

Tuyển chọn vi khuẩn lactic chịu nhiệt và ứng dụng trong sản xuất acid lactic

Ngô Thị Phương Dung*, Bùi Hoàng Đăng Long, Hoàng Nguyễn Phương Trinh,
Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Xuân Phong

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 14/11/2016, ngày chuyển phản biện 16/11/2016, ngày nhận phản biện 13/12/2016, ngày chấp nhận đăng 19/12/2016

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt có hoạt tính tốt để ứng dụng trong sản xuất acid lactic. Kết quả cho thấy, trong 54 chủng vi khuẩn thử nghiệm lên men acid lactic ở 37°C, 16 chủng đã được tuyển chọn do có khả năng lên men acid lactic mạnh. Các chủng được giải trình tự định danh thuộc các loài: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei* và *Lactobacillus plantarum*. Trong đó, *Lactobacillus casei* L9 thể hiện hoạt tính sinh acid lactic tốt ở 37°C (12,9 g/l), 39°C (18,9 g/l) và 41°C (18 g/l). Khi lên men 1 l với chủng *L. casei* L9 trong điều kiện thích hợp (pH 6,53, 6% (w/v) glucose, nồng độ chủng dịch tăng sinh gốc ở 10⁷ tế bào/ml là 2,33% (v/v) theo thể tích dịch lên men), hiệu suất lên men đạt 80,84%.

Từ khoá: acid lactic, chịu nhiệt, *Lactobacillus*, vi khuẩn acid lactic.

Chỉ số phân loại: 2.8

The selection of thermotolerant lactic acid bacteria and applications for lactic acid production

Summary

This study aimed to select thermotolerant lactic acid bacteria for the production of lactic acid. As a result, among 54 bacterial strains screened for lactic acid fermentation at 37°C, 16 strains were selected due to their significantly higher fermentation ability. The molecular sequencing and NCBI aligning evidences proved that the selected strains belonged to *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus plantarum*. Of which, *Lactobacillus casei* L9 showed the good acid production at 37°C (12.9 g/l), 39°C (18.9 g/l), and 41°C (18 g/l). In the fermentation test at one-liter scale by using *L. casei* L9 with the favourable conditions (pH 6.53, 6% (w/v) of glucose, 2.33% (v/v) of 10⁷ cells/ml starter), the fermentation yield could reach the 80.84% efficiency.

Keywords: lactic acid, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, thermotolerant.

Classification number: 2.8

Đặt vấn đề

Trong tự nhiên, lên men acid lactic là một trong các quá trình tái tạo năng lượng kỵ khí thông dụng nhất được thực hiện bởi vi khuẩn lactic [1]. Từ quá trình lên men acid lactic, nhiều nhóm vi khuẩn lactic quan trọng đã được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau với các đặc tính ưu việt nhất định phục vụ các ứng dụng thực tiễn như chịu lạnh, chịu acid, tạo mùi hương...[2].

Trong thời kỳ cách mạng công nghiệp, quá trình lên men acid lactic diễn ra không chỉ ở quy mô thủ công mà ngày càng mở rộng theo xu hướng gắn với công nghiệp, trong các hệ thống lên men quy mô lớn. Để duy trì nhiệt độ lên men tối ưu, ngành công nghiệp lên men đã tốn kém nhiều chi phí xây dựng các hệ thống làm mát tốn kém nhiều năng lượng. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm tối ưu hóa nguồn nguyên liệu để giảm chi phí lên men acid lactic như lên men từ tinh bột [3], lõi bắp [4] hay sản xuất sinh khối vi khuẩn lactic từ nước chua tàu hũ [5]. Tuy nhiên, khả năng thích ứng của vi khuẩn với nhiệt độ cao hầu như chưa được đề cập đến. Từ thực tế cho thấy, việc tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic

*Tác giả liên hệ: ntpdung@ctu.edu.vn

chịu nhiệt độ cao có tiềm năng rất lớn trong việc đáp ứng với nhiệt lượng sinh ra trong lên men công nghiệp. Từ đó, có thể làm giảm chi phí sản xuất và năng lượng tiêu tốn, phục vụ phát triển bền vững. Thông qua xây dựng mối quan hệ di truyền phân loại của các nhóm vi khuẩn lactic thiết yếu cho quá trình lên men acid lactic chịu nhiệt, con người có thể mở rộng tầm ứng dụng vi khuẩn lactic chịu nhiệt phục vụ cuộc sống. Từ các vấn đề trên, nghiên cứu được tiến hành với mục đích tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt có hoạt tính tốt, thử nghiệm khả năng lên men acid lactic và khảo sát mối liên quan di truyền các nhóm vi khuẩn chịu nhiệt; đồng thời khảo sát khả năng ứng dụng các vi khuẩn chịu nhiệt để sản xuất acid lactic.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu và hoá chất

54 chủng vi khuẩn lactic được chọn lọc từ các nguồn phân lập: sản phẩm lên men sữa, chế phẩm sinh học và phụ phẩm nông nghiệp, lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Chủng *Lactobacillus thermotolerans* của Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh vật, Bộ môn Khoa học sinh học và Công nghệ sinh học, Khoa Nông nghiệp, Đại học Kyushu (Nhật Bản) được sử dụng làm chủng đối chứng.

