

Nghiên cứu quá trình lên men Axit Lactic từ dịch nhựa cây Đoác (*Arenga Pinnata*) bằng chủng *Lactobacillus Casei*

- Đặng Minh Nhật
- Nguyễn Quang Trung

Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

(Bài nhận ngày 09 tháng 08 năm 2014, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 29 tháng 09 năm 2014)

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu suất lên men axit lactic từ dịch nhựa cây đoác bằng chủng *Lactobacillus casei*. Dịch nhựa cây đoác sau khi thu hoạch, xử lý được bổ sung amoni sulphat, canxi cacbonat và giống đã được tăng sinh ở mức 10^9 tế bào/ml để lên men axit lactic. Kết quả cho thấy tỷ lệ giống bổ sung, hàm lượng amoni sulphat, canxi cacbonat và thời gian lên men có ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng axit lactic sinh tổng hợp

được. Tỷ lệ giống, hàm lượng amoni sulphat và canxi cacbonat bổ sung thích hợp nhất được xác định lần lượt là: 5%, 3,0 g/l và 4,0 g/l. Bên cạnh đó, thời gian lên men phù hợp nhất ở những điều kiện như trên được xác định là 100 h, khi đó lượng axit lactic đo được trong canh trường đạt mức 22,30 g/l. *Lactobacillus casei* được đánh giá có khả năng lên men axit lactic từ dịch nhựa cây đoác kém hơn *Lactobacillus plantarum*.

1. GIỚI THIỆU

Cây đoác có tên khoa học là *Arenga pinnata* (Wurmb) Merr, nguồn gốc từ các nước nhiệt đới Châu Á [1]. Ở Việt Nam, đoác mọc nhiều ở chân núi ẩm, trong thung lũng núi đá vôi miền trung du, trong rừng thứ sinh ở hầu khắp các vùng đồi núi của nước ta, đặc biệt mọc nhiều trong dãy Trường Sơn ở các tỉnh từ Quảng Bình cho đến Quảng Ngãi và được bà con các dân tộc Cờ Tu, Ve... khai thác lấy dịch nhựa uống hoặc làm rượu.

Đây là loại cây có nhiều tiềm năng ứng dụng như để làm thực phẩm, làm thuốc, làm vật liệu xây dựng...[2]. Tuy nhiên, ở nước ta hầu như chưa có công trình nào nghiên cứu khai thác loại cây này

phục vụ phát triển kinh tế, đặc biệt là kinh tế ở các vùng miền núi, vốn gặp nhiều khó khăn do đất đai không phù hợp để phát triển các loại cây công nghiệp có giá trị.

Kết quả của một nghiên cứu thực hiện tại Indonesia cho thấy dịch nhựa chứa trung bình 12% đường, mỗi ngày thu 12 lít dịch nhựa, tức 1,44 kg đường/ngày. Cây khai thác được 3 năm trong suốt vòng đời 12 năm, mỗi năm khai thác được 4 tháng. Tổng lượng đường mỗi cây sản xuất trong 3 năm khoảng 520 kg. Với 200 cây, mỗi hecta thu được 104 tấn đường thì sản lượng đường thu được tính trung bình cho cả 12 năm trồng và khai thác cây là 8,66 tấn/ha. Năng suất này tương

đương với năng suất trồng mía và nếu cải tiến phương pháp gieo hạt, trồng trọt, hiệu quả có thể còn cao hơn nữa [2].

Với hàm lượng đường cao như vậy, đoác có tiềm năng lớn để làm nguyên liệu lên men sản xuất axit lactic. Đây là một axit hữu cơ có trong tự nhiên và được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và các ngành khác, kể cả công nghiệp mỹ phẩm và dược phẩm, để sản xuất các hóa chất và chất điều hòa sinh trưởng. Hiện tại nhu cầu về axit lactic đang tăng mạnh kể từ khi có những công bố về những đặc tính quý của nhựa sinh học Poly-lactic acid và công nghệ sản xuất. PLA là loại polyme sản xuất từ axit lactic, có khả năng tự phân hủy nhanh, thân thiện môi trường, tương thích sinh học nên có thể làm nhựa tự phân hủy, làm vật liệu sinh học... và có thể thay thế các loại nhựa sản xuất từ dầu mỏ [3].

