



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.050

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN LÊN MEN ACID LACTIC TỪ RỈ ĐƯỜNG SỬ DỤNG VI KHUẨN LACTIC CHỊU NHIỆT

Bùi Hoàng Đăng Long^{1*}, Phạm Quang Sin², Huỳnh Xuân Phong¹, Nguyễn Ngọc Thanh¹ và Ngô Thị Phương Dung¹

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên Khóa 41, Chuyên ngành Vi Sinh vật học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Bùi Hoàng Đăng Long (email: bhdlong@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 28/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Study of conditions for lactic acid fermentation from sugarcane molasses using thermotolerant lactic acid bacteria

Từ khóa:

Chịu nhiệt, điều kiện thích hợp, lên men lactic, rỉ đường, vi khuẩn lactic

Keywords:

Thermotolerant, lactic acid bacteria, lactic acid fermentation, molasses, suitable conditions

ABSTRACT

Lactic acid fermentation can add value to molasse and reduce pollution. The objectives of this study were to select and analyze for the fermentation by seven strains of lactic acid bacteria (L7, L9, L11, L26, L30, L37 and the control strain of *Lactobacillus thermotolerans*) using sugarcane molasses, a low-cost material from Phung Hiep sugar factory. Among them, *Lactobacillus casei* L9 could ferment and create 10.20 g/L total acid content after 5 days which is higher than that of the control *Lactobacillus thermotolerans* (9.40 g/L after 7 days). The suitable conditions for lactic acid fermentation from molasses were determined at pH 6.0, 8% (w/v) total sugar, 10^7 cells/mL inoculum. In the suitable conditions, *Lactobacillus casei* L9 could create 18.30 g/L lactic acid after a 6-day fermentation.

TÓM TẮT

Lên men acid lactic có khả năng tạo giá trị gia tăng cho rỉ đường và giải quyết ô nhiễm môi trường. Đề tài này được tiến hành với mục tiêu tuyển chọn và khảo sát quá trình lên men acid lactic từ rỉ đường, một nguồn phụ phẩm thu từ nhà máy đường Phụng Hiệp, sử dụng 7 chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt (L7, L9, L11, L26, L30, L37 và chủng đối chứng *Lactobacillus thermotolerans*). Trong đó, *Lactobacillus casei* L9 có khả năng lên men tốt nhất ở 39°C tạo hàm lượng acid lactic đạt 10,2 g/L sau 5 ngày lên men, cao hơn so với chủng đối chứng *Lactobacillus thermotolerans* (9,4 g/L sau 7 ngày). Điều kiện thích hợp cho lên men acid lactic từ rỉ đường là ở pH 6,0, sucrose 8% (w/v), mật số giống chủng 10^7 tế bào/mL. Ở điều kiện thích hợp, *Lactobacillus casei* L9 có khả năng chuyển hoá tạo 18,30 g/L acid lactic sau 6 ngày lên men.

Trích dẫn: Bùi Hoàng Đăng Long, Phạm Quang Sin, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Ngọc Thanh và Ngô Thị Phương Dung, 2019. Khảo sát điều kiện lên men acid lactic từ rỉ đường sử dụng vi khuẩn lactic chịu nhiệt. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 103-109.

1 GIỚI THIỆU

Acid lactic là một trong những gốc acid hữu cơ phổ biến nhất trong tự nhiên và được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp y dược, mỹ phẩm,

hóa chất và đặc biệt là thực phẩm (Narayanan *et al.*, 2004). Theo thống kê, lượng tiêu thụ acid hàng năm tăng từ 12-15% với 50% lượng acid lactic sản xuất mỗi năm được sử dụng vào các ngành công nghiệp thực phẩm và giải khát. Bên cạnh đó, nhu cầu acid

lactic cho sản xuất PLA (poly lactic acid), nguyên liệu cho các sản phẩm nhựa dễ phân hủy thay thế cho các sản phẩm nhựa có nguồn gốc dầu mỏ đạt khoảng 390.000 tấn trong năm 2008 (Bogaert and Coszach, 2000). Xu hướng sản xuất acid lactic hiện nay cho thấy phương pháp lên men acid lactic tự nhiên chiếm ưu thế so với phương pháp hóa học vì yếu tố môi trường. Lên men acid lactic tự nhiên được xem là thân thiện với môi trường vì tận dụng được các phế phụ phẩm nông nghiệp (Tayyba *et al.*, 2014).