Môi trường MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) gồm: peptone (10,0 g/l), meat extract (8,0 g/l), yeast extract (4,0 g/l), D(+) glucose (20,0 g/l), di-potassium hydrogen phosphate (2,0 g/l), Tween 80 (1,0 g/l), di-ammonium hydrogen citrate (2,0 g/l), sodium acetate (5,0 g/l), magnesium sulfate (0,2 g/l) và manganese sulfate (0,04 g/l) [6].

Phương pháp nghiên cứu

Khả năng lên men của vi khuẩn lactic chịu nhiệt ở 37°C: các chủng vi khuẩn được tăng sinh và ủ lactic ở 120 vòng/phút trong môi trường MRS sau 36 giờ và tiến hành lên men acid lactic trong ống Falcon chứa 30 ml dịch đường sucrose 4% (w/v) trong 7 ngày ở 37°C. Kiểm tra hàm lượng acid tổng và pH dung dịch sau khi lên men.

Mối liên quan di truyền các chủng vi khuẩn lactic: 16 chủng vi khuẩn tuyển chọn được ly trích DNA và khuếch đại trình tự 16S ribosomal RNA bằng trình tự mồi 27F (5'- TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') và

1492R (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') [7, 8], định danh và xác định mối liên quan di truyền. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự 16 vi khuẩn trên ngân hàng dữ liệu của NCBI [9] bằng công cụ Nucleotide BLAST. Xây dựng cây phả hệ gene 16S rRNA dựa trên công cụ so sánh nhiều trình tự (multiple alignment) của chương trình MEGA6 theo thông số Neighbor-Joining với chỉ số Bootstrap 1.000 lần lặp lại [10, 11].

Thử nghiệm điều kiện lên men acid lactic sử dụng vi khuẩn lactic chịu nhiệt:

Khả năng lên men của vi khuẩn lactic ở 37°C: 16 chủng tuyển chọn và 1 chủng đối chứng được tăng sinh và ủ lactic ở 120 vòng/phút trong môi trường MRS sau 36 giờ và sau đó được lên men ở 37°C trong ống Falcon chứa 50 ml môi trường MRS broth trong 7 ngày. Xác định các chỉ tiêu: hàm lượng acid tổng được đo bằng phương pháp chuẩn độ NaOH 0,1N [12], lượng đường còn lại sau lên men được xác định bằng phương pháp DNS [13], pH dịch lên men được đo bằng pH kế, hiệu suất lên men theo khối lượng nguyên liệu (g/g) và hiệu suất lên men được tính theo số mol (tỷ lệ 1 mol glucose tạo 2 mol acid lactic).

Khả năng lên men của vi khuẩn lactic ở 39°C và 41°C: các chủng vi khuẩn tuyển chọn được lên men tiếp ở 39°C và 41°C trong ống Falcon chứa 50 ml môi trường MRS broth trong 7 ngày. Xác định các chỉ tiêu: hàm lượng acid tổng, lượng đường còn lại sau lên men, pH dịch lên men và hiệu suất lên men theo số mol.

Khảo sát điều kiện tối ưu sản xuất acid lactic: chủng vi khuẩn tuyển chọn được lên men trong ống Falcon ở 39°C với môi trường MRS lỏng hiệu chỉnh các thông số: nồng độ glucose (4%, 5% và 6% w/v), nồng độ giống chủng (10^4 , 10^5 và 10^6 tế bào/ml) và pH ban đầu (5,0; 6,0 và 7,0). Kết quả được thống kê hồi quy mặt đáp ứng bằng phần mềm STATGRAPHIC centurion Version 16.

Khả năng sản xuất acid lactic ở quy mô 1 l: ứng dụng điều kiện tối ưu được xác định, tiến hành lên men 1 l với môi trường MRS lỏng hiệu chuẩn hàm lượng glucose 16% (w/v). Kiểm tra khả năng sinh acid lactic thông qua: chỉ số pH, hàm lượng acid, hàm lượng đường sau lên men và hiệu suất lên men.

Phương pháp phân tích thống kê

Các thí nghiệm được tiến hành với bố trí hoàn toàn

ngẫu nhiên, các nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Kết quả các thí nghiệm được phân tích thống kê bằng phần mềm STATGRAPHICS Centurion XV ở độ tin cậy 95%.

