

Tối ưu hóa điều kiện lên men thu nhận axit glucuronic trên môi trường nước dứa già

- Nguyễn Thúy Hương
- Hà Thiên Hương

Bộ môn Công Nghệ Sinh Học, trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(Bản nhận ngày 10 tháng 07 năm 2015, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 23 tháng 02 năm 2015)

TÓM TẮT

Lên men nước dứa già bởi hệ cộng sinh giữa vi khuẩn *Gluconacetobacter nataicola* và *Lactobacillus acidophilus* với mục đích thu nhận axit glucuronic hàm lượng cao. Nghiên cứu khảo sát các yếu tố lên men và sàng lọc bằng ma trận Plackett – Burman nhằm chọn ra các yếu tố có ảnh hưởng mạnh đến khả năng sinh axit glucuronic khi lên men trên nước dứa già. Sau quá trình sàng lọc, bốn yếu tố gồm tỷ lệ vi khuẩn *G. Nataicola*, tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus*, hàm lượng sucrose bổ sung, và nhiệt độ lên men có

ảnh hưởng mạnh đến khả năng sinh axit và bốn yếu tố này sẽ được đưa vào quá trình tối ưu hóa. Thiết kế tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) theo cấu trúc có tâm (CCD) thu được kết quả là 5 yếu tố ảnh hưởng mạnh có giá trị tối ưu là tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* là 4.79 logCFU/ml, tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus* là 5.34 logCFU/ml, 8.99% sucrose và nhiệt độ lên men 31.96°C. Giá trị axit glucuronic cực đại khi áp dụng mô hình vào thực tế là 94.23 mg/l.

Từ khóa: axit glucuronic, *Gluconacetobacter nataicola*, *Lactobacillus acidophilus*, Plackett-Burman, RSM-CCD.

1. GIỚI THIỆU

Axit glucuronic là hợp chất hữu cơ có công thức phân tử $C_6H_{10}O_7$ và công thức cấu tạo $HCO(CHOH)_4COOH$ được tổng hợp qua chu trình vòng uronic. Trong cơ thể người, axit glucuronic có vai trò liên kết khử độc [1,2,3], chống các gốc tự do nhằm ngăn chặn các tác nhân oxy hóa giúp tăng cường sức khỏe [4]. Đặc biệt, axit glucuronic có tác dụng giảm nồng độ axit uric trong máu giúp điều trị bệnh Gout – một trong những căn bệnh của thời đại hiện nay [4].

Axit glucuronic với các đặc tính quý giá đã thu hút nhiều hướng nghiên cứu trên thế giới trong thời gian gần đây. Vi khuẩn acetic được Khan và cộng sự (2008) xác định là tác nhân

chính lên thu axit glucuronic [1]. Năm 2010, Yang và cộng sự đã chứng minh khả năng sinh axit glucuronic tăng đáng kể khi kết hợp lên men vi khuẩn acetic và lactic [5]. Năm 2014, Ly và cộng sự đã công bố nghiên cứu tối ưu hóa lên men sữa bởi vi khuẩn acetic và lactic thu axit glucuronic [6]. Đặc biệt, Nguyen và cộng sự (2015) cũng đã có nghiên cứu chứng minh khi bổ sung vi khuẩn lactic vào hệ lên men trà Kombucha thì lượng axit glucuronic tăng đáng kể [7].

Nước dứa già là sản phẩm nông nghiệp rất dồi dào và ổn định ở Việt Nam. Nước dứa già là phế phẩm nông nghiệp trong công nghiệp sản

xuất com dừa nạo sấy xuất khẩu và công nghiệp xà phòng nên giá thành của nguồn nguyên liệu này khá thấp. Hơn nữa, nước dừa già có thành phần chất dinh dưỡng đa dạng thích hợp lên men cả vi khuẩn acetic [8] lẫn lactic [9,10]. Và hiện nay trên thế giới vẫn chưa có nghiên cứu ứng dụng nước dừa thu nhận axit glucuronic. Vì thế trong nghiên cứu này, chúng tôi tối ưu hóa điều kiện lên men nước dừa già bởi hệ vi khuẩn acetic và lactic bằng mô hình Plackett - Burman và RSM – CCD nhằm thu nhận axit glucuronic tối ưu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Giống vi sinh vật

Giống vi sinh vật được sử dụng trong nghiên cứu này gồm hai chủng giống được chọn từ bộ sưu tập giống của Bộ môn Công Nghệ Sinh Học Đại học Bách Khoa thành phố Hồ Chí Minh: giống vi khuẩn acetic *Gluconacetobacter nataicola* có mã số NR_04110121 và giống vi khuẩn lactic *Lactobacillus acidophilus* có mã số AB911464.1[11].