Từ lâu, vi khuẩn lactic (LAB) đã được ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm, dược phẩm và công nghiệp hóa chất (Jiang *et al.*, 2011 và Mazzoli *et al.*, 2014). Nghiên cứu của Wee *et al.* (2004) đã khẳng định vi khuẩn lên men lactic có khả năng sinh acid và nhiều chất kháng khuẩn nhóm bacteriocin như: lactin, sakacin, plantacin và helveticin. Vi khuẩn lactic được nuôi cấy chủ yếu trên môi trường MRS (De Man, Rogosa và Sharpe) với giá thành khá cao. Để ứng dụng trong công nghiệp sản xuất, việc tìm ra các nguồn phụ phẩm dinh dưỡng với tiềm năng nuôi cấy vi khuẩn lactic có vai trò quan trọng.

Lên men acid lactic phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như nhiệt độ, thời gian lên men, nồng độ cơ chất, pH môi trường... Trong đó, nhiệt độ có ảnh hưởng sâu sắc đến lượng acid lactic tạo ra bởi đây là nhân tố tác động mạnh đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn acid lactic. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy mức độ sinh enzyme và hoạt tính enzyme của LAB thay đổi đáng kể khi nhiệt độ môi trường tăng cao gần mức tối đa. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ gần mức tối đa (49,5°C) trên *Lactobacillus bulgaricus* của Robert and Franzier (1941) cho thấy pha log diễn ra nhanh hơn so với ở 37°C, lượng acid sinh ra giảm mạnh sau 1-2 giờ lên men và dừng hoàn toàn sau 4 giờ. Vi khuẩn lactic chịu nhiệt có khả năng thích ứng lên men ở điều kiện nhiệt độ trên ngưỡng bình quân của các nhóm vi khuẩn thông thường (Miehe, 1907; Chen *et al.*, 2012). Việc nghiên cứu và sử dụng các chủng vi khuẩn acid lactic chịu nhiệt sẽ góp phần nâng cao hiệu suất lên men, hạn chế chi phí phát sinh cho nguyên liệu đầu vào và cho làm mát thiết bị do đó làm giảm giá thành sản phẩm (Wu *et al.*, 2012).

Rỉ đường, sản phẩm phụ của quá trình sản xuất và tinh sạch đường mía, có tồn dư dinh dưỡng cao. Việc tận dụng nguồn rỉ đường làm môi trường nuôi cấy vi khuẩn lactic có tiềm năng góp phần giải quyết ô nhiễm môi trường và phục vụ phát triển bền vững. Trong tình hình biến đổi khí hậu đã và đang tác động lớn lên biên độ nhiệt nước ta, ứng dụng vi khuẩn lactic chịu nhiệt để lên men trong nhiệt độ cao hơn có nhiều ưu thế như hạn chế nhiễm vi sinh vật, thúc đẩy hoạt tính enzyme đang được quan tâm. Nghiên

cứ này được thực hiện với mục tiêu tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt có khả năng lên men acid lactic từ rỉ đường. Đồng thời xác định điều kiện thích hợp (pH, mật số chủng, hàm lượng đường) cho sản xuất acid lactic từ rỉ đường ứng dụng chủng vi khuẩn đã tuyển chọn.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

Chủng vi khuẩn: Bấy chủng vi khuẩn lactic đã được tuyển chọn từ nghiên cứu của Trinh *et al.* (2018) và được lưu trữ trong phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực Phẩm. Chủng vi khuẩn đối chứng *Lactobacillus thermotolerans* (Trường Đại học Kyushu, Nhật Bản).

Hóa chất và môi trường: Môi trường: MRS broth, MRS agar (De Man *et al.*, 1960): cao trích nấm men, peptone, glucose, K₂HPO₄, amoni xitrat, MnSO₄, cao trích thịt bò, MgSO₄, tween 80, natri axetat, CaCO₃. Dịch rỉ đường được thu từ nhà máy đường Phụng Hiệp, trữ rỉ đường trong tủ lạnh.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng lên men acid lactic từ rỉ đường

