

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/325100329>

Study on fermentation conditions for *Bacillus subtilis* KP3 spores production

Article · May 2018

CITATIONS

0

READS

2,233

5 authors, including:



Thao Thanh Vu

Ho Chi Minh City Medicine and Pharmacy University

8 PUBLICATIONS 5 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Trinh Phan-Canh

Max Perutz Labs Vienna

10 PUBLICATIONS 16 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Dong Cat Tran

Ho Chi Minh City Medicine and Pharmacy University

16 PUBLICATIONS 102 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated from Hospital of Dermatovenereology in Ho Chi Minh city to ketoconazole and terbinafine [View project](#)



Tropical lichen and lichen-associated microbes [View project](#)

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY THU NHẬN BÀO TỬ BACILLUS SUBTILIS KP3

Vũ Thanh Thảo, Phan Cảnh Trình*, Nguyễn Thị Linh Giang*, Lê Văn Thanh**, Trần Cát Đông**

TÓM TẮT

Mở đầu: *Bacillus subtilis* KP3 sản xuất chất chống oxy hóa và có các đặc tính probiotic có lợi được phân lập bởi Phòng thí nghiệm Vi sinh công nghệ Dược, tuy nhiên điều kiện lên men của chủng vi khuẩn này để tạo ra một lượng lớn bào tử chưa được nghiên cứu.

Mục tiêu: Điều kiện lên men của *B. subtilis* KP3 được nghiên cứu trên bình nón và trên nồi lên men.

Phương pháp: Môi trường lên men trên bình nón được tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Sau đó, khoáng được bổ sung vào môi trường thích hợp vào các thời điểm khác nhau để cảm ứng *B. subtilis* KP3 tạo bào tử. Ngoài ra, tỉ lệ truyền chủng, pO_2 , tốc độ khuấy và các thông số của lên men mẻ bổ sung cơ chất được khảo sát trên nồi lên men để tăng lượng bào tử tạo ra.

Kết quả: Môi trường thích hợp để sản xuất sinh khối của *B. subtilis* KP3 trên bình nón là glucose 10 g/l, đậu không đậu 19,75 g/l, amoni citrat 1,7g/l, mật rỉ 7,2 g/l, pepton từ thịt 11,13 g/l, $MnCl_2$ 16,58 mM (1 ml/l), K_2HPO_4 4,58 g/l, $CaCl_2$ 0,01 g/l, NaCl 4,04 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 μM (1ml/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,38 g/l, sau 8 giờ bổ sung $CaCl_2$ 0,5 g/l và $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 35 μM (1 ml/l) để kích thích tạo bào tử với lượng bào tử tăng lên 3 lần so với môi trường đối chứng. Đối với lên men mẻ, điều kiện nuôi cấy thích hợp là pO_2 50%, tốc độ khuấy 400 vòng/phút, tỉ lệ cấy truyền 5%. Trong lên men mẻ - bổ sung cơ chất mật rỉ bổ sung với tốc độ 58 ml/giờ, trong vòng 8 giờ; bào tử được thu hoạch sau 32 giờ nuôi cấy, đạt mật độ $4,46 \cdot 10^9$ bào tử/ml, tăng 2,3 lần so với lên men trên bình nón.

Kết luận: Điều kiện lên men của *B. subtilis* KP3 trên bình nón và nồi lên men đã được xác định nhằm tạo ra một lượng lớn bào tử để ứng dụng làm probiotic.

Từ khóa: *Bacillus*, lên men mẻ bổ sung cơ chất, bào tử

ABSTRACT

STUDY ON FERMENTATION CONDITIONS FOR BACILLUS SUBTILIS KP3 SPORES PRODUCTION.

Vu Thanh Thao, Phan Canh Trinh, Nguyen Thi Linh Giang, Le Van Thanh, Tran Cat Dong

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Supplement Vol. 22 - No 1- 2018: 453 - 459

Background: *Bacillus subtilis* KP3 which produces antioxidants and has good probiotic characteristics, was isolated by Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, but fermentation conditions of this strain have not been studied for producing large number of *B. subtilis* KP3 spores.

