩm hoặc ứng dụng trong dược phẩm, chăm sóc sức khỏe. Một số chủng *L. acidophilus* có thể tạo ra các chất cạnh tranh và ngăn ngừa vi khuẩn gây bệnh từ việc bám dính vào các thụ thể trên các tế bào biểu mô của bề mặt ruột [6].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu phát triển mô hình bán công nghiệp sản xuất sinh khối *L. acidophilus* cho các ứng dụng trị liệu sinh học và probiotic, sử dụng các

*Tác giả liên hệ: Email: luongimbt@gmail.com

Culture condition for the growth of *L. acidophilus* VTCC 12257 in lab and 30 litre bioreactor scale

Thi Luong Dao*, Thi Hang Ha, Van Hop Duong

*Institute of Microbiology and Biotechnology,
Vietnam National University, Hanoi*

Received 7 January 2020; accepted 9 March 2020

Abstract:

Probiotic properties *in vitro* of the *L. acidophilus* T12.2 (VTCC 12257), were isolated from fermented shrimp were evaluated based on biological characteristics and tolerance under simulated intestinal conditions. In this study, the growth kinetics of the VTCC 12257 strain was studied for high biomass production in a lab and 30 litre bioreactor scale. In case of a lab, the highest biomass was obtained under the culture conditions as SPY medium, at 37°C, pH 6.5, inoculum size of 3% in 32 h; the best sources of carbon and nitrogen were found to be glucose and mixture of peptone and yeast extract; cell dry weight reached 0.59 g/l. During 30 litre bioreactor cultivation, the maximal cell mass obtained at the agitation speed of 50 rpm, and 16-24 h of incubation, was 0.72 g/l in pH-controlled culture and 0.64 g/l in the uncontrolled pH. This is considered as the first step for cell mass production of this probiotic bacterium in the industrial scale.

Keywords: biomass, lab and 30 litre bioreactor scale, *L. acidophilus* VTCC 12257, probiotic.

Classification number: 2.8

môi trường và thông số khác nhau ở cả hai điều kiện: nuôi trong phòng thí nghiệm và thiết bị lên men 30 l, làm tiền đề cho sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Đối tượng và phương pháp

Vĩ sinh vật

- Chủng *L. acidophilus* VTCC 12257 được lưu giữ tại Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

- Vi sinh vật kiểm định: *Salmonella enterica* VTCC-B-0480.

Môi trường

- Môi trường MRSA (g/l): pepton-10,0; cao nấm men-5,0; cao thịt-10,0; glucoza-20,0; K₂HPO₄-2,0; CaCO₃-5,0; CH₃COONa-5,0; triamoni citrat-2,0; MgSO₄.7H₂O-0,58; MnSO₄.4H₂O-0,28; tween 80-1 ml; thạch-15,0; nước cất vừa đủ-1 l; pH 6,5±0,2.

- Môi trường NA (g/l): cao thịt-3,0; pepton-5,0; NaCl-5,0; pH 7,0±0,2.

- Môi trường dịch thể (g/l): MT1 (MRS): pepton-10,0; cao nấm men-5,0; cao thịt-10,0; glucoza-20,0; K₂HPO₄-2,0; CaCO₃-5,0; CH₃COONa-5,0; triamoni citrat-2,0; MgSO₄.7H₂O-0,58; MnSO₄.4H₂O-0,28; tween 80-1 ml; nước cất vừa đủ-1 l; pH 6,5±0,2. MT2: tryptone-30,4; cao nấm men-8,92; glucose-15,0; pH 6,8. MT3: glucose-13,4; cao thịt-7,2; sodium pyruvate-3,4; K₂HPO₄-2; sodium acetate-5; ammonium citrate-2; pH 6,5. MT4: glucose-20; cao nấm men-6; KH₂PO₄-0,25; sodium acetate-5; triammonium citrate-2; MgSO₄.7H₂O-0,05; pH 6,5. MT5: cao nấm men-3; peptone-5; cao malt-3; glucose-10; sodium sulphite-2,92; basic fushsin-0,47; pH 6,9. MT6: peptone-6; cao nấm men-6; KH₂PO₄-1,5; ammonium citrate-1; tween 80-1; sodium acetate-1; citric acid-0,5; MgSO₄.7H₂O-0,4; MnSO₄-0,05; glucose-30; pH 6,8. MT7 (SPY): peptone-25; glucose-25; cao nấm men-25, pH 6,5. MT8: lactose-17,7; cao nấm men-18,6; CaCl₂-0,9; pH 6,5.

Phương pháp

Xác định khả năng sinh trưởng: xác định sinh khối: vi khuẩn được nuôi tĩnh trong ống nghiệm nút xoáy chứa 20 ml dịch lên men trong phòng thí nghiệm hoặc trong thiết bị lên men 30 l chứa 20 l môi trường. Mật độ tế bào được đo ở OD₆₀₀ và 1 OD₆₀₀ tương đương với 0,3 g/l [7].