Kết quả

Khả năng lên men của vi khuẩn lactic chịu nhiệt ở 37°C

Bảng 1: hàm lượng acid tổng sinh ra sau 6 và 7 ngày lên men của 55 chủng vi khuẩn lactic ở nhiệt độ 37°C

Chủng	Hàm lượng acid lactic (g/l)		Chủng	Hàm lượng acid lactic (g/l)	
	Ngày 6	Ngày 7		Ngày 6	Ngày 7
L1	0,38 ^{ghjk}	0,53 ^{defghj}	L29	0,15 ^{ik}	0,30 ^{hj}
L2	1,5 ^a	1,58 ^{abc}	L30	0,83 ^{abdefghjk}	1,65 ^a
L3	0,53 ^{abdefghjk}	0,53 ^{efghj}	L31	0,75 ^{abdefghjk}	1,2 ^{abdefghjk}
L4	0,75 ^{abdefghjk}	0,75 ^{abdefghjk}	L32	0,90 ^{abdefghjk}	0,83 ^{abdefghjk}
L5	0,45 ^{cdefghjk}	0,68 ^{abdefghjk}	L33	0,75 ^{abdefghjk}	0,75 ^{abdefghjk}
L6	1,28 ^{abc}	1,65 ^{ab}	L34	0,68 ^{abdefghjk}	0,90 ^{abdefghjk}
L7	1,05 ^{abdefgh}	1,5 ^{abcde}	L35	0 ^k	0,23 ^j
L8	0,90 ^{abdefghjk}	1,13 ^{abdefghjk}	L36	0,83 ^{abdefghjk}	1,05 ^{abdefghjk}
L9	0,98 ^{abdefghjk}	1,35 ^{abdefghj}	L37	0,9 ^{abdefghjk}	1,13 ^{abdefghjk}
L10	0,45 ^{defghjk}	0,75 ^{abdefghjk}	L38	0,75 ^{abdefghjk}	0,90 ^{abdefghjk}
L11	0,75 ^{abdefghjk}	1,13 ^{abdefghjk}	L39	0,45 ^{efghjk}	0,6 ^{bdefghj}
L12	1,05 ^{abcdef}	1,13 ^{abdefghjk}	L40	0,98 ^{abdefghjk}	0,90 ^{abdefghjk}
L13	0,53 ^{abdefghjk}	0,6 ^{abdefghjk}	L41	0,98 ^{abdefghjk}	0,75 ^{abdefghjk}
L14	0,68 ^{abdefghjk}	0,75 ^{abdefghjk}	L42	0,68 ^{abdefghjk}	0,75 ^{abdefghjk}
L15	0,75 ^{abdefghjk}	1,28 ^{abdefghjk}	L43	0,98 ^{abdefghjk}	1,50 ^{abcd}
L16	1,20 ^{abcd}	0,90 ^{abdefghjk}	L44	0,68 ^{abdefghjk}	0,68 ^{abdefghjk}
L17	0,83 ^{abdefghjk}	0,90 ^{abdefghjk}	L45	0,38 ^{hjk}	0,45 ^{ghj}
L18	0,6 ^{abdefghjk}	0,75 ^{abdefghjk}	L46	0,60 ^{abdefghjk}	0,53 ^{fghj}
L19	0,90 ^{abdefghjk}	0,90 ^{abdefghjk}	L47	1,28 ^{ab}	1,13 ^{abdefghjk}
L20	0,90 ^{abdefghjk}	1,13 ^{abdefghjk}	L48	0,60 ^{abdefghjk}	0,68 ^{abdefghjk}
L21	1,05 ^{abdefghj}	1,13 ^{abdefghjk}	L49	0,90 ^{abdefghjk}	1,20 ^{abdefghjk}
L22	0,90 ^{abdefghjk}	1,13 ^{abdefghjk}	L50	0,75 ^{abdefghjk}	0,83 ^{abdefghjk}
L23	0,75 ^{abdefghjk}	0,90 ^{abdefghjk}	L51	0,53 ^{abdefghjk}	0,60 ^{defghj}
L24	0,45 ^{fghjk}	0,60 ^{defghj}	L52	0,98 ^{abdefghjk}	1,35 ^{abdefgh}
L25	0,68 ^{abdefghjk}	0,83 ^{abdefghjk}	L53	0,60 ^{abdefghjk}	0,75 ^{abdefghjk}
L26	0,90 ^{abdefghjk}	1,13 ^{abdefghjk}	L54	0,90 ^{abdefghjk}	1,43 ^{abcdef}
L27	1,2 ^{abcde}	1,35 ^{abdefgh}	ĐC	0,53 ^{bdefghjk}	0,60 ^{abdefghjk}
L28	1,05 ^{abdefgh}	1,13 ^{abdefghjk}			

Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột, số mũ giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% ($p > 0,05$)

Bảng 1 trình bày khả năng lên men acid lactic của các chủng vi khuẩn sau 7 ngày trong môi trường dịch sucrose 4% (w/v). Hàm lượng acid tổng sinh ra ngày 6 đạt từ 0 đến 1,5 g/l, ngày 7 từ 0,23 đến 1,65 g/l. Trong đó, 16 chủng gồm L2, L6, L7, L9, L10, L11, L20, L21, L26, L27, L30, L36, L37, L38, L52 và L54 sinh ra acid hàm lượng cao hơn các chủng còn lại với khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% với nồng độ từ 0,75-1,5 g/l (ngày 6) và từ 0,9-1,65 g/l (ngày 7), và 16 chủng này được chọn cho các thử nghiệm tiếp theo.