Objectives: Fermentation conditions of *B. subtilis* KP3 on flask and fermenter were investigated.

Methods: The fermentation medium on flask were optimized using response surface methodology for *B. subtilis* KP3 biomass production. Then, the minerals were supplemented to optimal culture medium at different time to induce sporulation of *B. subtilis* KP3. Moreover, stirring speed, pO_2 , inoculation rate and data for fed-batch fermentation were surveyed in fermenter in order to increase the density of spores.

Results: The appropriate medium for producing *B. subtilis* KP3 biomass consisted of glucose 10 g/l, non-oil soybean 19,75 g/l, ammonium citrate 1,7g/l, molasses 7,2 g/l, pepton from meat 11,13 g/l, $MnCl_2$ 16,58 mM (1

*Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh **Bệnh viện Chợ Rẫy

Tác giả liên lạc: TS. Vũ Thanh Thảo ĐT: 0985353384 Email: vuthanhthao@ump.edu.vn

ml/l), K_2HPO_4 4,58 g/l, $CaCl_2$ 0,01 g/l, $NaCl$ 4,04 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 μM (1ml/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,38 g/l, after 8 hours of fermentation, $CaCl_2$ 0,5 g/l and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 35 μM (1 ml/l) were supplemented to the medium to stimulate spore production, and spore yields increased by 3 times compared with control medium. In batch experiment, suitable culturing conditions were 50% of pO_2 , 400 rpm of stirring speed and 5% of inoculation rate. In fed-batch experiment, molasses was added to the speed 58 ml/hour, for 8 hours. Spores were harvested after 32 hours of incubation, reaching densities $4,46 \cdot 10^9$ spores/ml, up 2.3 times compared to fermentation flask.

Conclusions: The fermentation conditions of *Bacillus subtilis* KP3 spores on flask and fermenter have been identified to produce large amounts of spores for application as probiotic.

Key words: *Bacillus*, fed-batch, spore

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, các chủng *Bacillus* là đối tượng hàng đầu được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu để sản xuất probiotic với các ưu điểm như sản sinh một số loại enzym ngoại bào và tạo bào tử bền với nhiệt rất thuận lợi trong quá trình chế biến, bảo quản và sử dụng(8,19). Khi tiến hành sản xuất probiotic, nếu áp dụng các phương pháp nuôi cấy thông thường sẽ tốn kém về chi phí nguyên vật liệu, thiết bị, diện tích, không đạt hiệu quả kinh tế cao. Lên men chìm được áp dụng chủ yếu trong công nghiệp nhờ khả năng kiểm soát các thông số dễ dàng(13). Do đó, đây là phương pháp được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu, sản xuất nguyên liệu probiotic. Thành phần môi trường và các điều kiện lên men là các yếu tố cần tối ưu hóa giúp thu được lượng sinh khối cao(15). Monterio (2005)(10) đã tiến hành tối ưu hóa lên men theo mẻ làm tăng mật độ bào *Bacillus* từ $2,6 \cdot 10^9$ lên $2,2 \cdot 10^{10}$ CFU/ml, tăng mật độ bào tử từ $4,2 \cdot 10^8$ lên $5,6 \cdot 10^9$ bào tử/ml. Sau đó, nhóm tác giả đã tiếp tục lên men bổ sung cơ chất (fed-batch) để nâng lượng bào tử lên đến $7,4 \cdot 10^9$. Nghiên cứu này làm tăng hiệu quả kinh tế lên đến 17,6 lần khi lên men so với các thành phần và điều kiện trước khi tối ưu(10). Một nghiên cứu mới đây của cùng nhóm tác giả trên *Bacillus subtilis* 210, khi sử dụng kỹ thuật lên men fed-batch đã giúp tăng mật độ bào tử lên 5,7 lần so với lên men theo mẻ(11). Taveres (2013)(16) lên men *Bacillus subtilis* 1012 trên môi trường F đạt mật độ $7 \cdot 10^9$ bào tử/ml. Với xu hướng nghiên cứu trên, Phòng Thí nghiệm Vi sinh Công nghệ Dược đã phân lập được chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* KP3 có các