Hoạt tính kháng khuẩn: sử dụng phương pháp khuếch tán trên thạch theo mô tả của Jamaly và cs (2011) [8].

Phương pháp xác định hàm lượng glucose: sử dụng

thuốc thử DNS theo phương pháp của Miller (1959) [9].

pH môi trường được kiểm tra trên thiết bị đo pH theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nghiên cứu điều kiện nuôi:

- Lựa chọn điều kiện nuôi thích hợp trong phòng thí nghiệm: chủng vi khuẩn được nuôi tĩnh trong ống nghiệm nút xoáy (20 ml) trên 8 loại môi trường (MT1-MT8). Thử nghiệm sinh trưởng ở các nhiệt độ khác nhau (20, 25, 30, 35, 40, 45 và 50°C); pH thay đổi từ 3 đến 9; tỷ lệ giống cấy từ 0,2 đến 10%; các nguồn cacbon thay thế là fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannitol, saccharose, tinh bột; nguồn nitơ thay thế là cao malt, cao nấm men, cao thịt, casein, pepton, NaNO_3 , NaNO_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và urê. Thời gian nuôi liên tục từ 0 đến 48 giờ đã được thử nghiệm cho khả năng tạo sinh khối, pH sau nuôi và hàm lượng glucose.

- Lựa chọn điều kiện nuôi thích hợp trên thiết bị lên men 30 l: vi khuẩn được nuôi trong thiết bị lên men 30 l chứa 20 l môi trường, cấy 5% giống; nhiệt độ nuôi ở 37°C; pH ban đầu được điều chỉnh đến 6,5 sau khi khử trùng. pH kiểm soát ở cùng một giá trị trong quá trình nuôi được điều chỉnh bằng 2,5M NaOH và 2,5M HCl. Trong quá trình nuôi sử dụng chất chống tạo bọt vô trùng. Khối lượng tế bào được xác định ở các tốc độ khuấy 10, 30, 50, 100 và 150 v/ph. Xác định pH sau nuôi; hàm lượng glucose và khối lượng tế bào theo thời gian nuôi 8, 16, 24, 32, 40 và 48 giờ dưới điều kiện pH được kiểm soát và không kiểm soát.

Các thí nghiệm được tiến hành 3 lần, kết quả là trung bình của 3 thử nghiệm độc lập.

Kết quả và thảo luận

Đặc tính probiotic trong điều kiện *in vitro* của chủng vi khuẩn VTCC 12257 (T12.2), phân lập từ tôm lên men ở đảo Phú Quốc, đã được đánh giá dựa vào các đặc điểm sinh học và khả năng chống chịu trong điều kiện ruột mô phỏng. Chủng vi khuẩn được định danh là *L. acidophilus* VTCC 12257 dựa vào hình thái và trình tự ADNr 16S. Chủng này mang đầy đủ đặc tính probiotic như: sinh trưởng ở 37°C, có khả năng sinh các enzyme ngoại bào (β -galactosidase, cellulase và protease), có khả năng ức chế một số vi khuẩn gây bệnh đường ruột và phổ kháng rộng từ dịch nuôi, chịu muối mật (0,5%), tồn tại trong điều kiện khắc nghiệt của dạ dày và ruột, có khả năng bám dính tốt vào các tế bào biểu mô ruột và nhạy cảm với một số loại kháng sinh thông dụng thử nghiệm. Các kết quả đã chứng minh *L. acidophilus* VTCC 12257 là một chủng probiotic đầy hứa hẹn [10]. Trong nghiên cứu này, chủng VTCC 12257 được nghiên cứu các điều kiện nuôi thích hợp cho sản xuất sinh khối cao ở quy mô phòng thí nghiệm và thiết bị lên men 30 l.

Lựa chọn điều kiện nuôi thích hợp trong phòng thí nghiệm

Nuôi chủng *L. acidophilus* VTCC 12257 trong ống nghiệm nút xoáy chứa 20 ml môi trường cho các thực nghiệm: lựa chọn môi trường, nhiệt độ, giá trị pH, tỷ lệ giống, nguồn cacbon, nguồn nitơ và thời gian nuôi được đánh giá riêng biệt.