Mục đích nghiên cứu của chúng tôi nhằm đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả quá trình lên men axit lactic từ dịch nhựa cây đoác bằng chủng *Lactobacillus casei*, qua đó đánh giá khả năng sử dụng nhựa cây đoác và chủng vi khuẩn này để sản xuất axit lactic.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Dịch nhựa đoác được lấy từ miền núi của huyện Nam Giang, tỉnh Quảng Nam. Dịch nhựa được chứa vào các chai nhựa 1.5 l, bổ sung 50 ppm SO₂ dưới dạng muối Na₂S₂O₅ giữ trong thùng lạnh ở 4 – 6 °C trong suốt quá trình vận chuyển. Mẫu được bảo quản ở điều kiện lạnh đông cho đến khi sử dụng.

- Thành phần và tính chất của dịch đoác được xác định trong nghiên cứu trước [4] được trình bày ở Bảng 1.

- Chủng vi khuẩn lactic *Lactobacillus casei* của Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng.

Bảng 1. Tính chất của dịch nhựa cây [4]

STT	Tính chất	Đơn vị	Kết quả
1	pH		5,2
2	Bx	%	11,4
2	Kh. lượng riêng	g/l	1,0287
3	Acid tổng	% a.lactic	0,15
4	Đường tổng	%	10,67
5	Đường khử	%	3,81
6	Protein	%	0,320

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Định lượng axit lactic bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC

Theo phương pháp của Wentao Bi [5], có chỉnh sửa:

- *Chuẩn bị mẫu*: Ly tâm dịch lên men, lấy dịch trong đi kết tủa protein bằng cồn. Tách kết tủa, điều chỉnh pH về 5.0 bằng NaOH. Mẫu được đưa qua cột chiết pha rắn (Phenomenex). Rửa tạp chất bằng 4 ml nước, dùng HCl 0.5M rửa giải. Lọc qua màng cellulose 0.45µm trước khi phân tích trên HPLC.

- *Phương pháp HPLC*: Sử dụng hệ thống HPLC Ultimate 3000 (Dionex) với cột C18 (4.6mm x 100mm, 3µm), detector UV đo ở bước sóng 254 nm. Pha động gồm H₂O :acetonitril :H₃PO₄ (10 :1 :0,1 v/v), vận tốc dòng 0,5 ml/phút. Đường chuẩn được xây dựng với chất chuẩn axit lactic 85% (Aldrich). Thời gian lưu của axit lactic là 3,06 phút.

2.2.2 Hoạt hóa và nhân giống *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei từ ống nghiệm được hoạt hóa bằng môi trường MRS Broth, sau đó nhân giống cũng trong môi trường MRS Broth nhưng có bổ sung thêm 5% thể tích dịch nhựa đoác. Quá trình nhân giống được thực hiện trong bình tam giác trong thời gian 24-30h ở 37°C đến khi đạt mật độ tế bào ở mức 10^9 tế bào/ml.

2.2.3 Lên men axit lactic

Dịch nhựa đoác được chuẩn hóa đến Bx 11.4 (± 0.1) bằng đường sacaroza. Bổ sung CaCO_3 4 g/l, amoni sulphat 2 g/l và điều chỉnh pH đến 6 - 6.2 bằng NaOH 2N. Thanh trùng ở 95 °C trong 10 phút, sau đó cấy vi khuẩn đã được tăng sinh đến mật độ 10^9 tế bào/ml.

Giống được bổ sung vào môi trường ở các mức 1%, 3%, 5%, 7%, 9% (v/v), tương ứng với mật độ tế bào trong dịch lên men khoảng 1.10^7 , 3.10^7 , 5.10^7 , 7.10^7 , 9.10^7 (tế bào/ml), để chọn ra tỷ lệ giống thích hợp nhất.

Quá trình lên men kỵ khí thực hiện trong các bình tam giác 200 ml và 1000 ml (chỉ dùng trong

nghiên cứu thời gian lên men) ở điều kiện lắc nhẹ (100 vòng/phút), nhiệt độ 37 °C [6]. Định kỳ lấy 10 ml dịch lên men đi phân tích xác định hàm lượng axit lactic.