2.2 Môi trường lên men

Nước dừa già sử dụng trong nghiên cứu này là nước dừa già được sử dụng ổn định cùng một nguồn thuộc giống dừa ta (Bến Tre). Bổ sung 10% glucose, pH 6.5, hiệu chỉnh bằng NaOH và acid acetic. Lên men bằng phương pháp lên men theo mẻ có kết hợp khuấy đảo 150 vòng/ phút.

2.3 Phương pháp quy hoạch thực nghiệm

2.3.1 Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh axit glucuronic

Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh axit glucuronic trên môi trường nước dừa già gồm 6 yếu tố là tỷ lệ giống vi khuẩn *G. nataicola*, tỷ lệ giống vi khuẩn *L. acidophilus*, hàm lượng sucrose bổ sung, pH ban đầu, nhiệt độ lên men và thời gian lên men. Tất cả các yếu tố này được khảo sát lần lượt theo thứ tự trong điều kiện lên men tĩnh. Kết quả yếu tố khảo sát trước sẽ là tiền đề cho thí nghiệm khảo sát yếu tố sau và cũng là tâm thí nghiệm để đưa vào quy trình sàng lọc và quy hoạch thực nghiệm. Phạm vi khảo sát được trình bày ở bảng 1.

2.3.2 Sàng lọc các yếu tố bằng ma trận sàng lọc Plackett – Burman

Ma trận sàng lọc Plackett – Burman được xây dựng nhằm loại các yếu tố ít ảnh hưởng hoặc không ảnh hưởng đến khả năng sinh axit glucuronic. Ma trận được thiết kế dựa vào tâm thí nghiệm của 6 yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh axit là tỷ lệ giống vi khuẩn *G. nataicola*, tỷ lệ giống vi khuẩn *L. acidophilus*, hàm lượng sucrose bổ sung, pH ban đầu, nhiệt độ lên men và thời gian lên men. Ma trận được xây dựng với 2 mức độ là thấp nhất (-1) và cao nhất (1) tương ứng với phạm vi khảo sát được thực hiện trong thí nghiệm khảo sát các đơn yếu tố (bảng 1) bao gồm 12 thí nghiệm (bảng 3) để sàng lọc ra các yếu tố có ảnh hưởng mạnh đến khả năng sinh axit glucuronic. Các yếu tố có độ tin cậy cao ($p < 0.05$) sẽ được đưa vào mô hình tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt theo cấu trúc có tâm (RSM – CCD).

Bảng 1. Phạm vi các yếu tố khảo sát khả năng lên men thu axit glucuronic

Yếu tố khảo sát	Tỷ lệ <i>G. nataicola</i> (log CFU/ml)	Tỷ lệ <i>L. acidophilus</i> (log CFU/ml)	Hàm lượng sucrose (%)	pH ban đầu	Nhiệt độ lên men (°C)	Thời gian lên men (giờ)
Phạm vi khảo sát	3	3	5	4	25	12
	4	4	7.5	4.5	30	24

	5	5	10	5	35	36
	6	6	12.5	5.5	40	48
	7		15	6	45	60

2.3.3 Tối ưu hóa bằng phương pháp thực nghiệm RSM – CCD

Các yếu tố được chọn lọc từ ma trận sàng lọc Plackett – Burman sẽ được đưa vào thực nghiệm tối ưu hóa RSM – CCD và được nghiên cứu ở 5 mức độ (-2, -1, 0, +1, +2) với CCD 26 nghiệm thức (bảng 4). Mô hình RSM-CCD được chúng tôi sử dụng như là một mô hình mô phỏng hàm lượng acid glucuronic được sinh ra trong quá trình lên men, sau khi loại bỏ một số biến có ít ảnh hưởng, từ đó có thể tiến hành tiếp các thí nghiệm phức tạp hơn với các biến đã được giữ lại nhằm khảo sát quá trình một cách chi tiết hơn. Số liệu được phân tích bằng phần mềm Stagraphics Centurion XV.I. Từ kết quả phân tích sẽ xác định điểm tối ưu của các yếu tố cho hàm lượng axit glucuronic tối ưu [12].

2.3.4 Phương pháp định lượng axit glucuronic

Axit glucuronic được định lượng bằng kit K – Uronic của hãng Megazyme ở độ hấp thụ 340 nm bằng máy quang phổ UV – Vis spectro 6000.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh axit glucuronic

Quá trình lên men thu nhận axit glucuronic trên môi trường nước dừa già là quá trình cộng sinh của hai vi khuẩn *G. nataicola* và vi khuẩn *L. acidophilus* và quá trình này chịu ảnh hưởng trực tiếp của các yếu tố khách quan là các yếu tố khảo sát trình bày ở bảng 1. Kết quả khảo sát của các yếu tố này được trình bày ở bảng 2.