Nhằm so sánh và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt có khả năng lên men acid lactic tốt nhất ở 39°C (Trinh *et al.*, 2018) trong dịch rỉ đường. Bấy chủng vi khuẩn lactic (*Lactobacillus platarum* L7, *Lactobacillus casei* L9, *Lactobacillus acidophilus* L11, *Lactobacillus platarum* L26, *Lactobacillus platarum* L30, *Lactobacillus platarum* L37, *Lactobacillus thermotolerans* DC) được tăng sinh trong môi trường MRS broth trong 36 giờ ở 37°C đến khi đạt mật số 10⁹ tế bào/mL (xác định bằng buồng đếm hồng cầu). Pha loãng dịch rỉ đường đến hàm lượng đường 6,0% w/v (xác định bằng phương pháp phenol sulfuric) và điều chỉnh pH 5,3 (Trinh *et al.*, 2018). Chủng 1 mL dịch tăng sinh vi khuẩn lactic vào bình tam giác chứa 99 mL dịch rỉ đường (đã khử trùng ở 115°C trong 10 phút) để đạt mật số 10⁷ tế bào/mL và ủ 7 ngày ở 39°C. Xác định hàm lượng acid lactic và hàm lượng đường còn lại mỗi ngày.

2.3 Điều kiện pH thích hợp cho lên men acid lactic từ rỉ đường

Chủng vi khuẩn lactic (*Lactobacillus platarum* L7, *Lactobacillus casei* L9, *Lactobacillus acidophilus* L11, *Lactobacillus platarum* L26, *Lactobacillus platarum* L30, *Lactobacillus platarum* L37, *Lactobacillus thermotolerans* DC) được tăng sinh trong môi trường MRS broth trong 36 giờ ở 37°C đến khi đạt mật số 10⁹ tế bào/mL (xác định

bằng buồng đếm hồng cầu). Pha loãng dịch ri đường đến hàm lượng đường 6,0% w/v (xác định bằng phương pháp phenol sulfuric). Chuẩn độ pH dịch ri đường về 4,0; 5,0; 6,0 và 7,0 (chuẩn độ bằng Na₂CO₃ và acid lactic). Chủng 1 mL dịch tăng sinh vi khuẩn lactic vào bình tam giác chứa 99 mL dịch ri đường và ủ 7 ngày ở 39°C. Xác định hàm lượng acid lactic và hàm lượng đường còn lại mỗi ngày.

2.4 Khảo sát ảnh hưởng của mật số giống chủng LAB chịu nhiệt

Nhằm xác định mật số giống chủng ban đầu thích hợp cho lên men acid lactic từ ri đường, chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn qua nội dung 3.1 được tăng sinh trong môi trường MRS broth trong 36 giờ ở 37°C đến khi đạt mật số 10⁹ tế bào/mL (xác định bằng buồng đếm hồng cầu). Pha loãng dịch ri đường đến hàm lượng đường 6,0% w/v (xác định bằng phương pháp phenol sulfuric) và chuẩn độ pH thích hợp xác định ở nội dung 3.2 (chuẩn độ bằng Na₂CO₃ và acid lactic). Chuẩn bị dịch vi khuẩn mật số 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ tế bào/mL. Cây chuyển thể tích dịch vi khuẩn đã tăng sinh đến mật số 10⁹ vào 99mL dịch ri đường (đã khử trùng ở 115°C trong 10 phút) để đạt mật số ban đầu 10⁴, 10⁵, 10⁶ và 10⁷ tế bào/mL và ủ 7 ngày ở 39°C. Xác định hàm lượng acid lactic và hàm lượng đường còn lại mỗi ngày.

2.5 Khảo sát ảnh hưởng hàm lượng đường đến quá trình lên men acid lactic

Nhằm xác định hàm lượng đường dịch ri thích hợp cho lên men acid lactic từ ri đường, chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn qua nội dung 3.1 được tăng sinh trong môi trường MRS broth trong 36 giờ ở 37°C đến khi đạt mật số 10⁹ tế bào/mL (xác định bằng buồng đếm hồng cầu). Pha loãng dịch ri đường đến hàm lượng đường 5,0%; 6,0%; 7,0% và 8,0% w/v (xác định bằng phương pháp phenol sulfuric) và chuẩn độ pH thích hợp xác định ở nội dung 3.2 (chuẩn độ bằng Na₂CO₃ và acid lactic). Cây chuyển 1% dịch vi khuẩn đã chuẩn bị vào dịch ri đường (đã khử trùng ở 115°C trong 10 phút) để

đạt mật số ban đầu xác định qua nội dung 3.3 và ủ 7 ngày ở 39°C. Xác định hàm lượng acid lactic và hàm lượng đường còn lại mỗi ngày.