đặc tính probiotic có lợi, an toàn trong các thử nghiệm độc tính(17,18). Tuy nhiên, để thu được sinh khối lớn nhằm ứng dụng làm probiotic, nghiên cứu thực hiện việc khảo sát môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp để thu nhận bào tử *Bacillus subtilis* KP3.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi khuẩn

Chủng *Bacillus subtilis* KP3 phân lập từ mẫu đất ở Krongpa, Gia Lai, đây là chủng vi khuẩn đã được chứng minh có các đặc điểm probiotic có lợi, được cung cấp bởi PTN Vi sinh Công nghệ Dược(17,18).

Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng chính đến việc tạo sinh khối của *B. subtilis* KP3 trên ma trận Plackett-Burman.

Sàng lọc 11 yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối gồm có nguồn carbon, nito, các khoáng chất với mức cao (+1) và mức thấp (-1). Tổng số thí nghiệm là 12, được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman.

Bảng 1: Các yếu tố và nồng độ trong thiết kế Plackett-Burman

Ký hiệu	Tên yếu tố	Giá trị	
		Thấp (-1)	Cao (+1)
X1	Glucose (g/l)	5	15
X2	Mật rỉ (g/l)	5	15
X3	Đậu nành không dầu (g/l)	5	20
X4	Pepton từ thịt (g/l)	2	15
X5	Amoni citrat (g/l)	0,5	2
X6	$MnCl_2$ (mM) - 1ml/l	5	20
X7	K_2HPO_4 (g/l)	2,5	10
X8	$CaCl_2$ (g/l)	0,01	0,5
X9	$NaCl$ (g/l)	1	5
X10	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (mM) - 1ml/l	1	35
X11	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/l)	0,2	1

Khảo sát nồng độ môi trường thích hợp theo phương pháp đáp ứng bề mặt RSM (Response Surface Methodology)

Thử nghiệm được tiến hành nhằm xác định nồng độ của 3 yếu tố có ảnh hưởng chính đến việc tạo sinh khối là mật rỉ, amoni citrat, MnCl₂. Thí nghiệm được tiến hành trên 3 yếu tố với 3 cấp độ theo thiết kế của Box-Benhenken. Tổng cộng là 15 thử nghiệm với 3 thử nghiệm thử nghiệm tại điểm trung tâm để xác định mức độ sai số của mô hình đáp ứng⁽¹²⁾.

Bảng 2: Nồng độ của các yếu tố khảo sát trong thử nghiệm RSM

Yếu tố	Phạm vi nghiên cứu	Mức			
		-1	0	+1	
A	Mật rỉ (g/l)	5 – 15	5	10	15
B	Amoni citrat (g/l)	0,5 – 2	0,5	1,25	2
C	MnCl ₂ (mM)	5 – 20	5	12,5	20

Sau đó sử dụng phần mềm qui hoạch thực nghiệm Design Expert 7.0 (DX 7.0) để tìm ra mô hình thực nghiệm thích hợp. Từ mô hình suy ra được phương trình hồi qui đa thức như sau:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

Với Y: là hàm mục tiêu; β_0 : là hệ số tự do; β_i : là hệ số thể hiện ảnh hưởng tuyến tính của yếu tố i; β_{ij} : là hệ số thể hiện ảnh hưởng tương tác của yếu tố i và yếu tố j; β_{ii} : là hệ số thể hiện ảnh hưởng bậc hai.

Khảo sát thời điểm bổ sung khoáng kích thích tạo bào tử

Khảo sát đường cong tăng trưởng trên môi trường thích hợp với tỉ lệ chúng bổ sung là 1%. Thời điểm bổ sung chúng là t_0 . Xác định mật độ tế bào sau mỗi giờ bắt đầu từ t_0 , cho đến khi mật độ tế bào giảm sau hai mốc đếm liên tiếp. Vẽ đường cong tăng trưởng log [số lượng tế bào] theo thời gian và xác định thời điểm: chuyển từ pha lag sang pha log; giữa pha log; kết thúc pha log, chuyển sang pha ổn định; giữa pha ổn định. Tại các mốc thời điểm lựa chọn, khoáng được bổ sung để kích thích tạo bào tử, xác định số lượng bào tử bằng phương pháp đếm sống⁽¹⁴⁾.