Vi khuẩn *G. nataicola* là vi khuẩn đóng vai trò trực tiếp trong hệ lên men hình thành axit glucuronic nên yếu tố tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* khởi đầu quá trình lên men là yếu tố được chúng tôi được khảo sát đầu tiên [1,2]. Kết quả cho thấy, sau 36 giờ lên men với tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* là 4 log CFU/ml cho hàm lượng axit glucuronic tích lũy cao nhất (81.28 mg/l). Nghiệm thức 3 log CFU/ml cho kết quả thấp hơn (58.24 mg/l), nguyên nhân là do mật độ giống tế bào ban đầu quá ít nên không đủ để hoạt động biến dưỡng sinh axit glucuronic. Đối với các nghiệm thức còn lại, kết quả vẫn thấp hơn nghiệm thức 4 log CFU/ml. Ở các nghiệm thức này, mật độ giống ban đầu quá nhiều nên xảy ra sự cạnh tranh dinh dưỡng dẫn đến sự sinh trưởng và phát triển bị ức chế và đây là nguyên nhân hàm lượng axit glucuronic sinh ra thấp. Vì vậy, tỷ lệ giống vi khuẩn *G. nataicola* được chọn là 4 log CFU/ml.

Bảng 2. Kết quả khảo sát các đơn yếu tố ảnh hưởng khả năng sinh axit glucuronic

Yếu tố	Mức phù hợp	Hàm lượng axit glucuronic (mg/l)
Tỷ lệ <i>G. nataicola</i> (log CFU/ml)	4	81.28
Tỷ lệ <i>L. acidophilus</i> (log CFU/ml)	5	82.84
Hàm lượng sucrose (%)	7.5	92.42
pH ban đầu	5	93.19

Nhiệt độ lên men (°C)	35	93.97
Thời gian lên men (giờ)	36	93.45

Vi khuẩn *L. acidophilus* là chủng vi sinh vật không có khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic. Tuy nhiên, chúng đóng vai trò hỗ trợ vi khuẩn *G. nataicola* nhằm nâng cao khả năng hình thành axit glucuronic trong hệ lên men [5-7]. Hàm lượng axit glucuronic tăng tỷ lệ thuận theo tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus* bổ sung và khi mật độ vi khuẩn *L. acidophilus* hiện diện trong môi trường lên men ban đầu đạt 5 log CFU/ml thì kết hàm lượng axit glucuronic tích lũy thu được là cao nhất (82.84 mg/l). Kết quả này tương tự kết luận của Yang (2010)[6]. Và nếu tăng tiếp tục tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus* thì lượng axit thu nhận giảm và điều này có thể là do hệ quả của việc thiếu hụt chất dinh dưỡng [5,7]. Vậy, tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus* được chọn là 5 log CFU/ml.

Các yếu tố môi trường lên men bao gồm nồng độ sucrose môi trường lên men, pH ban đầu và nhiệt độ lên men đóng vai trò quan trọng để hệ lên men có thể sinh tổng hợp axit glucuronic. Kết quả nghiệm thức cho thấy, lượng sucrose là 7.5% cho lượng axit glucuronic cao nhất (92.42 mg/l) và khi lên ở nghiệm thức pH bằng 5 kết quả thu được là 93.19 mg/l. Hàm lượng axit tiếp tục tăng khi lên men ở 35°C đạt 93.97 mg/l. Kết quả này tương ứng điều pH và nhiệt độ tối thích của cả hai vi khuẩn của hệ lên men. Ngoài ra, thời gian lên men cũng có vai trò quyết định hàm lượng axit

glucuronic thu được khi nào là cao nhất. Hàm lượng axit cao nhất là sau 36 giờ lên men đạt 93.45 mg/l. Vậy, các yếu tố còn lại có nghiệm thức được chọn là 10% sucrose, pH ban đầu là 5, lên men ở 35°C trong vòng 36 giờ.

Từ các kết quả khảo sát trên cho thấy các yếu tố đều ảnh hưởng đến khả năng lên men thu nhận axit glucuronic. Các yếu tố này tiếp tục được sàng lọc bằng mô hình Plackett – Burman để xác định rõ mức độ ảnh hưởng đến quá trình lên men thu nhận axit glucuronic trên môi trường nước dừa già.

3.2 Ma trận Plackett – Burman sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh axit glucuronic

Mục đích của quá trình sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng là xác định các yếu tố tác động mạnh và loại bỏ các yếu tố ít hoặc không tác động đến đối tượng nghiên cứu. Vì thế, bước này có ý nghĩa đơn giản hóa quá trình thí nghiệm và tiết kiệm chi phí.