2.6 Phương pháp xử lý số liệu và thống kê:

Hiệu suất chuyển hoá acid được tính bằng số gam acid sinh ra trên số gam đường tiêu thụ:

$$H = M_{\text{acid sinh ra}} / M_{\text{đường mất đi đến thời gian } t}; \text{ trong đó, } H \text{ là Hiệu suất; } M \text{ là hàm lượng (g/L)}$$

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Trong đó, số liệu thí nghiệm được phân tích bằng kiểm định một nhân tố với phần mềm Statgraphics Centurion phiên bản XVI ở độ tương đồng 95%

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thử nghiệm quá trình lên men acid lactic chịu nhiệt từ ri đường

Bảng 1 thể hiện khả năng sinh acid lactic của các chủng vi khuẩn sau 7 ngày lên men, chủng L9 có khả năng lên men acid tốt hơn các chủng còn lại với khả năng sinh acid đạt cao nhất ở ngày 5 (đạt 10,20 g/L) cao hơn chủng đối chứng *Lactobacillus thermotolerans* DC (9,40 g/L đạt được vào ngày 7). Chủng L26 cũng cho khả năng sinh acid cao với 8,40 g/L acid đạt được vào ngày thứ 4. Các chủng L7, L11, L26 và L37 có thể sinh acid lactic nhanh và đạt cao nhất vào ngày thứ 3 với lượng acid dao động từ 7,05 đến 8,70 g/L. Chủng L30 với *Lactobacillus thermotolerans* đạt cao nhất vào ngày thứ 7 với lượng acid 9,40 đến 9,50 g/L. Hầu hết các chủng đều ghi nhận hàm lượng acid lactic giảm sau khi đạt mức cao nhất. *Lactobacillus casei* L9 có khả năng lên men ri đường tốt. Trong nghiên cứu của Trinh *et al.* (2018) trên môi trường MRS, *Lactobacillus casei* L9 cũng có khả năng lên men sinh acid cao nhất đạt 21,15 g/L. So với môi trường MRS, sự chuyển hoá acid trong môi trường ri đường là không tốt bằng (sinh ra 10,20 g/L acid).

Bảng 1: Khả năng sinh acid lactic trong 7 ngày của 7 chủng LAB chịu nhiệt ở 39°C

Chủng LAB	Hàm lượng acid lactic (g/L) theo thời gian (ngày)						
	1	2	3	4	5	6	7
L7	6,00 ^{ab}	8,25 ^a	8,70 ^a	7,20 ^b	7,05 ^{bc}	5,85 ^c	4,80 ^{cd}
L9	6,38 ^a	6,60 ^b	8,55 ^a	8,85 ^a	10,2 ^a	8,85 ^{ab}	7,65 ^b
L11	6,00 ^{ab}	6,45 ^b	7,05 ^{bc}	6,00 ^c	5,70 ^c	5,85 ^c	5,85 ^{bc}
L26	5,10 ^{de}	8,55 ^a	8,70 ^a	8,40 ^a	8,10 ^b	7,80 ^b	4,50 ^d
L30	4,80 ^e	6,00 ^b	6,75 ^{bc}	5,55 ^c	7,05 ^{bc}	8,70 ^{ab}	9,30 ^a
L37	5,40 ^{cd}	7,80 ^a	7,80 ^{ab}	6,15 ^c	6,60 ^{bc}	6,45 ^c	5,85 ^c
DC	6,75 ^{bc}	6,30 ^b	6,59 ^c	6,00 ^c	6,60 ^{bc}	9,00 ^a	9,40 ^a
CV (%)	13,64	10,26	11,85	8,46	9,23	10,51	19,17

*Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau các ký tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95% (2) đơn vị hàm lượng acid lactic là g/L

Trong quá trình lên men, sự biến động hàm lượng acid lactic là do khả năng chuyển hoá acid

lactic thành acid acetic theo tỷ lệ 2:1 làm giảm lượng acid lactic (Elferink *et al.*, 2001). Hiệu suất lên men acid của 7 chủng tốt nhất được thể hiện qua Bảng 2.

Bảng 2: Khả năng chuyển hoá acid của 7 chủng vi khuẩn lactic ở ngày 4

Chủng LAB	Hàm lượng acid lactic sinh ra (g/L)	pH sau khi lên men		Hàm lượng đường tiêu thụ (g/L)	Hiệu suất lên men (%)
L7	7,05 ^{bc}	3,57		56,29	12,52 ^b
L9	10,20 ^a	3,54		56,32	18,11 ^a
L11	5,70 ^c	3,65		56,12	10,16 ^b
L26	8,10 ^b	3,40		56,43	14,35 ^b
L30	7,05 ^{bc}	3,92		55,87	12,61 ^b
L37	6,60 ^c	3,57		56,28	11,72 ^b
DC	6,60 ^{bc}	3,86		55,69	11,85 ^b
CV (%)	9,23				6,25

*Ghi chú: Hiệu suất lên men dựa vào hàm lượng acid sinh ra trên hàm lượng đường mất đi với hàm lượng đường ban đầu là 60g/L; giá trị trong bảng là giá trị trung bình 3 lần lặp lại. Các ký tự giống nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95%

Qua Bảng 2, hiệu suất lên men acid của *Lactobacillus casei* L9 đạt 18,11%, cao hơn các chủng còn lại.