Khảo sát thông số lên men trên nồi lên men 10 lít

Các thông số lên men được khảo sát trên nồi lên men 10 L Biostat B Plus, Sartorius. Các thông số lên men thích hợp đối với chủng vi khuẩn thử nghiệm được khảo sát gồm: tỷ lệ cấy truyền: 1, 5, 10% tổng thể tích môi trường lên men, tốc độ khuấy: 250, 400, 600 vòng/phút, lượng oxy cung cấp: 50, 75, 100%. Chủng vi khuẩn được bổ sung vào 5 lít môi trường thích hợp. Lấy 5 ml mẫu sau mỗi 2 giờ kể từ 18 giờ (từ khi bắt đầu lên men) để xác định thời điểm tạo bào tử cao nhất. Đếm sống để tính số lượng bào tử và phần trăm tạo bào tử.

Khảo sát quá trình lên men mẻ - bổ sung cơ chất (lên men fed-batch)

Các thông số của quá trình lên men fed-batch được tính toán từ thí nghiệm lên men mẻ theo các công thức sau:

$$(\ln x_t - \ln x_0) = \mu(t-t_0); Y_{x/s} = dX/dS$$

$$F(t) = \frac{\mu}{Y_{x/s}} (XV/S_{feed}) e^{\mu(t-t_0)}$$

x_t, x_0 : lượng sinh khối tại thời điểm t (g/l), ban đầu t_0 (g/l), μ tốc độ tăng trưởng (1/giờ), $Y_{x/s}$: hiệu suất chuyển đổi cơ chất thành sinh khối (g/g), F(t): tốc độ bổ sung cơ chất (ml/giờ), X: lượng sinh khối trước khi bổ sung cơ chất (g/l), V: thể tích lên men (L)⁽⁹⁾.

Thí nghiệm lên men fed-batch được thiết kế với các thông số thích hợp đã được khảo sát ở lên men mẻ. Cơ chất được bổ sung thông qua bơm nhu động có kiểm soát tốc độ dòng chảy. Thời điểm bổ sung cơ chất vào giữa pha log được xác định bằng cách theo dõi pH (khi pH tăng trở lại). Thời điểm ngừng bổ sung cơ chất được quyết định thông qua tốc độ tăng trưởng (xác định mật độ tế bào vi khuẩn trên buồng đếm) và hàm lượng glucose xác định thông qua phương pháp đường khử và độ brix trong môi trường.

Xử lý số liệu

Các số liệu trong nghiên cứu đều được thể hiện dưới dạng số trung bình ± SEM. Thí nghiệm tối ưu hoá môi trường theo ma trận Plackett-Burman và phương pháp đáp ứng bề mặt được xử lý bằng phần mềm Design Expert® 7.0.0. Đồ thị được vẽ bằng phần mềm Graphpad Prism 6.

KẾT QUẢ

Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối *B. subtilis* KP3 theo Plackett-Burman

Bảng 3: Mật độ tế bào của *B. subtilis* KP3 trong các thí nghiệm theo mô hình Plackett-Burman

Thí nghiệm	Mật độ tế bào (x10 ⁸ CFU/ml)	Thí nghiệm	Mật độ tế bào (x10 ⁸ CFU/ml)
1	16,80	7	8,87
2	18,18	8	11,85
3	12,44	9	10,84
4	16,22	10	13,75
5	16,44	11	13,67
6	10,69	12	11,71