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) để xác định mức ảnh hưởng và độ tin cậy được của quá trình sàng lọc 6 yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh axit glucuronic bằng ma trận Plackett – Burman được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố ảnh hưởng

Yếu tố	Mức ảnh hưởng	Độ tin cậy (p)
Tỷ lệ vi khuẩn <i>G. nataicola</i>	11.0	0.0052
Tỷ lệ vi khuẩn <i>L. acidophilus</i>	6.08333	0.0473
Hàm lượng sucrose	6.94333	0.0306
pH lên men	-1.59667	0.5229
Nhiệt độ lên men	-19.02	0.0004
Thời gian lên men	-2.80333	0.2820

Kết quả phân tích phương sai cho thấy có 4 yếu tố có độ tin cậy $p \leq 0.05$ là tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola*, tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus*, hàm lượng sucrose lên men, nhiệt độ lên men. Điều này cho thấy, 4 yếu tố này thực sự có ảnh hưởng mạnh đến khả năng thu nhận axit glucuronic. Vì thế, 4 yếu tố là tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola*, tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus*, hàm lượng sucrose và nhiệt độ lên men sẽ được đưa vào quá trình tối ưu hóa RSM-CCD với hàm mục tiêu là lượng acid glucuronic tổng hợp được sau khi lên men. Kết quả khảo sát mục 3.1 cho thấy pH và thời gian lên men có ảnh hưởng đến hàm mục tiêu. Tuy nhiên, thực nghiệm sàng lọc Plackett- Burman cho phép xác định mức ảnh hưởng và cho thấy 2 yếu tố này có ít ảnh hưởng có thể loại đi để tiến hành các thí nghiệm sâu hơn với các biến được giữ lại có mức ảnh hưởng mạnh. Vậy 4 yếu tố X_1, X_2, X_3, X_4 lần lượt là tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola*, tỷ lệ vi khuẩn

L. acidophilus, hàm lượng sucrose lên men và nhiệt độ lên men được lựa chọn cho mô hình RSM-CCD tiếp theo.

3.3 Mô hình RSM – CCD tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh axit glucuronic

Mô hình RSM – CCD được xây dựng để mô phỏng lượng axit glucuronic sinh ra trong quá trình lên men nước dừa già với X_1, X_2, X_3, X_4 lần lượt là tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola*, tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus*, hàm lượng sucrose lên men và nhiệt độ lên men. Từ mô hình này, chúng ta có thể xác định điểm tối ưu cho hàm lượng axit glucuronic cực đại. Kết quả thực nghiệm RSM – CCD gồm 26 thí nghiệm. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) đánh giá mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy tương tác của 26 thí nghiệm này được trình bày ở bảng 4 và 5.

Bảng 4. Kết quả thực nghiệm tối ưu hoá theo phương pháp RSM – CCD

Thứ tự thí nghiệm	Yếu tố				Y Acid glucuronic (mg/l) thực nghiệm	Y Acid glucuronic (mg/l) mô hình
	X_1	X_2	X_3	X_4		
1	2	7	2.5	25	43.75	42.51
2	6	5	7.5	35	82.84	88.01
3	6	3	2.5	45	12.68	4.95
4	6	7	2.5	25	63.42	61.21
5	2	5	7.5	35	76.88	75.81
6	6	3	2.5	25	36.76	45.13
7	2	3	2.5	25	25.37	21.31
8	4	7	7.5	35	88.27	90.71
9	6	7	12.5	25	72.22	71.18
10	4	5	7.5	45	46.34	51.19
11	2	7	12.5	45	30.81	24.48
12	2	3	12.5	25	36.76	39.32
13	6	7	12.5	45	24.08	25.05
14	2	3	12.5	45	20.71	19.85
15	2	7	12.5	25	34.69	39.35
16	2	7	2.5	45	34.95	38.19
17	4	5	7.5	35	64.20	65.22

18	2	3	2.5	45	9.32	12.40
19	6	3	12.5	45	22.26	25.54
20	6	7	2.5	45	26.15	25.64
21	4	5	2.5	35	79.99	80.02
22	6	3	12.5	25	82.58	76.30
23	4	3	7.5	35	78.70	80.36
24	4	5	7.5	25	79.47	78.71
25	4	5	7.5	35	96.56	93.67
26	4	5	7.5	35	95.52	93.67

Bảng 5. Mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố

Yếu tố	Mức ảnh hưởng	Độ tin cậy	Yếu tố	Mức ảnh hưởng	Độ tin cậy
X ₁	39.3702	0.0013	X ₁ X ₄	-0.390719	0.0003
X ₂	26.1487	0.0039	X ₂ X ₂	-2.03264	0.0464
X ₃	9.62445	0.0105	X ₂ X ₃	-0.529188	0.0049
X ₄	20.3956	0.0000	X ₂ X ₄	0.0575312	0.4613
X ₁ X ₁	-2.93889	0.0078	X ₃ X ₃	-0.3716	0.0001
X ₁ X ₂	-0.319531	0.4145	X ₃ X ₄	-0.0527625	0.1079
X ₁ X ₃	0.328312	0.0520	X ₄ X ₄	-0.287156	0.0000