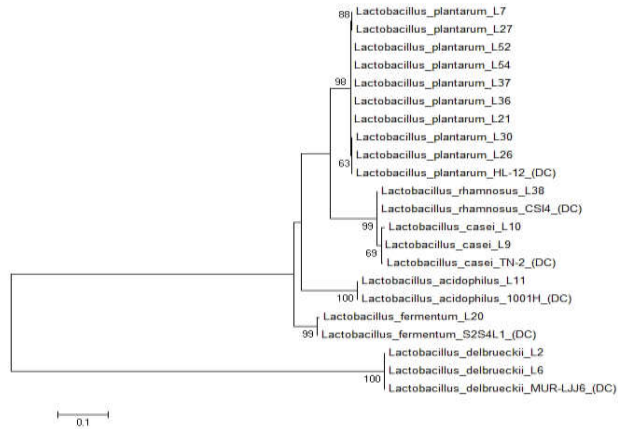
Mối liên quan di truyền các chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt

Định danh các chủng vi khuẩn lactic có khả năng lên men tốt:

Sau khi tra cứu trình tự bằng công cụ nucleotide BLAST của cơ sở dữ liệu NCBI, kết quả giải trình tự và đối chiếu với cơ sở dữ liệu dựa trên nguyên tắc ưu tiên truy vấn tương đồng (Identity) và độ bao phủ của trình tự (Query coverage) cho thấy, các chủng vi khuẩn lactic tương đồng với *Lactobacillus delbrueckii* (L2, L6); *L. plantarum* (L7, L21, L26, L27, L30, L36, L37, L52, L54); *L. casei* (L9, L10); *L. acidophilus* (L11); *L. fermentum* (L20) và *L. rhamnosus* (L38).

Mối liên quan di truyền của các chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt:

Hình 1 trình bày cây phân loại dựa trên trình tự di truyền các chủng vi khuẩn lactic. Cây phân loại di truyền chia thành nhiều nhánh cho thấy mức độ đa dạng di truyền của 16 chủng vi khuẩn cao. Chủng L6 và L2 có mối quan hệ trình tự di truyền tương đối dị biệt so với nhóm các mẫu còn lại, tương đồng với *L. delbrueckii* với bootstrap 100%. Mẫu L9 và L10 cùng tương đồng với *L. casei* và nhóm các mẫu L26, L27, L30, L36, L37, L52 và L54 có khoảng cách di truyền thấp, cùng tương đồng với loài *L. plantarum* với bootstrap 98%. Chủng L11 (*L. acidophilus*), L20 (*L. fermentum*) và L38 (*L. rhamnosus*) không cùng nhóm với các chủng còn lại. Các trình tự đối chứng được truy vấn từ NCBI và phân tích cùng phần mềm MEGA 6 (gồm *L. plantarum* HL-12, *L. casei* TN-2, *L. rhamnosus* CSI4, *L. acidophilus* 1001H, *L. fermentum* S2S4L1 và *L. delbrueckii* MUR-LJJ6) cho thấy, các trình tự của các chủng vi khuẩn đối chứng đều được xếp cùng nhánh với các trình tự của 16 chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt tương ứng theo từng nhóm với hệ số tương đồng tra cứu bằng công cụ BLAST trình bày ở bảng 2.



Hình 1: cây phân loại di truyền xây dựng bằng phần mềm MEGA 6

Bảng 2: kết quả định danh và tra cứu bằng công cụ BLAST của NCBI

Tên mẫu	Loài	Chủng tương đồng	% Tương đồng
L2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	MUR-LJJ6	100
L6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	MUR-LJJ6	100
L7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HL-12	87
L9	<i>Lactobacillus casei</i>	TN-2	97
L10	<i>Lactobacillus casei</i>	TN-2	99
L11	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1001H	100
L20	<i>Lactobacillus fermentum</i>	S2S4L1	97
L21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HL-12	96
L26	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HL-12	90
L27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HL-12	99
L30	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HL-12	97
L36	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HL-12	98
L37	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HL-12	97
L38	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CSI-4	99
L52	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HL-12	89
L54	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HL-12	94

Điều kiện lên men sản xuất acid lactic

Khả năng lên men của vi khuẩn lactic ở 37°C:

Kết quả trong bảng 3 cho thấy, hàm lượng acid tổng sinh ra sau lên men của 16 chủng tuyển chọn và chủng đối chứng đạt từ 6,0 đến 14,1 g/l với hiệu suất lên men theo khối lượng nguyên liệu từ 0,31 đến 0,73 g acid/g glucose. Hiệu suất theo số mol chuyển hoá đạt từ 30,30 đến 71,21%. Trong đó, 7 chủng (L7, L9, L11, L21, L26, L30 và L37) sinh acid lactic cao hơn các chủng còn lại, trong khoảng 9,9-14,1 g/l.