Thí nghiệm được thiết kế mô hình theo Plackett-Burman với 11 yếu tố trong 12 thí nghiệm. Kết quả giá trị p của mô hình sinh khối là 0,0448, chứng tỏ mô hình có ý nghĩa thống kê. Các yếu tố mật rỉ, amoni citrat, MnCl₂ có giá trị p<0,05, ảnh hưởng có ý nghĩa giá trị thống kê đến việc tạo sinh khối. Các yếu tố còn lại có giá trị p>0,05 nên không có ý nghĩa thống kê. Do đó, 3 yếu tố có ý nghĩa thống kê được lựa chọn là mật rỉ, amoni citrat, MnCl₂ để tiếp tục khảo sát nồng độ thích hợp theo mô hình RSM, các yếu tố còn lại được cố định dựa vào dự đoán lượng sinh khối cao nhất của mô hình Plackett-Burman gồm: glucose 10 g/l, đậu không dầu 19,75 g/l, pepton từ thịt 11,13 g/l, K₂HPO₄ 4,58 g/l, CaCl₂ 0,01 g/l, NaCl 4,04 g/l, FeSO₄.7H₂O 1 µM (1ml/l), MgSO₄.7H₂O 0,38 g/l.

Khảo sát nồng độ môi trường thích hợp theo phương pháp đáp ứng bề mặt RSM

Bảng 4: Mật độ tế bào của *B. subtilis* KP3 theo RSM

TN	Tế bào (x10 ⁸ CFU/ml)	TN	Tế bào (x10 ⁸ CFU/ml)
1	17,83	9	8,05
2	6,84	10	14,65
3	10,50	11	10,99
4	14,90	12	9,52
5	15,62	13	21,00
6	16,85	14	18,07
7	16,12	15	18,07
8	14,65		

Kết quả khảo sát trên các môi trường theo mô hình RSM thu được mật độ của *B. subtilis* KP3 từ 8,05.10⁸ CFU/ml - 21,00.10⁸ CFU/ml. Các dữ liệu về sinh khối phù hợp với mô hình bậc 2 (Quadratic model) với hệ số tương quan của mô hình sinh khối là 0,9452. Dữ liệu phân tích thống kê tính toán được giá trị p của mô hình sinh khối là 0,0114 chứng tỏ mô hình có ý nghĩa thống kê. Các yếu tố B²-amoni citrat, C²-MnCl₂ và sự phối hợp giữa mật rỉ và amoni citrat ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê với giá trị p<0,05, các yếu tố còn lại ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê. Phương trình hồi quy về lượng sinh khối của *B. subtilis* KP3 thu được:

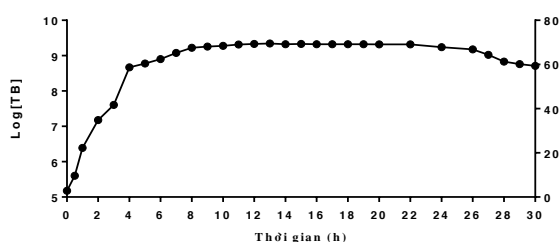
$$\text{Sinh khối (x10⁸ CFU/ml)} = -5,64 + 0,49 \cdot A \cdot B - 5,49 \cdot B^2 - 0,023 \cdot C^2$$

Với hàm mục tiêu là sinh khối cực đại, phần mềm dự đoán các thông số thích hợp của môi trường là: mật rỉ 7,2 g/l; amoni citrat 1,7 g/l và MnCl₂ là 16,58 mM (bổ sung 1ml/l) với mật độ tế bào 1,96.10⁹ CFU/ml. Kết quả đánh giá sự phù hợp của các thông số theo mô hình với thực nghiệm cho thấy độ tương thích là 99,49%.

Khảo sát thời điểm bổ sung khoáng kích thích tạo bào tử

Với thành phần công thức môi trường thích hợp, tiến hành khảo sát sự đường cong tăng trưởng của *B. subtilis* KP3 trong 30 giờ. Đường cong tăng trưởng có các pha như sau: pha lũy thừa từ 1 đến 7 giờ, pha ổn định từ 8 giờ đến 26 giờ, pha suy vong sau 26 giờ.

Các mốc thời điểm bổ sung khoáng được xác định từ đường cong tăng trưởng như sau: 1 giờ (đầu pha lũy thừa), 4 giờ (giữa pha lũy thừa), 8 giờ (bắt đầu pha ổn định), 12 giờ (giữa pha ổn định) với 2 khoáng bổ sung giúp kích thích tạo bào tử là FeSO₄.7H₂O (1ml/l) 35 μM và CaCl₂ 0,5 g/l.