Tuy nhiên so với khả năng chuyển hoá acid lactic của *Lactobacillus casei* L9 theo nghiên cứu của Trinh *et al.* (2018) đạt 80,84% thì hiệu suất lên men trong ri đường là thấp hơn. Khả năng lên men của *Lactobacillus casei* L9 thấp ở ri đường so với MRS là do ri đường qua công nghiệp chế biến chứa nhiều nhóm phenol có khả năng ức chế nhiều nhóm vi sinh vật (Kensaku Takara *et al.*, 2007). Khả năng ức chế những chất nhóm phenol làm giảm khả năng chuyển hoá acid của vi khuẩn lactic.

3.2 Điều kiện pH thích hợp cho lên men acid lactic từ ri đường

Bảng 3 và 4 thể hiện khả năng chuyển hoá acid của *Lactobacillus casei* L9 ở các mức pH khác nhau. Khả năng chuyển hoá acid lactic đạt cao nhất ở pH 6 sau 5 ngày lên men đạt 10,64 g/L acid với hiệu suất đạt 43,1%. Có thể thấy, năng suất và hiệu suất lên men acid được cải thiện khi điều chỉnh pH 6,0

so với mức pH ở nội dung 3.1 (sinh ra cao nhất đạt 10,20 g/L với hiệu suất 19,39%). Trong nghiên cứu của mình trên *Lactobacillus sp.*, Hood and Zoitola (1988) nhận định pH ảnh hưởng khả năng thích ứng của vi khuẩn và hoạt tính của đại phân tử enzyme trong tế bào, từ đó ảnh hưởng khả năng lên men sinh sản phẩm. Bảng 3 và Bảng 4 cũng cho thấy *Lactobacillus casei* L9 lên men acid đạt hàm lượng và hiệu suất cao nhất vào ngày 5 tương đồng kết quả ngày lên men tốt nhất ở nội dung 3.1. Kết quả ở Bảng 3 và Bảng 4 cho thấy pH thích hợp cho quá trình lên men tạo acid lactic có pH = 6,0 (đạt 10,64 g/L) cũng phù hợp với báo cáo của Hofvendahl *et al.* (2000) về các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men sản xuất acid lactic từ nguồn nguyên liệu tái tạo, pH thích hợp cho quá trình lên men acid lactic là từ 5,0 đến 6,5 đối với các chủng *Lactobacillus spp.* như *L. delbrueckii sp. bulgaricus* ATCC 55163 và *L. rhamnosus* ATCC 10863. Trong môi trường MRS, chủng L9 cũng lên men tạo acid tốt nhất ở pH 6,51 (Trinh *et al.*, 2018). Nhìn chung, *Lactobacillus casei* L9 có khả năng lên men tốt nhất ở mức pH acid nhẹ.

Bảng 3: Hàm lượng acid lactic theo thời gian ở các điều kiện pH khác nhau

Giá trị pH	Hàm lượng acid lactic (g/L) theo thời gian (ngày)						
	1	2	3	4	5	6	7
4,0	6,90 ^a	6,90 ^b	6,90 ^b	7,04 ^d	7,04 ^c	6,45 ^c	6,90 ^b
5,0	5,54 ^b	7,05 ^b	8,39 ^{ab}	9,00 ^b	9,15 ^b	9,15 ^{ab}	8,69 ^a
6,0	5,69 ^b	7,65 ^a	9,60 ^a	9,90 ^a	10,64 ^a	9,75 ^a	9,15 ^a
7,0	5,85 ^b	6,30 ^b	8,10 ^{ab}	8,39 ^c	9,00 ^b	8,10 ^b	7,95 ^{ab}
CV (%)	8,85	15,21	11,68	9,11	6,65	10,62	8,71

*Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình 3 lần lặp lại. Các ký tự giống nhau theo sau giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95%