Bảng 3: kết quả lên men acid lactic của 17 chủng vi khuẩn ở 37°C

Chủng LAB	Hàm lượng acid (g/l)	pH sau lên men	Glucose còn lại (g/l)	Hiệu suất (g acid/ g glucose)	Hiệu suất (%)
L2	9,3 ^{defg}	4,14	0,48	0,48	46,97
L6	6,0 ^h	4,23	0,92	0,31	30,30
L7	12,3 ^{abc}	3,86	0,75	0,64	62,12
L9	12,9 ^{ab}	3,84	1,14	0,68	65,15
L10	7,2 ^{gh}	4,17	1,28	0,38	36,36
L11	14,1 ^a	3,75	0,68	0,73	71,21
L20	7,2 ^{gh}	4,19	0,68	0,37	36,36
L21	11,4 ^{abcde}	3,88	0,54	0,59	57,58
L26	9,9 ^{bcdef}	4,01	0,81	0,52	50,00
L27	8,4 ^{cgh}	5,40	0,62	0,43	42,42
L30	12,6 ^{ab}	3,83	0,51	0,65	63,64
L36	9,0 ^{defgh}	4,11	0,90	0,47	45,45
L37	10,8 ^{bcd}	4,03	0,39	0,55	54,55
L38	6,3 ^{gh}	4,29	0,82	0,33	31,82
L52	8,7 ^{cgh}	4,14	0,95	0,46	43,94
L54	7,2 ^{gh}	4,19	1,03	0,38	36,36
ĐC (+)	12,0 ^{abcd}	5,28	0,81	0,63	60,61

CV = 18,9%

Khả năng lên men của vi khuẩn lactic ở 39°C và 41°C:

Theo bảng 4, khả năng chuyển hoá sinh acid lactic ở 39°C của 7 chủng đạt từ 9,00 đến 18,90 g/l với hiệu suất theo khối lượng cơ chất từ 0,49 đến 1,01 g acid/g glucose, hiệu suất theo số mol từ 45,45 đến 95,45%. Khả năng chuyển hoá sinh acid lactic ở 41°C đạt từ 9,00 đến 18,00 g/l với hiệu suất theo khối lượng cơ chất từ 0,46 đến 0,95 g acid/g glucose, hiệu suất theo số mol từ 45,45 đến 90,91%.

Bảng 4: kết quả lên men acid lactic của 7 chủng vi khuẩn ở 39 và 41°C

Chủng LAB	Nhiệt độ lên men (°C)	Hàm lượng acid (g/l)	pH sau lên men	Glucose còn lại (g/l)	Hiệu suất (g acid/g glucose)	Hiệu suất (%)
L7	39	17,70 ^{ab}	3,89	0,61	0,91	89,93
L7	41	18,00 ^{ab}	3,90	1,09	0,95	90,91
L9	39	18,90 ^a	3,88	1,30	1,01	95,45
L9	41	18,00 ^{ab}	3,87	0,69	0,93	90,91
L11	39	18,30 ^{ab}	3,89	1,52	0,98	92,42
L11	41	17,40 ^{ab}	3,90	0,39	0,88	87,88
L21	39	13,50 ^c	4,04	1,55	0,73	68,18
L21	41	16,80 ^b	3,92	0,73	0,87	84,85
L26	39	13,20 ^c	3,92	0,74	0,68	66,67
L26	41	17,10 ^{ab}	3,93	0,40	0,68	66,67
L30	39	16,80 ^b	3,91	0,17	0,84	84,85
L30	41	17,10 ^{ab}	3,93	0,76	0,88	86,36
L37	39	9,00 ^d	4,42	1,63	0,49	45,45
L37	41	9,00 ^d	4,40	0,68	0,46	45,45
ĐC (+)	39	9,90 ^d	4,39	0,94	0,52	50,00
ĐC (+)	41	9,60 ^d	4,39	0,92	0,51	48,48

CV = 8,25%

Điều kiện lên men thích hợp để sản xuất acid lactic:

Chủng *L. casei* L9 được tuyển chọn dựa trên hàm lượng acid lactic sinh ra ở 39°C và 41°C, hiệu suất

chuyển hoá theo cơ chất và số mol là cao nhất, khảo sát điều kiện lên men thích hợp ở 39°C với 3 nhân tố, 3 nồng độ: glucose (4, 5 và 6% w/v), pH môi trường ban đầu (5,0; 6,0 và 7,0) và nồng độ giống chủng (1, 2 và 3% v/v). Kết quả được ghi nhận ở bảng 5.

Bảng 5: kết quả lên men acid lactic ở 39°C trong thử nghiệm điều kiện lên men thích hợp