Hình 1: Đường cong tăng trưởng của KP3 trên môi trường thích hợp

Bảng 5: Thời điểm bổ sung khoáng ảnh hưởng đến tỉ lệ tạo bào tử

Thời điểm bổ sung khoáng (giờ)	Khảo sát sau 48 giờ		
	Tổng tế bào*	Bào tử*	Tỉ lệ bào tử (%)
1	2,21±0,12	0,73±0,03	33
4	2,14±0,08	1,04±0,05	49
8	2,24±0,05	2,22±0,06	99
12	2,25±0,07	2,18±0,07	97
Đối chứng	2,21±0,11	0,74±0,04	35

Ghi chú: *: x10⁹ CFU/ml. Đối chứng: môi trường thích hợp không bổ sung khoáng kích thích tạo bào tử.

Các ion kim loại trong môi trường là thành phần cần thiết tạo ra điều kiện stress để giúp vi khuẩn tạo bào tử. Tuy nhiên, trên môi trường thích hợp, tỉ lệ bào tử thu nhận còn khá thấp khoảng 35%. Tỉ lệ tạo bào tử có thể được cải thiện nhờ việc bổ sung thêm các khoáng kích thích tạo bào tử như FeSO₄, CaCl₂, hay MnCl₂ như trong các môi trường có tỉ lệ tạo bào tử cao như DSM hay 2SG (2x Schaeffer's sporulation agar). Kết quả cho thấy việc bổ sung các khoáng kích thích tạo bào tử vào môi trường tối ưu có hiệu quả tốt. Khi bổ sung khoáng kích thích tạo bào tử, mật độ tế bào vẫn ở mức cao, việc bổ sung khoáng không làm giảm mật độ tế bào nhưng có tác dụng

làm tăng mật độ và tỷ lệ bào tử đạt được. Thời điểm bổ sung khoáng lúc 8 giờ giúp tăng mật độ bào tử lên 3 lần. Sau khi tối ưu hoá môi trường nuôi cấy thu sinh khối và bổ sung khoáng kích thích tạo bào tử B. subtilis KP3, công thức nuôi cấy thích hợp cho B. subtilis KP3 như sau: glucose 10 g/l, đậu không đầu 19,75 g/l, amoni citrat 1,7g/l, mật rỉ 7,2 g/l, pepton từ thịt 11,13 g/l, MnCl₂ 16,58 mM (1 ml/l), K₂HPO₄ 4,58 g/l, CaCl₂ 0,01 g/l, NaCl 4,04 g/l, FeSO₄.7H₂O 1 μM (1ml/l), MgSO₄.7H₂O 0,38 g/l, sau 8 giờ bổ sung CaCl₂ 0,5 g/l và FeSO₄.7H₂O 35 μM (1 ml/l).

Khảo sát thông số lên men thu bào tử B. subtilis KP3

Trong 3 tỉ lệ cấy truyền khảo sát là 1%, 5% và 10% trên thể tích môi trường lên men, tỉ lệ cấy truyền 5% có thời gian thu nhận bào tử là 36 giờ mật độ khoảng 14,19x10⁸ bào tử/ml là tỉ lệ cho thời gian thu nhận ngắn nhất và mật độ bào tử cao nhất. Tốc độ khuấy 400 vòng/phút thời gian tạo bào tử của chủng là 32 giờ (14,83x10⁸ bào tử/ml) nhanh hơn so với tốc độ khuấy 250 vòng/phút và 600 vòng/phút. pO₂ 50% cho thời gian thu bào tử nhanh hơn pO₂ 75% và 100% với lượng bào tử thu được là 14,83x10⁸ bào tử/ml. Vậy các thông số thích hợp trên nồi lên men là tỉ lệ cấy truyền 5%, tốc độ khuấy 400 vòng/phút và pO₂ 50% với thời gian nuôi cấy là 32 giờ. Tuy nhiên khi lên men mẻ thì lượng bào tử thu nhận được giảm so với lên men trên bình nón, điều này có thể giải thích do việc sử dụng cơ chất trên nồi lên men nhanh dẫn đến tế bào nhanh chóng chuyển sang pha suy vong trước khi tiến hành tạo bào tử, do đó cơ chất là mật rỉ sẽ được bổ sung gián đoạn để giúp tăng mật độ tế bào và lượng bào tử hình thành.