Bảng 4: Hiệu suất lên men acid lactic trong thí nghiệm khảo sát pH

Giá trị pH	Hiệu suất sinh acid lactic (%) theo thời gian lên men (ngày)						
	1	2	3	4	5	6	7
4,0	69,1 ^a	58,1 ^a	36,9 ^a	22,3 ^b	19,2 ^b	14,0 ^b	14,2 ^a
5,0	43,0 ^{ab}	47,2 ^{ab}	32,8 ^{ab}	34,6 ^{ab}	36,4 ^{ab}	27,8 ^a	17,3 ^a
6,0	27,3 ^b	29,9 ^{ab}	41,3 ^a	52,0 ^a	43,1 ^a	23,1 ^{ab}	17,5 ^a
7,0	16,3 ^b	15,5 ^b	22,3 ^b	23,1 ^b	22,7 ^{ab}	16,0 ^b	12,7 ^a
CV (%)	11,45	5,12	16,89	9,53	12,21	8,86	7,21

*Ghi chú: Hiệu suất lên men dựa vào lượng acid sinh ra thực tế so với lý thuyết; giá trị trong bảng là giá trị trung bình 3 lần lặp lại. Các ký tự giống nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95%

3.3 Mật số chủng thích hợp cho lên men acid lactic từ ri đường

Trong 4 mức mật số giống chủng ban đầu 10⁴, 10⁵, 10⁶ và 10⁷ tế bào/mL, Bảng 8 và Bảng 9 cho thấy năng suất và hiệu suất sinh acid lactic đạt cao nhất ở mật số 10⁷ tế bào/mL đạt với 11,85 g/L acid sinh ra đạt hiệu suất 23,53%. Bảng 8 cũng cho thấy hàm lượng acid tăng lên khi tăng mật số chủng ban đầu. Wardani *et al.* (2017) từng ghi nhận ảnh hưởng rõ rệt của mật số chủng và thể tích chủng lên quá trình lên men acid lactic từ sữa bởi chủng *Lactobacillus platarum* Dad 13. Mật số chủng tăng

lên giúp rút ngắn pha lag và giúp vi khuẩn thích nghi tốt hơn với sự thay đổi của môi trường ban đầu. So với nghiên cứu của Wardani trên sữa sinh ra 4,60 g/L acid ở mật số ban đầu 2,39 x 10⁴ tế bào/mL trong 24 giờ, hàm lượng acid sinh ra từ ri đường ở cùng mật số trong cùng thời gian là tốt hơn (đạt 6,15 g/L trong 24 giờ). So với mật số chủng tối ưu 2,37 x 10⁷ tế bào/mL trong môi trường MRS (Trinh *et al.*, 2018), mật số tối ưu 10⁷ tế bào/mL trong môi trường ri đường là tương đồng. Có thể nói, mật số giống chủng đạt 10⁷ (tế bào/mL) là thích hợp nhất để sản xuất acid lactic từ ri đường.

Bảng 5: Hàm lượng acid lactic (g/L) sinh ra ở các mật số chủng ban đầu

Mật số (10 ^N)	Hàm lượng acid lactic (g/L) theo thời gian (ngày)						
	1	2	3	4	5	6	7
N = 4	3,60 ^c	4,65 ^b	4,65 ^c	6,45 ^c	5,70 ^c	5,70 ^c	8,10 ^b
N = 5	3,60 ^c	4,95 ^b	5,25 ^c	6,75 ^c	6,30 ^{bc}	6,45 ^{bc}	8,10 ^b
N = 6	4,50 ^b	5,85 ^b	6,30 ^b	7,50 ^b	7,65 ^b	7,65 ^b	8,40 ^b
N = 7	6,15 ^a	7,95 ^a	9,15 ^a	10,35 ^a	10,80 ^a	8,33 ^a	11,85 ^a
CV (%)	10,32	11,89	8,89	6,76	5,23	8,13	9,24

*Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình 3 lần lặp lại. Các ký tự giống nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95%

Bảng 6: Hiệu suất sinh acid lactic (%) theo các mật số chủng ban đầu

Mật số (10 ^N)	Hiệu suất sinh acid lactic (%) theo thời gian lên men (ngày)						
	1	2	3	4	5	6	7
N = 4	4,46 ^b	7,11	7,15 ^b	13,71 ^b	10,57 ^c	10,10 ^a	18,18 ^{ab}
N = 5	4,62 ^b	12,78	9,41 ^b	14,28 ^b	11,68 ^c	10,73 ^a	13,38 ^b
N = 6	10,40 ^a	12,43	10,96 ^b	14,71 ^{ab}	17,43 ^b	15,06 ^a	16,76 ^{ab}
N = 7	13,62 ^a	25,30	22,03 ^a	25,32 ^a	26,28 ^a	15,91 ^a	23,53 ^a
CV (%)	12,23	10,9	15,51	8,63	6,02	9,71	8,03