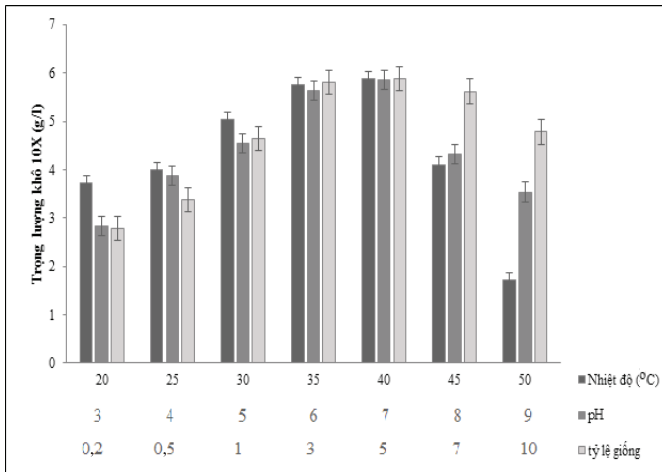
8 môi trường nuôi dựa trên các nghiên cứu trước đây được thực hiện với vi khuẩn axit lactic, được dùng để nghiên cứu khả năng tạo sinh khối và khả năng kháng *Salmonella enterica* của *L. acidophilus* VTCC 12257. Quá trình tạo sinh khối tế bào phụ thuộc vào nhiều điều kiện, trong đó thành phần môi trường có vai trò vô cùng quan trọng. Kết quả trong hình 1 cho thấy, tất cả các môi trường được thử nghiệm đều có thể hỗ trợ tế bào sinh trưởng và sản sinh chất kháng khuẩn, nhưng ở mức độ khác nhau. Trong thí nghiệm này, môi trường MT1 (MRS) và MT7 (SPY) có thể tạo ra khối lượng tế bào khô cao nhất trong số những môi trường nuôi sau 24 giờ (0,57-0,59 g/l).



Hình 1. Lựa chọn môi trường nuôi thích hợp.

Khả năng kháng *Salmonella enterica* cũng thay đổi giữa các môi trường thử nghiệm, kết quả kháng khuẩn cao nhất trên 2 môi trường MRS và SPY và không có sự khác biệt đáng kể giữa 2 môi trường này (27 và 28 mm). Sản xuất bacteriocin phụ thuộc vào loại môi trường nuôi cấy và bị ảnh hưởng bởi thành phần môi trường, MRS dường như là môi trường phù hợp hơn so với các môi trường được thử nghiệm khác, kết quả tương tự đã được quan sát trong các nghiên cứu trước đây [11], vì nó có lợi cho sự phát triển của vi khuẩn và mật độ tế bào cao thường có lợi cho việc sản xuất bacteriocin, nhưng những năm gần đây, việc sử dụng một số thực phẩm làm nguyên liệu thô sẽ kinh tế hơn [7]. Heenan và cs (2002) [12] đã nuôi vi khuẩn probiotic trong môi trường cơ bản có chứa peptone đậu nành, cao nấm men và glucose monohydrate. Trong thí nghiệm của Elsayed

và cs (2014) [7], lựa chọn môi trường SPY có khối lượng tế bào khô cao nhất (2,84 g/l) trong số những môi trường thử nghiệm sau 24 giờ nuôi *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* WICC-B-02. Môi trường MT7 (SPY) được chọn cho các bước nghiên cứu tiếp theo trong báo cáo này.



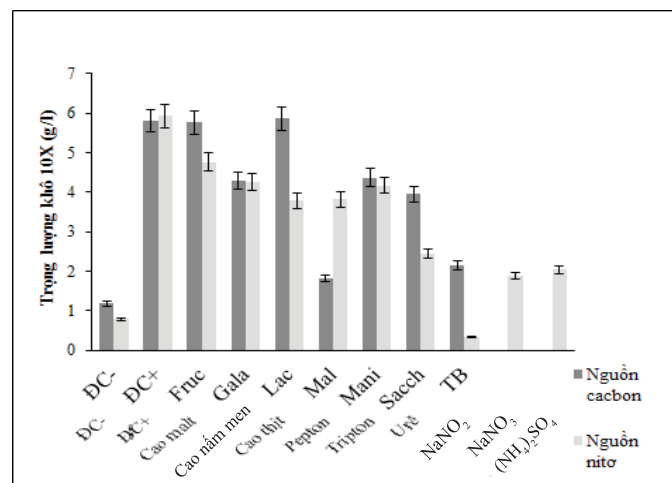
Hình 2. Lựa chọn nhiệt độ, pH nuôi và tỷ lệ giống cấy thích hợp.