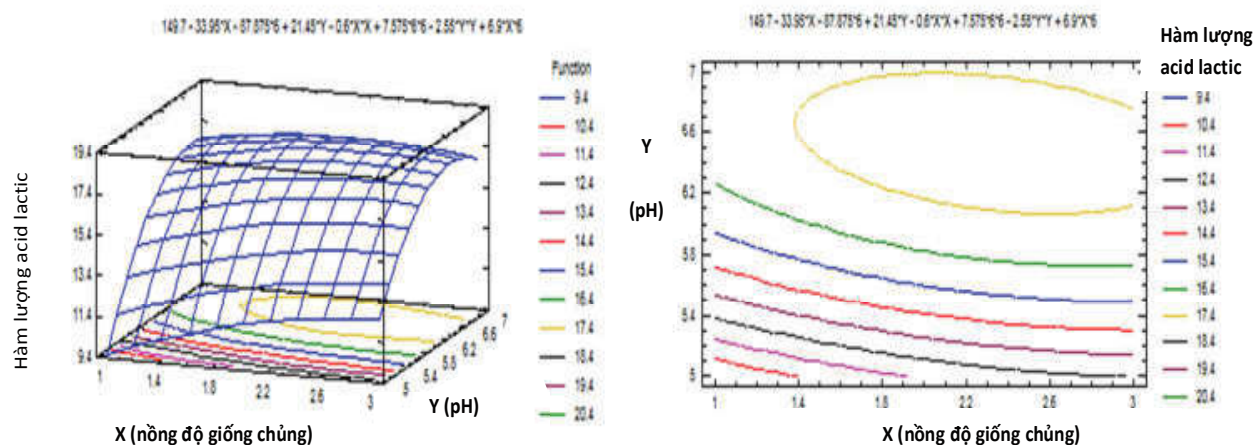
%Glucose - pH - %Giống chủng	Hàm lượng acid lactic (g/l)	Hiệu suất (g acid/g cơ chất)	Hiệu suất (%)	%Glucose - pH - %Giống chủng	Hàm lượng acid lactic (g/l)	Hiệu suất (g acid/g cơ chất)	Hiệu suất (%)
4 - 5 - 1	10,80 ^h	0,549	39,96	5 - 6 - 3	13,50 ^f	0,330	43,09
4 - 5 - 2	12,60 ^{fg}	0,648	43,20	5 - 7 - 1	6,30 ^k	0,190	22,17
4 - 5 - 3	16,20 ^{de}	0,669	52,37	5 - 7 - 2	10,80 ^h	0,330	39,62
4 - 6 - 1	18,90 ^b	0,943	80,83	5 - 7 - 3	15,30 ^e	0,380	44,56
4 - 6 - 2	23,85 ^a	0,830	79,93	6 - 5 - 1	8,10 ^j	0,230	20,74
4 - 6 - 3	23,40 ^a	0,865	78,87	6 - 5 - 2	11,70 ^{gh}	0,289	27,80
4 - 7 - 1	16,20 ^{de}	0,479	57,49	6 - 5 - 3	10,80 ^h	0,248	25,92
4 - 7 - 2	24,30 ^a	0,470	72,57	6 - 6 - 1	17,10 ^{cd}	0,411	45,93
4 - 7 - 3	23,60 ^a	0,474	63,79	6 - 6 - 2	16,20 ^{de}	0,423	46,19
5 - 5 - 1	4,50 ⁱ	0,136	16,96	6 - 6 - 3	16,20 ^{de}	0,362	40,75
5 - 5 - 2	7,20 ^{jk}	0,227	22,68	6 - 7 - 1	18,00 ^{bc}	0,495	47,17
5 - 5 - 3	10,80 ^h	0,243	29,14	6 - 7 - 2	18,00 ^{bc}	0,409	46,72
5 - 6 - 1	7,20 ^{jk}	0,267	30,53	6 - 7 - 3	18,00 ^{bc}	0,503	47,88
5 - 6 - 2	11,70 ^{gh}	0,372	40,31				

CV = 4,85%

Đồ thị mặt đáp ứng (surface plotting) và đồ thị đường mức (contour) (hình 2) cổ định hàm lượng glucose bằng 6%, nồng độ giống chủng là X (1-3% v/v) và pH là Y (5-7). Phương trình hồi quy nhiều biến: Hàm lượng acid lactic = $149,7 - 33,95 \cdot X - 87,875 \cdot 6 + 21,45 \cdot Y - 0,6 \cdot X \cdot X + 7,575 \cdot 6 \cdot 6 - 2,55 \cdot Y \cdot Y + 6,9 \cdot X \cdot 6 + 8,0625 \cdot X \cdot Y + 2,25 \cdot 6 \cdot Y - 1,4625 \cdot X \cdot 6 \cdot Y$.

Lên men acid lactic trong bình lên men 1 l:

Áp dụng điều kiện lên men thích hợp đã được xác định, tiến hành thử nghiệm lên men acid lactic ở quy mô 1 l trong môi trường MRS hiệu chỉnh pH 6,53, nồng độ glucose là 6% (w/v), nồng độ giống chủng ở 10^7 tế bào/ml là 2,33% (v/v).



Hình 2: đồ thị mặt đáp ứng và đường mức của hàm lượng acid lactic với hàm lượng glucose = 6% (w/v), nồng độ giống chủng (X = 1-3% v/v) và pH (Y = 5,0-7,0)

Bảng 6: kết quả lên men acid lactic trong quy mô 1 l

Mẫu	Nồng độ glucose ban đầu (g/l)	Nồng độ glucose sau lên men (g/l)	Hàm lượng acid (g/l)	Hiệu suất % (số mol)
L9	60	7,66	20,70	79,09
L9-2	60	7,69	21,60	82,58
Trung bình	60	7,68	21,15	80,84

Kết quả lên men cho thấy hiệu suất lên men acid đạt 80,84%, được tính bằng đối chiếu phần trăm số mol acid sinh ra từ 1 mol glucose theo lý thuyết so với số mol acid sinh ra từ glucose thực tế.