Khảo sát quá trình lên men mẻ - bổ sung cơ chất

Bảng 6: Thông số lên men mẻ - bổ sung cơ chất

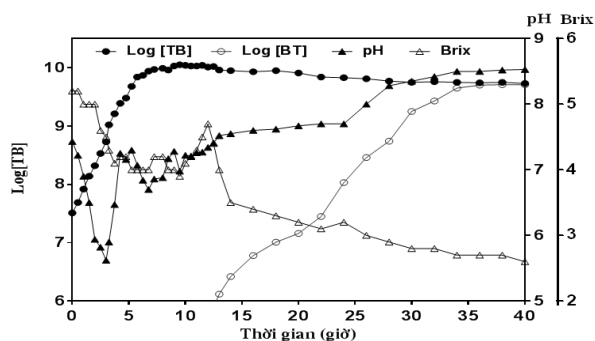
STT	Thông số	Giá trị
1	Tốc độ tăng trưởng cực đại (1/giờ)	0,97 ^a
2	Hiệu suất sử dụng cơ chất (g/g)	0,60 ^a
3	Nồng độ mật rỉ trong dung dịch bổ sung (g/l)	500 ^b
4	Thể tích lên men khởi đầu (L)	3
5	Sinh khối trước giai đoạn bổ sung cơ chất (g/l)	2,1 ^c
6	Tốc độ bổ sung cơ chất F(t) (ml/giờ)	58
7	Thời điểm bổ sung cơ chất	Giờ thứ 3-4

a: giá trị ước đoán dựa vào thí nghiệm lên men theo mẻ,

b: tương ứng nồng độ đường tổng trong dịch bổ sung 200 g/l, c: giá trị sinh khối quy đổi từ mật độ vi khuẩn tại thời điểm trước khi bổ sung cơ chất.

Thí nghiệm lên men mẻ - bổ sung cơ chất nhằm mục tiêu tăng mật độ bào tử bằng việc bổ sung cơ chất mật rỉ với tốc độ bổ sung cơ chất không đổi. Mật rỉ được bổ sung để duy trì cân bằng pH nhờ acid tạo ra trong quá trình oxi hóa carbohydrat.

Thông số cần tính toán trong lên men mẻ - bổ sung cơ chất là tốc độ bổ sung cơ chất F(t). Từ các thông số nêu trên, F(t) tính được là 58 ml/giờ. Đường cong tăng trưởng trong lên men fed-batch có pha log dài 9 giờ, tốc độ tăng trưởng cực đại $\mu_{max} = 0,89$ (1/giờ). Tốc độ sử dụng cơ chất tỉ lệ thuận với tốc độ tăng trưởng (μ). Do đó, khi vi khuẩn giảm tốc độ tăng trưởng, mật rỉ được bổ sung tiếp tục làm tăng nồng độ cơ chất trong môi trường. Đánh giá độ brix, nồng độ glucose và giá trị μ , ngừng bổ sung thêm cơ chất ở giờ thứ 12. Tại thời điểm này, giá trị độ brix là 4,7 cao hơn 0,2; nồng độ glucose là 1,65 g/l cao hơn 0,44 g/l so với thời điểm 11 giờ 30 phút. Mật độ vi khuẩn xác định trên buồng đếm giữa giờ thứ 9 và 12 không có sự khác biệt ($1,02.10^{10}$ - $1,12.10^{10}$ CFU/ml). Trong suốt quá trình bổ sung mật rỉ, pH không tăng quá cao mà ổn định quanh giá trị pH 7.