Nghiên cứu về ảnh hưởng của các yếu tố vật lý (bao gồm nhiệt độ và pH) đến việc sản xuất sinh khối của chủng VTCC 12257 được thực hiện trên môi trường MT7 dịch thể (hình 2). Ở tất cả các nhiệt độ được thử nghiệm (20, 25, 30, 35, 40, 45 và 50°C), sinh khối tăng lên khi tăng nhiệt độ đến 40°C, sinh khối cao nhất được quan sát thấy ở 35-40°C đạt 0,575-0,587 g/l. Tăng quá 40°C, nhiệt độ nuôi có ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng. Hầu hết các thành viên của vi khuẩn lactic là mesophilic, tăng trưởng tối ưu ở nhiệt độ 35-40°C và tất cả các hoạt động trao đổi chất, bao gồm sản xuất bacteriocin cũng xảy ra trong khoảng nhiệt độ này [13]. Kết quả của Kheirallah và cs (2014) [14] công bố hoạt tính kháng khuẩn tối đa của các chất chuyển hóa của *B. bifidum* trùng với nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của tế bào ở 37°C. Favaro và cs (2012) [15] cũng có kết quả tương tự khi nghiên cứu trên *Enterococcus faecium*. Việc giảm hoạt tính kháng khuẩn do các chất chuyển hóa được tạo ra ở nhiệt độ cao hơn và thấp hơn có thể được coi là tăng trưởng chậm, dẫn đến làm chậm quá trình tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn [16]. Nhiệt độ 37°C được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Độ pH được biết là rất quan trọng đối với sinh khối cũng như sản phẩm bacteriocin của vi khuẩn lactic, bởi sự tổng hợp, hấp phụ của bacteriocin vào tế bào và sự phân hủy protein phụ thuộc vào pH [13]. Chủng VTCC 12257 có khả năng sinh trưởng ở các pH nghiên cứu từ 3-9; sinh khối tăng từ pH 3-7 và giảm từ pH 8-9; đạt giá trị cao nhất ở pH 6-7. Đây là chủng có khả năng chịu pH thấp tốt, sinh khối đạt

gần 50% ở pH3 so với sinh khối cao nhất ở pH 6-7 (hình 2). pH được chọn để nuôi vi khuẩn VTCC 12257 là 6,5. Kết quả trên tương tự với báo cáo của Enan và Alamri (2006) [17] nuôi *L. plantarum*, sinh khối và hợp chất kháng khuẩn cao nhất (plantaricin Ugl), khi độ pH ban đầu được kiểm soát ở mức 6,5. Các nghiên cứu khác cũng báo cáo hoạt tính kháng khuẩn cao nhất được tạo ra với pH ban đầu 6,5 bởi *Enterococcus faecium* trong Cheese Whey bổ sung [15] và *Lactococcus lactis* trong váng sữa [18]. Mặt khác, Ghaly và cs (2003) [19] đã báo cáo rằng, việc sản xuất axit lactic của *Lactobacillus helveticus* được tăng cường rất nhiều từ Cheese Whey được bổ sung cao nấm men và lactamine dưới pH kiểm soát 5,5.

Tỷ lệ giống cấy là một trong những thông số quan trọng trong nghiên cứu điều kiện lên men. Trong thí nghiệm này, tỷ lệ giống 0,2-10% (v/v) được kiểm tra, sinh khối thấp nhất khi cấy 0,2% giống; sinh khối tăng dần khi cấy lượng giống tăng đến 5% và có xu hướng giảm nhẹ khi cấy giống trên 7% (hình 2). Tỷ lệ giống tốt nhất của chủng VTCC 12257 để tạo sinh khối là 3-5%. Kheirallah và cs (2014) [14] báo cáo tỷ lệ giống tốt nhất nuôi *Bifidobacterium bifidum* để tạo hợp chất kháng khuẩn là 2%. Khi tỷ lệ giống thấp hơn hoặc cao hơn tỷ lệ này, hoạt tính kháng khuẩn giảm. Tỷ lệ giống thấp, tế bào *B. bifidum* không đủ để tạo các hợp chất kháng khuẩn, khi tăng tỷ lệ giống tối ưu làm cho các tế bào ở trạng thái hoàn thiện và bắt đầu sản xuất các hợp chất kháng khuẩn để duy trì sự sống của vi khuẩn. Việc sản xuất tối đa các hợp chất kháng khuẩn tương ứng với sinh khối tế bào tối đa.

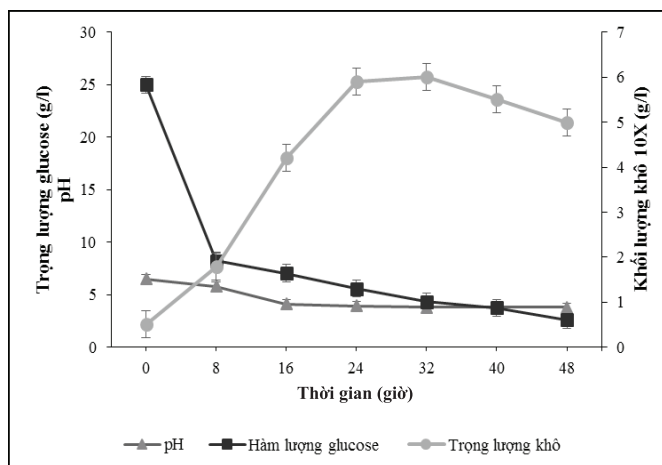


Hình 3. Lựa chọn nguồn cacbon, nitơ thích hợp.