Thảo luận

Trong quá trình lên men ở 37°C đa số các chủng vi khuẩn lactic đều có hàm lượng acid tổng cao nhất ở ngày lên men thứ 7. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Hernandez và cộng sự (2005) [14], hàm lượng acid trong thí nghiệm lên men đường sucrose của vi khuẩn lactic đạt tốt nhất ở ngày thứ 7. Bảng 1 cho thấy, chủng L6 và L30 cho hàm lượng acid tổng cao nhất (1,65 g/l), khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% so với các chủng còn lại. Bên cạnh đó, 16 chủng được chọn đều có khả năng sinh acid tốt hơn chủng đối chứng *L. thermotolerans* (0,53 g/l và 0,60 g/l ở ngày 6 và ngày 7).

Kết quả giải trình tự và xây dựng cây phân loại di truyền cho thấy, tất cả các chủng vi khuẩn đều thuộc chi *Lactobacillus* cho hình thái dạng hình que, catalase âm tính và oxidase âm tính. Kết quả này phù hợp với kết quả khảo sát đặc tính sinh hoá tế bào. L2 và L11 có sự tương đồng với *L. delbrueckii* và *L. acidophilus* [15], hai chủng vi khuẩn có nhiều ứng dụng trong lên men thực phẩm như sữa chua với khả năng tạo acid lactic ổn định và an toàn với hiệu suất cao, phù hợp với hàm lượng acid sinh ra khi lên men ở 37°C (bảng 1). Có 9/16 chủng vi khuẩn (L7, L21, L26, L27, L30, L36, L37, L52 và L54) tương đồng với *L. plantarum*. Trình tự chủng L9 tương đồng với *L. casei* và L54 tương đồng với *L. plantarum* là hai loài vi khuẩn có phẩm chất lên men acid lactic tốt được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp [16]. Ngoài ra, cây phân loại di truyền cho thấy, các loài vi khuẩn có trình tự tương đồng cùng loài nằm cùng nhánh với nhau và với chủng vi khuẩn đối chứng với chỉ số Bootstrap từ 69-100%.

Khi thử nghiệm lên men acid lactic với 16 chủng vi khuẩn trong môi trường MRS ở 37°C, 7 chủng L7, L9, L11, L21, L26, L30 và L37 sinh acid lactic cao hơn các

chủng còn lại, trong khoảng 9,9-14,1 (g/l) và cao hơn chủng vi khuẩn đối chứng *L. thermotolerans* (12,0 g/l). Khi so sánh kết quả lên men sử dụng môi trường chỉ bổ sung sucrose thì hiệu quả lên men acid lactic ở môi trường MRS tốt hơn, điều này có thể giải thích là bởi phần lớn các loài vi khuẩn lactic đều có nhu cầu dinh dưỡng phức tạp, môi trường dinh dưỡng cần bổ sung các loại amino acid cũng như các khoáng vi lượng để hoạt động chuyển hóa đạt tối ưu [17]. Thử nghiệm lên men ở 39°C và 41°C, kết quả cho thấy chủng *L. casei* L9 khi lên men ở 39°C sinh ra acid lactic cao nhất (18,9 g/l) với hiệu suất chuyển hóa đường glucose thành acid lactic là 95,45% theo số mol. Đáng chú ý, bảng 4 cho thấy hầu hết các chủng lactic (ngoại trừ L9 và L11) đều sinh acid lactic cao hơn ở 41°C, cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến khả năng phát triển của vi khuẩn và lượng acid lactic sinh ra.

Ở nhiệt độ cao hơn, vi khuẩn lactic sinh trưởng nhanh hơn (thời gian để vi khuẩn bắt đầu và kết thúc pha lũy thừa trong đường cong sinh trưởng được rút ngắn) cũng như tốc độ chuyển hóa của tế bào vi khuẩn diễn ra mạnh hơn so với ở nhiệt độ thấp nên thời gian để lượng acid lactic sinh ra đạt tối đa được rút ngắn. Kết quả khảo sát điều kiện lên men thích hợp để sản xuất acid lactic từ chủng *L. casei* L9 cho thấy điều kiện thích hợp cho lên men sinh acid lactic được xác định là ở pH 6,53; nồng độ giống chủng là 2,33% (v/v) và nồng độ glucose bổ sung là 6% (w/v). Giá trị pH ban đầu tối ưu cho chủng L9 (*L. casei*) được xác định là 6,53, tương ứng với kết luận trong nghiên cứu của Yoo và cộng sự (1996) [18] về pH thích hợp cho khả năng phát triển tế bào và sinh acid lactic của *L. casei* là trong khoảng 6,0-6,5. Tương tự, Panesar và cộng sự (2010) [19] cũng kết luận, pH 6,5 là tốt nhất cho chuyển hóa lactose và sinh acid lactic ở *L. casei*. Ứng dụng kết quả điều kiện thích hợp, quá trình lên men ở quy mô 1 l cho kết quả hiệu suất lên men đạt 80,84% (w/v) ở mức tương đương so với nghiệm thức cho hiệu suất cao nhất 4-6-1 (80,83%) lên men trong thí nghiệm lên men thích hợp hoá 3 nhân tố ở điều kiện lên men sản xuất acid lactic. Theo Ramesh (2011) [20], quá trình lên men acid lactic quy mô càng lớn càng gặp nhiều khó khăn do hệ thống lên men càng lớn càng đòi hỏi các thiết bị kiểm soát nghiêm ngặt và ổn định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men như nhiệt độ, áp suất... Quá trình lên men acid lactic trong thí nghiệm này đạt hiệu suất lên men gần tương đương so với nghiệm thức lên men tốt nhất ở quy mô 100 ml

(80,84%) cho thấy chủng vi khuẩn được tuyển chọn vẫn duy trì khả năng lên men khi tăng quy mô lên 1 l.