Kết quả phân tích cho thấy có 10 trường hợp đạt độ tin cậy $p \leq 0.05$ và các yếu tố này sẽ được đưa vào phương trình hồi quy. Hệ số hồi quy (R^2) tính được là 0.954624, tức có 95.4624% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu mô hình phỏng đoán. Theo Castillo (2007), $R^2 > 0.75$ thì mô hình tương thích với thực nghiệm nên điều này cho thấy sự tương quan giữa các yếu tố thí nghiệm với hàm lượng axit glucuronic sinh ra là rất chặt chẽ [12]. Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = -435.21 + 39.3702X_1 + 26.1487X_2 + 9.62445X_3 + 20.3956X_4 - 2.93889X_1^2 - 0.390719$$

$$X_1 X_4 - 2.03264X_2^2 - 0.529188 X_2 X_3 - 0.3716 X_3^2 - 0.287156 X_4^2$$

Phương trình hồi quy cho thấy có 4 yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh axit glucuronic là tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola*, tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus*, hàm lượng sucrose lên men và nhiệt độ lên men.

Nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn vì nó tác động trực tiếp đến khả năng tồn tại và phát triển của hai vi khuẩn *G. nataicola* và *L. acidophilus*, hệ cộng sinh tiết ra axit glucuronic. Nhiệt độ càng tăng thì hàm lượng axit glucuronic càng giảm nhưng

giảm đến một giới hạn nào đó thì sẽ ảnh hưởng ngược lại [7,9]. Khoảng nhiệt độ khảo sát của thí nghiệm là từ 25 đến 45°C. Trong khi đó vi khuẩn *G. nataicola* là chủng vi khuẩn sinh trưởng ở khoảng nhiệt độ tối ưu từ 12 đến 35°C [13]. Vì thế, nhiệt độ càng tăng cao theo từng mức độ thí nghiệm sẽ ức chế vi khuẩn *G. nataicola* sinh axit glucuronic dẫn đến hàm lượng axit thu nhận thấp. Ngược lại, vi khuẩn *L. acidophilus* là vi sinh vật có nhiệt độ tối thích là 37°C [14]. Cho nên, nếu nhiệt độ giảm quá thấp sẽ gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *L. acidophilus* và ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic của cả hệ cộng sinh.

Yếu tố hàm lượng sucrose hiện diện trong cơ chất lên men nước dừa già cũng ảnh hưởng đến khả năng hình thành axit glucuronic. Hàm lượng sucrose vừa đủ sẽ đáp ứng nhu cầu của hệ vi khuẩn *G. nataicola* và *L. acidophilus*, giúp chúng sinh trưởng và phát triển bình thường. Nếu hàm lượng sucrose vượt quá mức nhu cầu của chúng sẽ gây tác động tế bào gây mất nước làm ảnh hưởng đến khả năng trao đổi chất, từ đó làm giảm khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic. Ngược lại, hàm lượng sucrose quá thấp sẽ không đủ để cung cấp cho hoạt động biến dưỡng của chúng và lượng axit sinh ra thấp [8,9].

Vi khuẩn *L. acidophilus* có vai trò hỗ trợ vi khuẩn *G. nataicola* biến dưỡng sinh axit glucuronic nên tỷ lệ *L. acidophilus* khởi động quá trình lên men cũng là yếu tố có ảnh hưởng nhất định đến khả năng sinh axit [5-7]. Trong thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy hàm lượng axit sinh ra tăng tỷ lệ thuận với tỷ lệ vi khuẩn *L. Acidophilus* bổ sung nhưng khi tăng đến một giới hạn sẽ ức chế ngược trở lại khả năng sinh axit glucuronic. Kết quả này tương tự kết luận của Yang (2010)[5] và của Ly (2014)[6]. Điều này có thể giải thích dựa vào sự thích nghi của hai vi khuẩn *G. nataicola* và *L. acidophilus*. Vi khuẩn *L. acidophilus* có pha thích nghi và tăng trưởng