Các nguồn carbon khác nhau đã được sử dụng cho sinh trưởng của chủng VTCC 12257 (hình 3), glucose, maltose và fructose là nguồn carbon tốt nhất trong số các nguồn được thử nghiệm, trọng lượng tế bào khô tối đa là 0,58-0,59

g/l. Mannitol và tinh bột tan cho trọng lượng tế bào khô thấp nhất (0,18-0,21 g/l). Trong báo cáo của Dailin và cs (2015) [20], sinh khối tế bào của *Lactobacillus kefiranoferiens* đạt 0,96 g/l khi nuôi trên glucose, sau đó là sucrose, lactose và mannitol. Tuy nhiên, đối với *L. acidophilus* A12, glucose là nguồn carbon cho mật độ tế bào thấp hơn lactose, glycerol, mannitol, ethanol và fructose. Ở *L. acidophilus* ATCC 4962, mannitol được xác định là nguồn carbon tốt nhất để tăng trưởng tế bào và loại bỏ cholesterol [21]. Các loại đường khác nhau đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu để tối ưu sản xuất bacteriocin ở các chủng vi khuẩn khác nhau, tuy nhiên, glucose vẫn được coi là nguồn carbon tốt nhất kích thích sản xuất bacteriocin, phần lớn các thực nghiệm đã chứng minh năng suất bacteriocin cao liên quan đến sự hiện diện của glucose trong môi trường sinh trưởng chứ không phải các monosacarit khác. Glucose được coi là nguồn carbon chính của hầu hết các vi sinh vật bởi vì nó được đồng hóa và chuyển hóa năng lượng tế bào nhanh. Tác động tiêu cực của tinh bột đối với bacteriocin có thể do vi khuẩn đã bị hấp phụ lên bề mặt của các phân tử tinh bột, làm hạn chế sử dụng của chúng [13].

Hầu hết các môi trường nuôi được sử dụng cho vi khuẩn lactic thường được bổ sung nguồn nitơ, là nguồn có ảnh hưởng lớn đến sản xuất sinh khối. Nuôi chủng VTCC 12257 trên môi trường MT7, thay lần lượt các nguồn nitơ hữu cơ là cao malt, cao nấm men, cao thịt, pepton, tryptone, urê; và các nguồn vô cơ: NaNO_2 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nguồn nitơ ảnh hưởng nhiều đến sinh trưởng của chủng VTCC 12257, sinh khối cao hơn khi thay bằng các nguồn hữu cơ đơn từ 0,24-0,47 g/l. Các nguồn nitơ vô cơ đều cho kết quả thấp hơn đáng kể so với nguồn nitơ hữu cơ, chỉ đạt 0,03-0,20 g/l. NaNO_2 còn gây ức chế sự sinh trưởng. Khối lượng tế bào cho mỗi nguồn nitơ theo thứ tự giảm dần như sau: cao nấm men > peptone > tryptone > cao malt > cao thịt > urê > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ > NaNO_3 > NaNO_2 (hình 3). Tuy nhiên, nguồn nitơ hỗn hợp của cao nấm men và pepton (ĐC +) cho sinh khối cao nhất, đạt 0,59 g/l. Do đó, hỗn hợp của cao nấm men và pepton đã được sử dụng làm nguồn nitơ cho các thí nghiệm tiếp theo. Cao nấm men là nguồn nitơ được sử dụng phổ biến nhất cung cấp hàm lượng phức hợp vitamin và tiền chất DNA bên cạnh nitơ hữu cơ cho vi khuẩn lactic. Lee và cs (2010) [21] thu được mật độ tế bào cao nhất khi cao nấm men được sử dụng làm nguồn nitơ nuôi *L. acidophilus* A12, đạt giá trị 8,15 Log CFU/ml. Mật độ tế bào tương đối cho mỗi nguồn nitơ theo thứ tự giảm dần như sau: cao nấm men > peptone > tryptone > cao malt > cao thịt. Thi và cs (2003) [22] đã chứng minh rằng, sự kết hợp của peptone thịt với các nguồn nitơ khác như cao nấm men giúp vi khuẩn phát triển tốt.

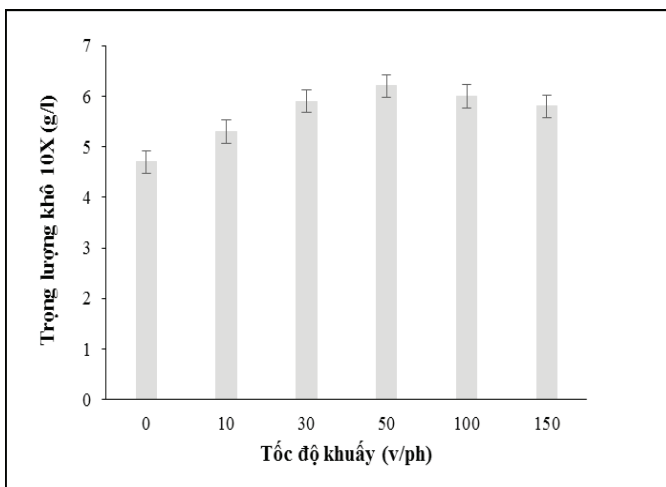


Hình 4. Lựa chọn thời gian nuôi thích hợp ở quy mô phòng thí nghiệm.