*Ghi chú: Hiệu suất lên men dựa vào lượng acid sinh ra thực tế so với lý thuyết; giá trị trong bảng là giá trị trung bình 3 lần lặp lại. Các ký tự giống nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau các ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95%

3.4 Khảo sát lượng đường thích hợp cho lên men vi khuẩn LAB

Đường là nguyên liệu của phản ứng lên men và là yếu tố thúc đẩy hoạt động của hệ thống enzyme tham gia chuyển hoá acid lactic. Bảng 7 và Bảng 8 trình bày tác động của hàm lượng đường ban đầu lên nồng độ và hiệu suất lên men acid lactic của *Lactobacillus casei* L9. Hàm lượng đường tăng lên

(từ 5% đến 8% w/v) làm tăng lượng acid sinh ra ở hầu hết các ngày lên men. Hàm lượng acid lactic đạt cao nhất ở hàm lượng đường ban đầu 8% (w/v) đạt 18,30 g/L ở ngày 6. So với năng suất chuyển hoá, hàm lượng đường tăng lên không làm tăng hiệu suất lên men acid. Có thể thấy, 8% (w/v) đường là hàm lượng thích hợp để sinh lượng acid lactic từ ri đường tốt nhất.

Bảng 7: Hàm lượng acid (g/L) sinh ra theo ngày ở các hàm lượng đường ban đầu khác nhau

Hàm lượng đường (% w/v)	Hàm lượng acid lactic (g/L) theo thời gian lên men (ngày)						
	1	2	3	4	5	6	7
5	9,00 ^b	9,75 ^b	9,75 ^c	9,90 ^b	9,08 ^c	13,20 ^c	10,20 ^b
6	9,30 ^{ab}	12,00 ^a	12,00 ^b	12,23 ^{ab}	10,58 ^{bc}	15,60 ^b	11,40 ^b
7	9,00 ^b	11,85 ^a	13,50 ^{ab}	14,03 ^a	12,75 ^{ab}	18,00 ^a	15,30 ^a
8	9,75 ^a	12,45 ^a	15,30 ^a	15,30 ^a	14,10 ^a	18,30 ^a	15,80 ^a
CV (%)	12,26	18,32	9,91	11,13	13,28	10,08	8,82

*Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình 3 lần lặp lại. Các ký tự giống nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95%

Bảng 8: Hiệu suất lên men (%) theo ngày ở các hàm lượng đường ban đầu khác nhau

Giá trị lượng đường (%)	Hiệu suất sinh acid lactic (%) theo thời gian lên men (ngày)						
	1	2	3	4	5	6	7
5	82,58 ^c	45,53 ^a	30,56 ^a	27,45 ^a	21,31 ^a	32,29 ^a	21,48 ^b
6	40,20 ^b	48,04 ^a	38,05 ^a	29,39 ^a	23,15 ^a	35,11 ^a	23,17 ^b
7	24,66 ^a	38,88 ^a	35,76 ^a	29,37 ^a	25,33 ^a	36,81 ^a	36,62 ^a
8	35,75 ^a	37,86 ^a	36,01 ^a	29,83 ^a	22,91 ^a	30,23 ^a	40,45 ^a
CV (%)	19,13	6,48	11,21	12,77	6,25	8,86	11,62

*Ghi chú: Hiệu suất lên men dựa vào lượng acid sinh ra thực tế so với lý thuyết; giá trị trong bảng là giá trị trung bình 3 lần lặp lại. Các ký tự giống nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau các ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95%

Bảng 9: Hàm lượng đường và hiệu suất lên men qua các giai đoạn tối ưu hoá

Giai đoạn	Lên men tuyển chọn	Tối ưu hoá pH 6.0	Tối ưu hoá mật số chủng 10 ⁷ tế bào/mL	Tối ưu hoá hàm lượng đường 8% (w/v)
Hàm lượng acid (g/L)	10,20	10,64	11,85	18,30
Hiệu suất (%)	18,11	43,10	15,06	30,23

So với hàm lượng acid và hiệu suất lên men ở nội dung 3.1, hàm lượng acid và hiệu suất lên men sau tối ưu hoá các điều kiện pH, mật số chủng và hàm lượng đường (Bảng 8) là cao hơn. Nhưng tác động của tối ưu hoá lên hiệu suất qua từng giai đoạn tăng giảm không rõ ràng. Bảng 9 cho thấy kết quả tối ưu hoá qua các giai đoạn có tác động tích cực làm tăng hàm lượng acid lactic sinh ra của *Lactobacillus casei* L9 lên 79,41% (từ 10,20 g/L ban đầu lên 18,30 g/L sau tối ưu hoá).