2.2.4 Xử lý thống kê: bằng phương pháp Fisher (LSD Test) sử dụng phần mềm Minitab 16, phiên bản 16.2.0

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ giống bổ sung vào môi trường lên men đến hàm lượng axit lactic tạo thành

Tiến hành lên men 100 ml môi trường dịch nhựa đoác đã điều chỉnh Bx đến 11.4 (± 0.1), bổ sung CaCO_3 4g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/l và điều chỉnh pH đến 6 - 6.2 bằng NaOH 2N. Quá trình lên men kỵ khí được thực hiện ở nhiệt độ 37 °C trong 72h như trình bày ở mục 2.2.3. Tỷ lệ giống bổ sung vào môi trường lên men được thay đổi theo các mức 1%, 3%, 5%, 7%, 9% (v/v). Thí nghiệm được thực hiện với 2 lần lặp, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Sự thay đổi nồng độ axit lactic canh trường ở các mức tỷ lệ giống bổ sung khác nhau

Tỷ lệ giống (v/v)	1%	3%	5%	7%	9%
Axit lactic (g/l)	9,30 \pm 0,25 ^a	12,93 \pm 0,47 ^b	18,96 \pm 0,49 ^c	15,18 \pm 0,02 ^d	9,62 \pm 0,11 ^d

* Các chữ cái khác nhau khác nhau thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Trong phạm vi thay đổi của tỷ lệ giống từ 1-5%, lượng axit lactic tổng hợp được tăng dần theo lượng giống bổ sung và đạt cực đại tại 5%. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng tỷ lệ giống từ 7%-9% thì hàm lượng axit lactic giảm.

Kết quả này cũng tương tự như trong nghiên cứu của Aleksandra P. Djukic và cộng sự (2012) về quá trình lên men lactic từ bã rượu, với hàm lượng axit lactic đạt cao nhất (18,58 g/l) khi tỷ lệ giống bổ sung là 5% [7]. Theo nghiên cứu này, khi

bổ sung giống quá nhiều, số lượng tế bào đo được giảm đi so với ở mức tỷ lệ giống 5% do sự thiếu hụt cơ chất, dẫn đến hàm lượng axit lactic sinh ra cũng ít hơn. Tỷ lệ giống bổ sung vào dịch lên men 5% được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. 3.2. Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng amoni sulphat bổ sung vào môi trường lên men đến hàm lượng axit lactic tạo thành

Ngoài cacbon, thành phần nitơ của môi trường là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng

và phát triển của vi khuẩn. Tuy nhiên, do hàm lượng nitơ tổng trong dịch nhựa thấp, vì vậy chúng tôi sử dụng amoni sulphat làm nguồn nitơ bổ sung.

Thí nghiệm được thực hiện tương tự như trên với tỷ lệ bổ sung amoni sulphat thay đổi từ 1-5 g/l, thời gian lên men 72 giờ. Thí nghiệm được lặp 2 lần, kết quả tính giá trị trung bình và xử lý thống kê được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng amoni sulphat đến lượng axit lactic sinh tổng hợp

Amoni sulphat (g/l)	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
Axit lactic (g/l)	10,11±0,89 ^a	17,63±0,14 ^b	19,05±0,36 ^b	16,08±0,05 ^{ab}	12,64±4,17 ^a

* Các chữ cái khác nhau khác nhau thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Bảng 3 cho thấy khi tăng lượng amoni sulphat bổ sung vào môi trường đến mức 3,0 g/l, hàm lượng axit lactic trong dịch lên men tăng. Do nitơ là thành phần cần thiết để xây dựng tế bào vi sinh vật, nên việc cung cấp đầy đủ thành phần nitơ có tác dụng thúc đẩy sự phát triển của chúng, tạo ra nhiều sản phẩm trao đổi chất. Hàm lượng axit lactic trong dịch lên men đạt cực đại tại 3,0 g/l tương ứng với hàm lượng axit lactic trong dịch lên men là 19,05 g/l. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng lượng amoni sulphat, lượng ion sulphat còn lại (sau khi ion amoni bị chuyển hóa) sẽ làm môi trường bị axit hóa nhiều hơn, có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn lactic.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Aicha Nancib và cộng sự [8] khi khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung và vitamin B đến quá trình lên men lactic bởi chủng *Lb. casei*. Aicha Nancib cho rằng nếu sử dụng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ làm nguồn nitơ bổ sung với lượng 2,6 g/l, đồng thời cung cấp đầy đủ vitamin B sẽ giảm đáng kể chi phí sử dụng dịch chiết nấm men và lượng axit lactic tạo thành thấp

hơn không đáng kể so với trường hợp chỉ sử dụng dịch chiết nấm men làm nguồn nitơ duy nhất.

Hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bổ sung 3,0 g/l được chọn cho khảo sát tiếp theo.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng canxi cacbonat bổ sung vào môi trường lên men đến hàm lượng axit lactic tạo thành

Vi khuẩn lactic thích nghi với môi trường pH axit yếu. Tuy nhiên, khi lên men do tích lũy axit nên pH của môi trường giảm xuống, kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn, ngừng quá trình sản xuất axit lactic. Do đó, để trung hòa môi trường NaOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hoặc cacbonat canxi thường được sử dụng.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi dùng CaCO_3 và khảo sát lượng bổ sung trong phạm vi 2-6 g/l. Thí nghiệm được tiến hành tương tự như trên. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng canxi cacbonat đến hàm lượng axit lactic sinh tổng hợp

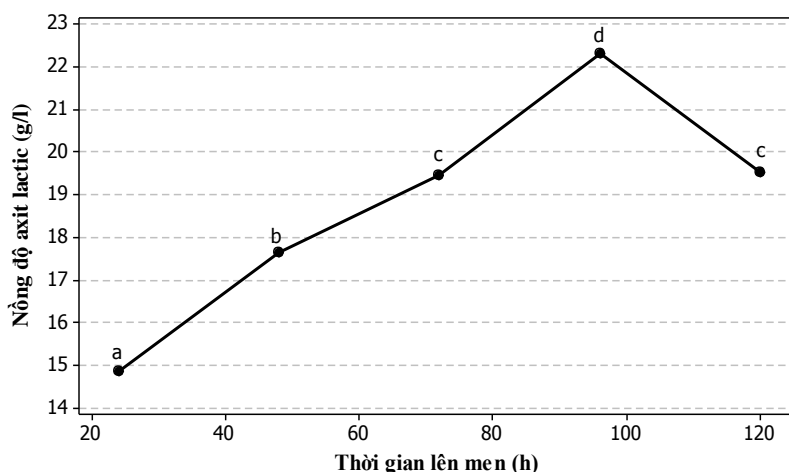
Canxi cacbonat (g/l)	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
Axit lactic (g/l)	16,35±0,19 ^a	18,62±0,28 ^{bc}	19,13±0,03 ^c	18,34±0,34 ^b	16,21±0,4 ^a

* Các chữ cái khác nhau khác nhau thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Từ kết quả ở bảng trên, chúng ta có thể thấy CaCO_3 khi bổ sung ở lượng phù hợp sẽ tác động tốt đến quá trình lên men, tăng lượng sản phẩm tạo thành. Khi tăng nồng độ CaCO_3 từ 2 - 4 g/l, hàm lượng axit lactic tăng dần. Lượng CaCO_3 4g/l đủ để trung hòa lượng axit lactic sinh ra, nên axit lactic sinh tổng hợp trong dịch lên men đạt hàm lượng cao nhất (19,13 g/l). Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng lượng CaCO_3 , hàm lượng axit lactic tạo thành lại làm giảm đi, có thể do CaCO_3 đã quá nhiều nên làm giảm sự tiếp xúc với môi trường của vi khuẩn, làm quá trình trao đổi chất bị hạn chế. Lượng CaCO_3 bổ sung ở mức 4 g/l được chọn cho khảo sát tiếp theo.

3.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men đến hàm lượng axit lactic tạo thành

Tiến hành thí nghiệm tương tự như trên với tỷ lệ giống 5%, lượng amoni sulphat bổ sung 3,0 g/l, lượng canxi cacbonat bổ sung 4,0 g/l, thể tích dịch lên men được sử dụng là 500 ml. Trong quá trình lên men mẫu được lấy tại các thời điểm khác nhau từ 24 giờ đến 120 giờ để phân tích hàm lượng axit lactic. Thí nghiệm được thực hiện với hai lần lặp, giá trị trung bình và kết quả xử lý thống kê được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hàm lượng axit lactic sinh tổng hợp.