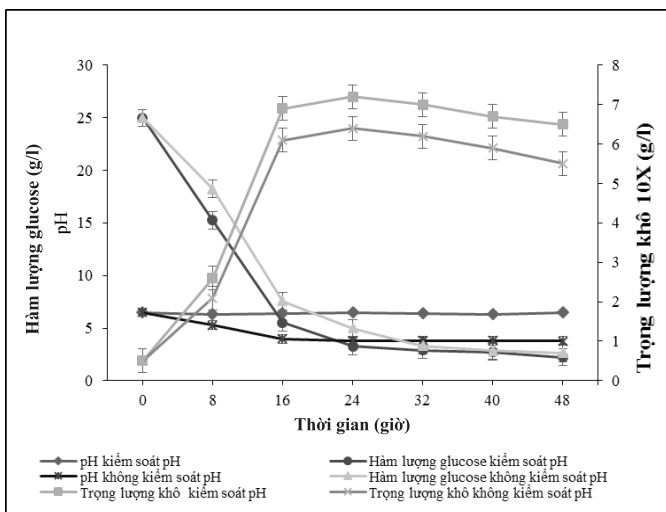
Nghiên cứu động học phát triển của tế bào, pH thay đổi và lượng glucose tiêu thụ trong quá trình nuôi của *L. acidophilus* VTCC 12257 được tiến hành trong thời gian 48 giờ liên tục. Tế bào phát triển với pha lag ngắn và đạt khối lượng tế bào cao nhất (0,59 g/l) sau 24 giờ nuôi. Khối lượng tế bào duy trì đến 40 giờ nuôi và giảm nhẹ sau đó, đạt 0,45 g/l vào 48 giờ nuôi. Điều này cho thấy, sinh trưởng đạt đến pha ổn định sau 32 giờ có thể là kết quả của sự tích tụ các sản phẩm phụ hoặc giới hạn chất dinh dưỡng. Trong quá trình tăng trưởng tế bào, pH môi trường giảm dần và đạt giá trị 3,92 sau 24 giờ nuôi. Sau thời gian đó, pH vẫn giữ nguyên trong khoảng 3,8 cho đến khi kết thúc quá trình nuôi. Tốc độ tiêu thụ glucose nhanh hơn trong 16 giờ nuôi ban đầu. Vào cuối thời gian nuôi, 10,48% lượng glucose đã không được sử dụng bởi tế bào bước vào pha ổn định và hạn chế sử dụng nguồn cacbon (hình 4). Đường cong sinh trưởng tế bào của *L. acidophilus* A12 được xây dựng trong môi trường MRS bởi Lee và cs (2010) [21]. Pha lag khoảng 2 giờ sau đó là pha logarit từ 2 đến 8 giờ. Tăng trưởng tế bào được duy trì thêm 8 giờ. Số lượng tối đa của tế bào được quan sát thấy ở 16 giờ với mật độ tế bào là 8,23 Log CFU/ml [21]. Động học của sự tăng trưởng tế bào và sản xuất axit lactic của *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* WICC B-02 được nuôi trong môi trường tối ưu hóa chứa 3 thành phần chính glucose, cao nấm men và peptone được báo cáo [7]. Tế bào bước vào pha lag trong 2 giờ nuôi, sau tế bào bắt đầu tăng theo cấp số nhân, đạt trọng lượng khô tối đa là 3,14 g/l, giai đoạn ổn định sau 10 giờ. Độ pH của môi trường giảm dần và thấp nhất là 5,28; sau đó tăng lên 5,76 khi kết thúc quá trình nuôi. Điều này có thể được quy cho sự hình thành các ion amoni tự do từ phản ứng của axit lactic và axit amin của *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* do giải thích sự gia tăng độ pH của môi trường.

Lựa chọn điều kiện nuôi thích hợp trên thiết bị lên men 30 l

Tốc độ khuấy có vai trò lớn đối với sinh trưởng của các vi sinh vật khi nuôi trong các thiết bị lên men, nó vừa có tác dụng đảo trộn môi trường vừa giúp phân tán đều dinh dưỡng tiếp xúc với bề mặt, làm tăng khả năng hấp thụ dinh dưỡng của tế bào. Chủng VTCC 12257 được nuôi trên thiết bị 30 l chứa 20 l môi trường MT7, ở 37°C, với 3% giống, thời gian 24 giờ. Sinh khối tăng khi tăng tốc độ khuấy từ 10-50 v/ph và có xu thế giảm nhẹ khi tăng cao hơn. Tốc độ khuấy thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng VTCC 12257 là 50 v/ph với sinh khối đạt 0,62 g/l (hình 5).



Hình 5. Lựa chọn chế độ khuấy thích hợp.



Hình 6. Lựa chọn thời gian nuôi thích hợp trên thiết bị 30 l.