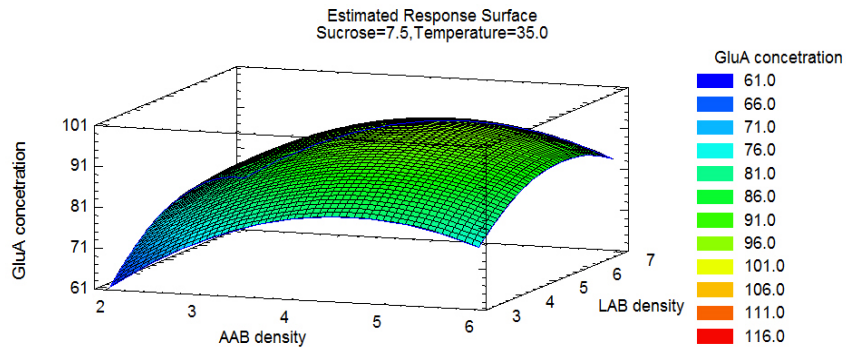
nhanh hơn so với vi khuẩn *G. nataicola* nên chúng sẽ phân giải lượng sucrose và các chất dinh dưỡng trong môi trường lên men thành các chất đơn giản hơn. Vi khuẩn *G. nataicola* sinh trưởng sau sẽ tận dụng các chất phân giải có sẵn trong môi trường lên men để đi vào chu trình pentophosphat sinh tổng hợp axit glucuronic. Hơn nữa, việc sử dụng các chất do vi khuẩn *L. acidophilus* phân cắt sẵn sẽ giúp vi khuẩn *G. nataicola* không phải sử dụng nguồn enzyme trong quá trình phân giải cơ chất nên nguồn enzyme này được tận dụng để sinh tổng hợp axit glucuronic dẫn đến việc tăng hàm lượng axit tích lũy. Nhưng nếu tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus* ban đầu quá nhiều sẽ dẫn đến thiếu hụt nguồn dinh dưỡng dẫn đến việc cả hai vi khuẩn *G. nataicola* và *L. acidophilus* bị ức chế sinh trưởng và khả năng sinh axit glucuronic giảm [3,6,7].

Tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* đóng vai trò tất yếu trong hệ lên men sinh axit glucuronic vì vi khuẩn *G. nataicola* là đối tượng trực tiếp sinh ra axit này. Theo kết quả tối ưu hóa, tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* tăng tỷ lệ thuận với hàm lượng axit glucuronic và điều này từng được đề cập trong nghiên cứu của Khan (2008)[1]. Nhưng đến một giới hạn sẽ có ảnh hưởng gây ức chế lại. Điều này là do khi bổ sung tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* quá nhiều sẽ dẫn đến việc cạnh tranh và thiếu chất dinh dưỡng trong môi trường lên men. Hệ quả là hệ cộng sinh vi khuẩn *G. nataicola* và *L. acidophilus* sẽ bị ức chế sinh trưởng và giảm hoặc không có khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic. Kết quả này tương tự kết quả của Ly và cộng sự (2014)[6].

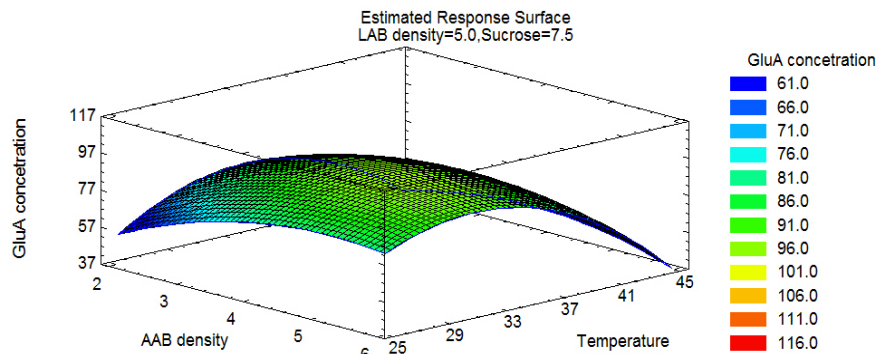
Kết quả quy hoạch thực nghiệm RSM – CCD cho thấy được sự tương tác giữa các yếu tố với nhau. Mức độ tương tác giữa hai yếu tố tỷ lệ vi khuẩn *G. Nataicola* và tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus* được thể hiện ở biểu đồ bề mặt đáp ứng được trình bày ở bảng 6 và hình 1.