4 KẾT LUẬN

Trong bảy chủng vi khuẩn LAB (L7, L9, L11, L26, L30, L37 và DC) được khảo sát trong môi trường rỉ đường ở 39°C, *Lactobacillus casei* L9 có khả năng lên men acid tốt nhất đạt 10,20 g/L. Điều kiện tối ưu cho lên men acid lactic của *Lactobacillus casei* L9 được xác định ở pH 6,0, mật số giống chủng ban đầu 10⁷ tế bào/mL và lượng đường thích hợp là 8% (w/v). Ở điều kiện tối ưu, hàm lượng acid sinh ra đạt 18,3 g/L với hiệu suất lên men đạt 30,23%. Nghiên cứu này làm tiền đề cho các nghiên cứu cải thiện hiệu suất lên men thông qua tối ưu hoá nhiệt độ, thành phần và nồng độ khoáng... nhằm tăng khả năng ứng dụng vi khuẩn lactic để sản xuất acid từ dịch rỉ đường ở quy mô công nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bogaert, J.C. and Coszach, P., 2000. Poly (lactic acids): a potential solution to plastic waste dilemma. macromolecule symposium. 153: 287-303.
- Chen, M.M., Liu, Q.H., Xin, G.R. and Zhang, J.G., 2013. Characteristics of lactic acid bacteria isolates and their inoculating effect on the silage fermentation at high temperature. Letters in Applied Microbiology, 56(1): 71-78.
- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E., 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli, Journal of Applied Bacteriology. 23(1): 130-135.
- Elderink, S.J.W.H.O., Kroonerman, E., Ottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F. and Driehuis, F., 2001. Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. Applied and Environmental Microbiology. 67(1): 125-132.
- Jiang Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muijzer, G. and van Loosdrecht, M.C.M., 2011. Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture, Biotechnology and Bioengineering. 108(9): 2022-2035.
- Hofvendahl, K. and Hahn-Hägerdal, B., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources 1, Enzyme and Microbial Technology. 26(2): 87-107.

- Hood, S.K., and Zoitola, E.A., 1988. Effect of Low pH on the Ability of *Lactobacillus acidophilus* to Survive and Adhere to Human Intestinal Cells, *Journal of Food Science*. 53(5): 1514-1516.
- Takara, K., Ushijima, K., Wada, K., Iwasaki, H., and Yamashita, M., 2007. Phenolic Compounds from Sugarcane Molasses Possessing Antibacterial Activity against Cariogenic Bacteria. *Journal of Oleo Science*. 56(11): 611-614.
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., and Bayer, E.A., 2014. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*. 32(7): 1216-1236.
- Miehe, H., 1907. *Die Selbsterhitzung Des Heus: Eine Biologische Studie (in German)*. Jena: Gustav Fischer. 70.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A., 2004. Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L(+) Lactic acid. *Electronic Journal of Biotechnology*. 15(7)-1.
- Stern, R.M. and Frazier, W.C., 1941. Physiological Characteristics of Lactic Acid Bacteria Near the Maximum Growth Temperature: I. Growth and Acid Production 1, 2. *Journal of Bacteriology*, 42(4): 479-499.
- Tayyba, G., Muhammad, I., Zahid, A., Aqil, T. et al., 2014. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 7(2): 222-229.
- Trinh, H.N.P., Long, B.H.D, Thanh, N.N., Phong, H.X., and Dung, N.T.P., 2018. Characterization of newly isolated thermotolerant lactic acid bacteria and lactic acid production at high temperature. *International Food Research Journal*. 25(2): 523-526.
- Wardani, S.K, Cahyanto, M.N., Rahayu, E.S., and Utami, T., 2017. The effect of inoculum size and incubation temperature on cell growth, acid production and curd formation during milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* Dad 13. *International Food Research Journal*. 24(3): 921-926.
- Wee, Y.J, Kim, J.N, Yun, J.S., and Ryu, H.W., 2004. Utilization of sugar molasses for economical L (+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*, *Enzyme and Microbial Technology*. 35(6): 568-573.
- Wu, C., Zhang, J., Wang, M., and Du, G., 2012. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 39(7): 1031-1039.