Ảnh hưởng của pH được kiểm soát và không được kiểm soát trong quá trình lên men theo mẻ của chủng VTCC 12257 trên thiết bị lên men 30 l, ở 37°C trong 48 giờ với pH ban đầu là 6,5. Hình 6 biểu thị sự thay đổi của sinh khối, tiêu

thụ glucose và thay đổi pH trong điều kiện pH được kiểm soát và không kiểm soát, các mẫu được lấy trong mỗi 8 giờ. Khối lượng tế bào thu được từ cả hai quá trình lên men trên thiết bị 30 l đều cao hơn so với kết quả thu được từ quy mô phòng thí nghiệm. Sinh khối tế bào tối đa thu được lần lượt là 0,72 và 0,64 g/l đối với quá trình lên men được kiểm soát và không kiểm soát pH, tăng khoảng 16,7 và 6,3% so với khối lượng tối đa thu được trong quy mô phòng thí nghiệm (0,6 g/l, hình 4). Điều này có thể được quy cho các điều kiện nuôi tốt hơn từ thiết bị được khuấy trộn và phân phối các thành phần môi trường cũng như các sản phẩm chuyển hóa. Ngoài ra, sự giảm của sinh khối tế bào trong quá trình lên men không được kiểm soát pH có thể được giải thích dựa trên thực tế là việc sản sinh lactic tạo ra một môi trường có tính axit cao, ức chế sự phát triển của tế bào.

Ở điều kiện nuôi pH kiểm soát, khối lượng tế bào đạt tối đa sau 16-24 giờ và duy trì đến 32 giờ, sau đó giảm nhẹ. Tốc độ tiêu thụ glucose nhanh trong 16 giờ nuôi. Vào cuối thời gian nuôi, lượng glucose còn lại là 8,9%. Nuôi ở điều kiện pH không kiểm soát (pH ban đầu là 6,5), sinh trưởng của chủng VTCC 12257 cũng tăng theo cấp số nhân, sinh khối cũng đạt tối đa sau 16-24 giờ. Tuy nhiên, giá trị này thấp hơn so với quá trình nuôi pH được kiểm soát và cao hơn khi nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm. Mặt khác, pH của môi trường giảm đáng kể, đạt giá trị khoảng 3,96 trong 16 giờ đầu tiên do sự hình thành axit. Tốc độ tiêu thụ glucose của chủng VTCC 12257 nhanh hơn trong 16 giờ nuôi ban đầu, lượng glucose còn lại là 10,5% vào thời gian cuối.

Trong nghiên cứu của Elsayed và cs (2014) [7], nuôi chủng *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* trên thiết bị lên men 16 l, chứa 8 l môi trường tối ưu ở chế độ pH được kiểm soát và không kiểm soát, khối lượng tế bào tối đa 6,59 g/l đạt được sau 8 giờ dưới điều kiện pH được kiểm soát và 4,88 g/l sau 12 giờ dưới điều kiện pH không kiểm soát. Glucose giảm rất nhanh trong 6 giờ nuôi dưới điều kiện pH được kiểm soát và 10 giờ trong điều kiện pH không kiểm soát. Khối lượng tế bào tối đa cũng cao hơn trong điều kiện pH được kiểm soát (7,5 g/l) so với điều kiện pH không được kiểm soát (5,38 g/l) khi nuôi *L. salivarius* trong thiết bị lên men 16 l [23].

Kết luận

- Chủng *L. acidophilus* VTCC 12257 cho sinh khối cao nhất trên môi trường MT7 (SPY), nhiệt độ 37°C, pH 6,5, tỷ lệ giống cấy 3%, nguồn cacbon là glucose, nguồn nitơ là hỗn hợp của pepton và cao nấm men; thời gian nuôi 24-32 giờ trong quy mô phòng thí nghiệm.