* Các chữ cái khác nhau khác nhau thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Hình 1 cho thấy hàm lượng axit lactic sinh tổng hợp tăng liên tục một cách rõ rệt trong suốt thời gian đầu của quá trình lên men. Hàm lượng axit lactic đo được tăng từ 14,85 g/l đến 22,30 g/l

ở thời điểm đạt cực đại lúc 100 h. Tuy nhiên ở giai đoạn cuối, lượng axit lactic đo được lại giảm xuống, chỉ còn 17,64 g/l ở thời điểm 120 giờ. Chúng tôi không ghi nhận sự xuất hiện của pha

thích nghi, chứng tỏ vi khuẩn đã được hoạt hóa tốt, thích nghi nhanh với môi trường dịch đoác. Tuy nhiên ở giai đoạn cuối, có thể do sự tụt giảm mạnh của pH [7], axit lactic ở dạng không phân ly xuất hiện nhiều và đây được cho là tác nhân ức chế vi khuẩn lactic. Với nghiên cứu này thời gian lên men thích hợp là 100 giờ, hàm lượng axit lactic thu được đạt cao nhất 22,30 g/l. Trong một nghiên cứu tương tự của chúng tôi thực hiện với chủng *Lactobacillus plantarum* [4], hàm lượng axit lactic tối đa trong canh trường chúng tôi xác định được là 63,74 g/l, gần gấp 3 lần kết quả trong nghiên cứu này. Như vậy, chủng *Lactobacillus casei* không lên men dịch nhựa cây đoác hiệu quả bằng chủng *Lactobacillus plantarum*.

4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus casei* có khả năng lên men tổng hợp axit lactic từ dịch nhựa cây đoác (*Arenga pinnata*). Trong đó, tỷ lệ giống, hàm lượng bổ sung amoni sulphate, canxi cacbonat và thời gian lên men đóng vai trò quan trọng trong việc làm tăng hàm lượng axit lactic lên men được. Ở điều kiện tốt nhất, hàm lượng axit lactic trong canh trường có thể đạt được là 22,30 g/l. Với hiệu suất tổng hợp axit lactic như vậy, *Lactobacillus casei* không hiệu quả bằng *Lactobacillus plantarum*.

A study on Lactic Acid fermentation of Sugar Palm (*Arenga Pinnata*) sap by *Lactobacillus Casei*

- Đặng Minh Nhật
- Nguyễn Quang Trung

University of Technology and Science, The University of Da Nang- nhatdangminh@gmail.com

ABSTRACT

*This study aimed to evaluate the effect of various factors on the yield of lactic acid fermentation using sap from sugar palm and *Lactobacillus casei*. The sugar palm sap after harvesting, pretreatment was added with ammonium sulphate, calcium carbonate and microbial culture at density of 10^9 cells/ml and let fermented for acid lactic production. The results of the experiments showed that the culture size, amount of added ammonium sulphate and calcium carbonate had significant effect on lactic acid production.*

*The most appropriate parameters determined were culture size of 5%, ammonium sulphate of 3.0 g/l and calcium carbonate of 4.0 g/l. Meanwhile, the optimum period of fermentation was 100 h, which gave the yield of lactic acid production of 22.30 g. *Lactobacillus casei* was considered to have lower ability to effectively produce lactic acid from sugar palm sap compared to *Lactobacillus plantarum**

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. http://en.wikipedia.org/wiki/Arenga_pinnata
Ngày truy cập 5/9/2014.
- [2]. Wolter Elberson, Leo Oyen, Sugar palm (*Arenga pinnata*)-Potential of sugar palm for bio-ethanol production. FACT Project no: 146/WW/001, FACT Foundation (2010).
- [3]. Rafael Auras et al., Poly (lactic acid), Wiley (2010).
- [4]. Đặng Minh Nhật và cộng sự, Ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình lên men axit lactic từ dịch nhựa cây đước bằng chủng *Lactobacillus plantarum*, TC Khoa học và Công nghệ-Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam, 6A(51), tr.315-320, 2013.
- [5]. Wentao Bi, Solid phase extraction of lactic acid from fermentation broth by anion - exchangeable silica confined ionic liquids, *Talanta* 83, 974-979 (2011).
- [6]. Kosugi A., Ethanol and lactic acid production using sap squeezed from old oil palm trunks felled for replanting, *J. Bioscience and Bioengineering* 110 (3), 322-325 (2010).
- [7]. Aleksandra P. Djukić et al., Effect of different fermentation parameters on L-lactic acid production from liquid distillery stillage, *Food Chemistry* 134 (2), 1038-1043 (2012).
- [8]. Aicha Nancib, Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Bioresource Technology* 96, 63-67, (2005).