Kết luận

Mười sáu chủng vi khuẩn lactic được tuyển chọn do thể hiện hoạt tính lên men tốt nhất trong 7 ngày và sinh hàm lượng acid cao nhất đạt 1,65 g/l. Các chủng này thuộc các loài *L. delbrueckii* (L2 và L6), *L. casei* (L9 và L10), *L. acidophilus* (L11), *L. fermentum* (L20), *L. rhamnosus* (L38) và *L. plantarum* (L7, L21, L26, L27, L30, L36, L37, L52 và L54). Chủng L9 (*L. casei*) cho thấy khả năng lên men acid lactic tốt ở 37°C (12,9 g/l), 39°C (18,9 g/l) và 41°C (18,0 g/l) và lên men quy mô 1 l cao nhất đạt hiệu suất 80,84% ở pH 6,53; nồng độ giống chủng là 2,33% (v/v) và nồng độ glucose bổ sung là 6% (w/v).

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ Nghị định thư của Bộ Khoa học và Công nghệ (09/2014/HĐ-NDT) và một phần hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu khoa học trong Chương trình Công nghệ sinh học tiên tiến của Trường Đại học Cần Thơ. Chân thành cảm ơn Đại học Kyushu (Nhật Bản) trong hướng dẫn và hỗ trợ định danh vi khuẩn lactic thông qua Chương trình CCP (New Core to Core Program).

Tài liệu tham khảo

- [1] A. Lars and A. Siv (2000), "Lactic acid bacteria", *Applied Microbial Systematics*, pp.367-388.
- [2] M.E. Stiles and W.H. Holzapfel (1997), "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy", *Int J Food Microbiol*, **36**, pp.1-29.
- [3] R. Biswas (2005), *Lactic acid production from food processing wastes*, Tharpar University, BY3030118, India.
- [4] Nguyễn Thị Thanh Hà (2012), *Nghiên cứu quá trình lên men acid lactic từ lõi ngô*, Luận văn thạc sỹ ngành công nghệ thực phẩm và đồ uống, Đại học Đà Nẵng, trang 23-24.
- [5] Phan Thanh Phong (2006), *Sản xuất bột vi khuẩn lactic*, Luận văn thạc sỹ ngành công nghệ sinh học, Viện Nghiên cứu và Phát triển công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- [6] J.D. De Man, M. Rogosa and M.E. Sharpe (1960), "A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*", *Journal of Applied*

Bacteriology, **23**, pp.130-135.

- [7] W.G. William, M.B. Susan, A.P. Dale and J.L. David (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, **173**, pp.697-703.
- [8] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Meyers and D.J. Lipman (1990), "Basic local alignment search tool", *Journal of Molecular Biology*, **215**, pp.403-410.
- [9] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013), "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729.
- [10] N. Saitou and M. Nei (1987), "The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees", *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4), pp.406-425.
- [11] B. Efron, E. Halloran and S. Holmes (1996), "Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**(23), pp.13429.
- [12] D.C. Harris (2007), "Quantitative Chemical Analysis", *Freeman and Company*, **7**, pp. 180-199.
- [13] C. Bennett (1971), "Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol", *The American Journal of Medical Technology*, **37**(6), pp.217.
- [14] D. Hernandez, E. Cardell and V. Zarate (2005), "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711", *Journal Applied Microbiology*, **99**, pp.77-84.
- [15] M.S. Robert and W.C. Frazier (1941), *Physiological characteristics of lactic acid bacteria near the maximum growth temperature*, Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin, pp.479-450.
- [16] K.J. Heller (2001), "Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms", *The American Journal of Clinical Nutrition*, **73**, pp. 374S-379S.
- [17] Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền và Phạm Văn Ty (1997), *Vi sinh vật học*, Nhà xuất bản Giáo dục, trang 83.
- [18] I.K. Yoo, H.N. Chang, L.E. Gyo, C.Y. Keun and M.S. Hyeon (1996), "Effect of pH on the Production of Lactic Acid and Secondary Products in Batch Cultures of *Lactobacillus casei*", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **6**(6), pp.482-486.
- [19] P.S. Panesar, F.K. Johb, J.K. Charles and K. Maria (2010), "Production of L(+)lactic acid using *Lactobacillus casei* from Whey", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **53**(1), pp.219-226.
- [20] C.C. Ramesh and A. Kilara (2011), *Dairy Ingredients for Food Processing*, Wiley-Blackwell.