Bảng 6. Tọa độ các giá trị tối ưu thu nhận acid glucuronic

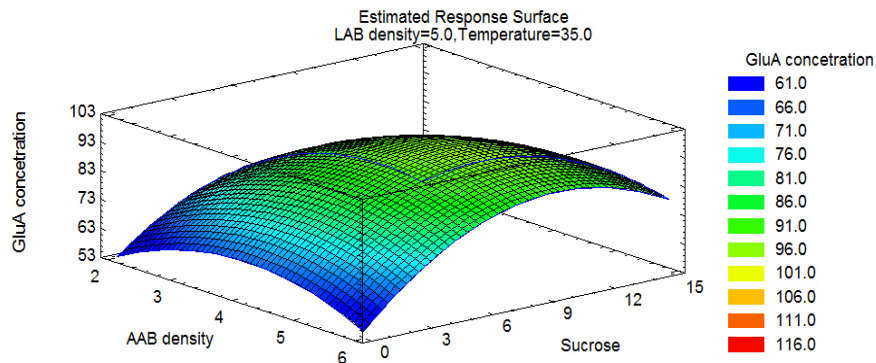
Yếu tố	Thấp	Cao	Tọa độ điểm tối ưu
Tỷ lệ <i>G. nataicola</i> (logCFU/ml)	2	6	4.78565
Tỷ lệ <i>L. acidophilus</i> (logCFU/ml)	3	7	5.33774
Hàm lượng sucrose (%)	2.5	12.5	8.99457
Nhiệt độ (°C)	25	45	31.9649



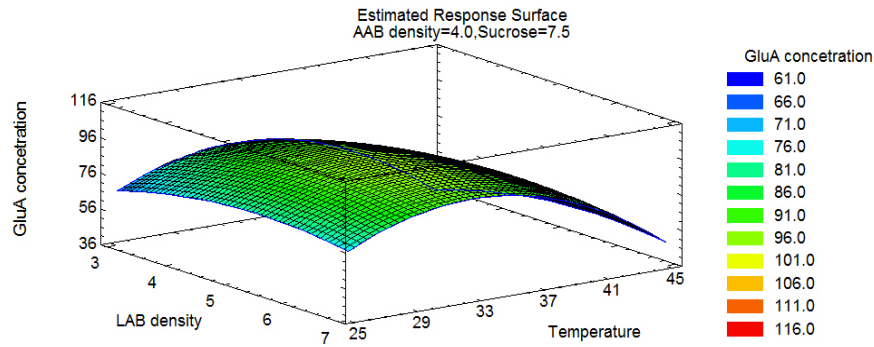
Hình 1. Mặt đáp ứng tương tác giữa tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* và tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus*



Hình 2. Mặt đáp ứng tương tác giữa tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* và nhiệt độ



Hình 3. Mặt đáp ứng tương tác giữa tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* và sucrose



Hình 4. Mặt đáp ứng tương tác giữa tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus* và nhiệt độ

Các giá trị tối ưu được thể hiện trên mặt phẳng đáp ứng lần lượt theo từng cặp nhằm cho thấy sự tương tác qua lại giữa các yếu tố ảnh hưởng (hình 1- 4).

Từ bề mặt đáp ứng, chúng tôi dự đoán hàm lượng axit glucuronic cực đại là 98.0401 mg/l tại các tọa độ yếu tố khảo sát là tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* 4.79 logCFU/ml, tỷ lệ khuẩn *L. acidophilus* 5.34 logCFU/ml, 8,99% sucrose, nhiệt độ lên men 31.96°C. Tiến hành thực nghiệm tại các điểm tối ưu, hàm lượng axit glucuronic thu được là 94.23 mg/l, đạt độ tương đồng so với mô hình là 96%. Kết quả nghiên cứu này cao hơn kết quả của Ly (2014)[6] tối ưu hóa trên môi trường sữa đạt 59,81 mg/l.

4. KẾT LUẬN

Axit glucuronic là một hợp chất có dược tính quý giá rất có lợi cho sức khỏe con người. Vì thế,

việc ứng dụng công nghệ vi sinh lên men trên cơ chất giá thành rẻ thu axit glucuronic hàm lượng cao là việc rất có ý nghĩa thiết thực. Việc tối ưu hóa quá trình lên men cơ chất nước dừa già bởi hai vi khuẩn *G. nataicola* và *L. acidophilus* nhằm đáp ứng mục tiêu thu nhận axit glucuronic với hiệu suất cao và giá thành thấp. Quá trình tối ưu hóa các điều kiện lên men thu nhận axit glucuronic trên cơ chất nước dừa già được thực hiện bằng phương pháp đáp ứng bề mặt theo cấu trúc có tâm thu được các kết quả hàm lượng axit glucuronic cực đại là 94.23 mg/l tại các điểm tối ưu: tỷ lệ vi khuẩn *G. nataicola* là 4.79 logCFU/ml, tỷ lệ vi khuẩn *L. acidophilus* là 5.34 logCFU/ml, hàm lượng sucrose bổ sung 8.99 %, nhiệt độ lên men 31.96°C. Mức độ tương đồng khi áp dụng mô hình lên men này là 96% so với lý thuyết.