- Khối lượng tế bào tối đa cao hơn trong điều kiện pH được kiểm soát so với điều kiện pH không được kiểm soát khi nuôi VTCC 12257 trong thiết bị lên men 30 l ở tốc độ khuấy 50 v/ph; thời gian lên men 16-24 giờ.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin cảm ơn Dự án FIRST - Tiểu hợp phần 2a của Nhóm hợp tác “Tăng cường năng lực làm chủ công nghệ lên men sản xuất enzyme, probiotic đáp ứng nhu cầu trong nước và nâng cao khả năng tự chủ của Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội” đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.C. Senok, A.Y. Ismaeel, C.A. Butta (2005), “Probiotics: facts and myths”, *Clinical Microbiology and Infection*, **11**, pp.958-966.
- [2] FAO, WHO (2002), *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1.
- [3] M.E. Sanders (1999), “Probiotics”, *Food Technology*, **53**, pp.67-75.
- [4] N. Elmarzugi, H.E. Enshasy, R.A. Malek, Z. Othman, M.R. Sarmidi, and R.A. Aziz (2015), “Optimization of cell mass production of the probiotic strain *Lactococcus lactis* in batch and fed-batch culture in pilot scale levels”, *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp.873-879.
- [5] M.E. Sanders, T.R. Klaenhammer (2001), “Invited review: the scientific basis of *L. acidophilus* NCFM functionality as a probiotic”, *Journal of Dairy Science*, **84**, pp.319-331.
- [6] Z. Ahmed, Y. Wang, Q. Cheng, and M. Imran (2010), “*L. acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview”, *African Journal of Biotechnology*, **9**(20), pp.2843-2850.
- [7] A.E. Elsayed, N.Z. Othman, R. Malek, T. Tang, and A.E.E. Hesham (2014), “Improvement of cell mass production of *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* WICC-B-02: a newly isolated probiotic strain from mother’s milk”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **4**(11), pp.8-14.
- [8] U. Jamaly, N.A. Benjouad, and M. Bouksaim (2011), “Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products”, *British Microbiology Research Journal*, **1**(4), pp.79-94.
- [9] G.L. Miller (1959), “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”, *Analytical Chemistry*, **31**, pp.426-428.
- [10] N.T. Hoa, N.H. Tuấn, H.T. Hằng, D.V. Hợp, Đ.T. Lương (2018), “Đặc tính probiotic của 2 chủng *L. acidophilus* T5.1 và T12.2, phân lập từ thực phẩm lên men”, *Hội nghị khoa học quốc gia lần thứ 3, Quy Nhơn*, Nhà Xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tr.163-172.
- [11] S.R. Biswas, P. Ray, M.C. Johnson, and B. Ray (1991), “Influence of growth conditions on the production of bacteriocin, Pidiocin AcH, by *Pediococcus acidilacticus* H”, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, pp.1262-1267.
- [12] C.N. Heenan, M.C. Adams, R.W. Hosken, G.H. Fleet (2002), “Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products”, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **35**, pp.171-176.
- [13] S. Abas, A. Wendawi, A. Abead, A. Saady (2012), “Screening for bacteriocins production in Enteric *Bifidobacterium* isolates and study of some production affecting factors”, *Medical Journal of Babylon*, **9**(2), pp.386-396.
- [14] Z.M.H. Kheirallah, A.Y. Okda, M.M. Abdelrazek, M.M. Abonor, M.I. Mabrouk, and E.A.E. Saker (2014), “Optimization of conditions for production of antimicrobial activity by *Bifidobacterium bifidum* in alternative whey based medium”, *Middle East Journal of Applied Sciences*, **4**(4), pp.949-958.
- [15] L. Favaro, S. Schirru, R. Comunian, M. Basaglia, S. Casella, A. Paba, E. Daga, B.D.G.M. Franco, R.P.S. Oliveira, and S.D. Todorov (2012), “Composition of bacteriocins production from *Enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimized commercial MRS medium”, *Environmental Engineering and Management Journal*, **11**(3), p.73.
- [16] E. Khay, M. Ouhsassi, A. El Harsal, M. Idaomar, and J. Abrini (2013), “Optimization of bacteriocin-like production by *Enterococcus durans* E204 isolated from camel milk of Morocco”, *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, **1**(4), pp.155-159.
- [17] G. Enan and A. Alamri (2006), “Novel plantaricin UG1 production by *Lactobacillus plantarum* UG1 in enriched whey permeate in batch fermentation process”, *The Journal of Food, Agric culture and Environment*, **4**(2), pp.85-88.
- [18] A.F. Jozala, D.P. Silva, A.A. Vicente, J.A. Teixeira, A.P. Junior, and C.V. Penna (2011), “Processing of byproducts to improve nisin production by *Lactococcus lactis*”, *African Journal of Biotechnology*, **10**(66), pp.14920-14925.
- [19] A.E. Ghaly, M.S.A. Tango, and M.A. Adams (2003), “Enhanced lactic acid production from cheese whey with nutrient supplement addition”, *Agricultural Engineering International: CIGR Journal Science Research and Development*, pp.1-20.
- [20] A.J. Dailin, E.A. Elsayed, N. Othman, R.A. Malek, M.R. Sarmidi, and H.E. Enshasy (2015), “Development of cultivation medium for high yield Kefiran production by *Lactobacillus kefirianofaciens*”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **7**(3), pp.159-163.
- [21] N-K. Lee, Y-L. Park, G.J. Choe, H-I. Chang, and H-D. Paik (2010), “Medium optimization for the production of probiotic *L. acidophilus* A12 using response surface methodology”, *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **30**(3), pp.359-364.
- [22] L.N. Thi, C.P. Champagne, B.H. Lee, J. Gouletb (2003), “Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey”, *The International Journal of Food Microbiology*, **8**(1), pp.67-75.
- [23] R.A. Malek, S. Hamdan, H. El Enshasy, N.Z. Othman, N.A. Zainol, M.R. Sarmidi, R. Aziz (2010), “Production of *Lactobacillus salivarius*, a new probiotic strain isolated from human breast milk, in semi-industrial scale and studies on its functional characterization”, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Spain: Formatex Research Centre, Badajoz, **2**, pp.1196-1204.