Hình 2: Diễn biến các thông số của *B. subtilis* KP3 trong lên men fed-batch

BÀN LUẬN

Như vậy, việc bổ sung mật rỉ có vai trò điều chỉnh pH môi trường trong quá trình lên men⁽¹⁵⁾. Thí nghiệm lên men fed-batch duy trì vi khuẩn trong trạng thái pha lũy thừa từ giờ thứ 1-9, đạt mật độ vi khuẩn cực đại $1,12.10^{10}$, mật độ bào tử sau 32 giờ nuôi cấy là $4,46.10^9$ BT/ml tăng lên 2,3 lần so với lên men theo mẻ là $1,96.10^9$ BT/ml.

KẾT LUẬN

Môi trường thích hợp cho sự phát triển của *B. subtilis* KP3 đã được xây dựng theo mô hình Plackett-Burman và RSM là glucose 10 g/l, đậu không đầu 19,75 g/l, amoni citrat 1,7g/l, mật rỉ 7,2 g/l, pepton từ thịt 11,13 g/l, MnCl₂ 16,58 mM (1 ml/l), K₂HPO₄ 4,58 g/l, CaCl₂ 0,01 g/l, NaCl 4,04 g/l, FeSO₄.7H₂O 1 μ M (1ml/l), MgSO₄.7H₂O 0,38 g/l, sau 8 giờ bổ sung CaCl₂ 0,5 g/l và FeSO₄.7H₂O 35 μ M (1 ml/l). Quy trình nuôi cấy trên nồi lên men có bổ sung cơ chất đã được xây dựng, với mật độ bào tử *B. subtilis* KP3 thu nhận là $4,46.10^9$ bào tử/ml tăng lên 2,3 lần so với lên men trên erlen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, et al (2004), "Characterization of Bacillus Probiotics Available for Human Use", *Applied and Environmental Microbiology*. 70(4), 2161-2171.
- Lee J, Lee SY, Park S, et al (1999), "Control of fed-batch fermentations", *Biotechnology Advances*. 17(1), 29-48.
- Monteiro SM, Clemente JJ, Henriques AO et al (2005), "A Procedure for High Yield Spore Production by Bacillus subtilis", *Biotechnology progress*. 21(4), 1026-1031.
- Monteiro SMS, Clemente JJ, Carrondo MJT et al (2014), "Enhanced spore production of Bacillus subtilis grown in a

- chemically defined medium ", *Advances in Microbiology*. 4(08), 444.
12. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM (2009), Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 3rd ed. Wiley series in probability and statistics. Wiley, Hoboken, N.J.
 13. Nguyễn Văn Thanh, Trần Cát Đông, Trần Thu Hoa, et al. (2009), Công nghệ sinh học Dược. NXB Giáo Dục, tr. 297.
 14. Nicholson W, Setlow P (1990), "Chapter 9. Sporulation, germination and outgrowth", in Molecular biological methods for Bacillus, Colin R Harwood, Simon M Cutting, Editors, Wiley, tr. 391-451.
 15. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ (1995), "Media for industrial fermentation ", in Principles of Fermentation Technology - Second Edition, Peter Hall, F. Stanburyallan, et al, Editors, Pergamon: Amsterdam, tr. 93-122.
 16. Tavares MB, Souza RD, LuizWB et al (2013), "Bacillus subtilis Endospores at High Purity and Recovery Yields: Optimization of Growth Conditions and Purification Method", *Current Microbiology*. 66(3), 279-285.
 17. Vũ Thanh Thảo, Nguyễn Bảo Anh Trúc, Trần Cát Đông (2015), "Nghiên cứu đặc tính probiotic của một số chủng Bacillus sinh chất chống oxy hóa", *Y Học TP.HCM*. 19(3), 289-295.
 18. Vũ Thanh Thảo, Nguyễn Thị Linh Giang, Trần Cát Đông (2014), "Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ một số vi khuẩn và vi nấm", *Y Học TP.HCM*. 18(1), 373-378.
 19. World Health Organization (2002), "Guidelines for the evaluation of probiotics in Food".

Ngày nhận bài báo: 18/10/2017

Ngày phản biện nhận xét bài báo: 01/11/2017

Ngày bài báo được đăng: 15/03/2018