Optimization of affecting factors to glucuronic acid production in mature coconut fermentation

- **Nguyen Thuy Huong**
- **Ha Thien Huong**

Ho Chi Minh city University of Technology, VNU-HCM

ABSTRACT

*The process of mature coconut water fermentation by the complex of two bacteria strains *Gluconacetobacter nataicola* and *Lactobacillus acidophilus* in order to get high glucuronic acid concentration was studied. A Blackett – Burman matrix was designed to study the factors that affect glucuronic acid formation. After screening, four factors included *G. Nataicola* density, *L. acidophilus* density, sucrose concentration and temperature that have strongly contributed to glucuronic acid*

*formation was selected to design a matrix for modeling optimal point. The result of Response surface methodology (RSM) with Central composite design (CCD) showed the maximum value of glucuronic acid concentration 94.23mg/l at 4.79 logCFU/ml *G. Nataicola* density, 5.34 logCFU/ml *L. acidophilus* density, 8.99 % sucrose and incubation at 31.96°C, respectively. The highest value of glucuronic acid concentration in the practical model was 94.23 mg/l.*

Keywords: *glucuronic acid , *Gluconacetobacter nataicola*, *Lactobacillus acidophilus*, Plackett-Burman, RSM-CCD.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Taous Khan, Salman Khan, Joong Kon Park, Simple Fed-batch Cultivation Strategy for the Enhanced Production of a Single-sugar Glucuronic Acid-based Oligosaccharides by a Cellulose-producing *Gluconacetobacter hansenii* Strain. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2008, 13: 240-247 (2008)
- [2]. Nafiseh Yavari, Mahnaz Mazaheri Assadi, Kambiz Larijani, Mohammad Bamani Moghadam, Response Surface Methodology for Optimization of Glucuronic Acid Production Using Kombucha Layer on Sour Cherry Juice. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(8): 3250-3256, ISSN 1991-8178 (2010)
- [3]. Nafiseh Yavari, Mahnaz Mazaheri Assadi, Mohammad Bamani Moghadam, Kambiz Larijani, Optimizing Glucuronic Acid Production Using Tea Fungus on Grape Juice by Response Surface Methodology. *Australian Journal of Basic and Applied*

- Sciences*, 5(11): 1788-1794, ISSN 1991-8178 (2011)
- [4]. Ilmāra Vīna, Raimonds Linde, Artūrs Patetko, Pāvēls Semjonovs, Glucuronic acid from fermented beverages: biochemical functions in humans and its role in health protection. *IJRRAS* 14 (2), pp. 217-230 (2013)
- [5]. Zhiwei Yang, Feng Zhou, Baoping Ji, Bo Li, Yangchao Luo, Li Yang, Tao Li, Symbiosis between Microorganisms from Kombucha and Kefir: Potential Significance to the Enhancement of Kombucha Function. *Appl Biochem Biotechnol* Doi 10.1007/s12010-008-8361-6 (2010)
- [6]. Huong H.L Ly, Huong T. Nguyen, Optimization of Factors Affecting Glucuronic Acid Production in Yogurt Fermentation. *International Journal Of Modern Engineering Research (IJMER)*, vol.6, iss.6, ISSN: 2249-6645 (2014)
- [7]. Nguyen K. Nguyen, Ngan T.N. Dong, Huong T. Nguyen, Phu H. Le, Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of Kombucha. *Spingerplus*, 49:1. Doi 10.1186/s40064-015-0872-3 (2015)
- [8]. Kongruang S., Bacteria cellulose production by *Acetobacter xylinum* strain from agricultural waste products. *Appl Biotechnol* 148(1:3): 245-256. doi:10/S0079-6700(01)00021-1(2008)
- [9]. Yuliana N., Rangga A., Rakhmiati, Manufacture of fermented coco milk-drink containing lactic acid bacteria cultures. *African Journal of Food Science* Vol. 4 (9), pp.558-562. ISSN. 1996-0794.s (2010)
- [10]. Lee P. R., Boo C. X., Liu S. Q., Fermentation of coconut water by probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* L10 and *Lactobacillus casei* L26. *Ann Microbiol* 63: 1441-1450 (2013)
- [11]. Huong H. L. Ly, Huong T. Ha, Huong T. Nguyen, Isolation and Identification High-Biological Activity Bacteria In Yogurt Quality Improvement, 2014, *IJMER*, vol.4, Iss.8, ISSN : 2249-6645 (2014)
- [12]. Castillo E Del, Process Optimization A Statistical Approach. Springer Science. *New York, USA*: 118-122 (2007)
- [13]. Frateur. *Taxonomy of acetic acid bacteria*. (1950)
- [14]. Axelsson, Lars. *Acid lactic Bacteria: Classification and Physiology*. Acid lactic Bacteria microbiological and Functional Aspects. Third Edition, Revised and Expanded MATFORSK, Norwegian Food Research Institute, Norway, pp.19-67 (2004)