

Sử dụng ma trận Plackett-Burman và phương pháp đáp ứng bề mặt - phương án cấu trúc có tâm để tối ưu hóa một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus Acidophilus*

- Lý Huỳnh Liên Hương
- Nguyễn Thúy Hương

Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 16 tháng 06 năm 2014, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 29 tháng 10 năm 2014)

TÓM TẮT

Sinh khối của vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* được nghiên cứu thu nhận trong môi trường nước chua tàu hũ bổ sung thêm các thành phần dinh dưỡng và được tối ưu hóa về mặt sinh khối dựa trên ma trận sàng lọc Plackett-Burman và thiết kế mô hình đáp ứng bề mặt (RSM) theo phương án cấu trúc có tâm (CCD). Mật độ vi khuẩn *L. acidophilus* ban đầu cấy vào môi trường nước tàu hũ được xác định trong nghiên cứu là 10^6 CFU/mL với các thành phần bổ sung 17.59% sucrose, 0.37%

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và ủ ở 37°C trong 20h sẽ cho sinh khối khô cao nhất là 0.73 g/100mL. Tỷ lệ tương đồng giữa sinh khối được tạo ra theo thực nghiệm và sinh khối theo lý thuyết tối ưu hóa là 96.05%, đạt 93.58% so với sinh khối thu nhận được trên môi trường MRS. Với tỷ lệ này thì mô hình tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối *L. acidophilus* trên môi trường nước chua tàu hũ có thể áp dụng vào thực tế để sản xuất sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* nhằm tăng giá trị kinh tế và giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Từ khóa: *Lactobacillus acidophilus*, Plackett-Burman, RSM-CCD.

1. MỞ ĐẦU

Vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* từ lâu đã được biết đến là một chủng vi khuẩn có hoạt tính probiotic cao. *L. acidophilus* gắn vào thành ruột, phát triển và chống lại vi khuẩn gây bệnh nhờ vào cơ chế tiết các chất có tính kháng khuẩn, tác động kháng enterotoxin và kích thích

hệ miễn dịch, cạnh tranh vị trí bám dính với các vi khuẩn gây hại và làm thay đổi pH đường ruột [1]. Việc thu nhận sinh khối của *L. acidophilus* cho hiệu suất cao thường được tiến hành trên môi trường MRS, đây là môi trường chuyên biệt cho hầu hết vi khuẩn lactic. Tuy nhiên, để phục vụ cho việc sản xuất sinh khối theo quy mô công

nghiệp thì những môi trường thu nhận sinh khối *L. acidophilus* với giá thành thấp đang được chú trọng nghiên cứu nhằm làm tăng giá trị kinh tế trong sản xuất sinh khối vi sinh vật. Đã có nhiều nghiên cứu thu nhận sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* trên những môi trường lên men có giá thành rẻ nhằm mục đích tiết kiệm chi phí trong sản xuất sinh khối *L. acidophilus* [2].

Nước chua tàu hũ là chất thải của quá trình sản xuất tàu hũ nhưng lại là một môi trường giàu dinh dưỡng cho sự phát triển của vi sinh vật [3]. Vì thế, trong nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất nghiên cứu thu nhận sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* trên môi trường nước chua tàu hũ với mục đích tìm ra môi trường sản xuất sinh khối vi khuẩn với giá thành thấp có thể áp dụng vào quy mô sản xuất lớn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Giống vi sinh vật

Giống vi sinh vật được sử dụng trong nghiên cứu này là giống vi khuẩn *L. acidophilus* có hoạt tính probiotic cao được phân lập và chọn lọc từ thực phẩm lên men lactic và đã được giải trình tự 16S rDNA tại công ty Nam Khoa Biotek xác định là giống *L. acidophilus* có độ tương đồng 100% với giống *L. acidophilus* có mã số AB911464.1 được lưu trữ lý lịch giống trong cơ sở dữ liệu NCBI.

2.2. Môi trường nhân giống và lên men

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng môi trường thu nhận sinh khối là môi trường nước

chua tàu hũ thu nhận tại cơ sở sản xuất tàu hũ Hai Tân – phường Xuân Khánh, Q. Ninh Kiều, TP. Cần Thơ.

Vi khuẩn *L. acidophilus* được giữ giống trong môi trường chuyên biệt cho vi khuẩn lactic là MRS (Man Rogosa Sharpe), sau đó việc thu nhận sinh khối sẽ được nghiên cứu trên môi trường nước chua tàu hũ và lần lượt bổ sung các yếu tố dinh dưỡng là sucrose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ammonium sulfate) và KH_2PO_4 (kali phosphate).

Thành phần hóa học của môi trường nước chua tàu hũ được phân tích gồm có 0.9% NH_4^+ và 1.5% PO_4^{3-} .

2.3. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm

2.3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối *L. acidophilus*.

Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo sinh khối của chủng *L. acidophilus* được khảo sát đơn yếu tố trong môi trường nước chua tàu hũ. Có 6 yếu tố được lựa chọn để khảo sát theo thứ tự là mật độ giống ban đầu, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, nồng độ sucrose, nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và nồng độ KH_2PO_4 được bổ sung vào dịch nuôi cấy. Trong đó các thí nghiệm khảo sát về mật độ giống, nhiệt độ và thời gian ủ được thực hiện trên môi trường nước chua tàu hũ không bổ sung thêm các yếu tố dinh dưỡng. Các yếu tố khảo sát trước theo thứ tự sẽ là tiền đề cho các khảo sát tiếp theo. Phạm vi khảo sát của từng yếu tố được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Phạm vi khảo sát của các yếu tố

Yếu tố	Mật độ giống (log CFU/mL)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	Sucrose (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	KH ₂ PO ₄ (%)
Phạm vi khảo sát	3	25	12	5	0.3	0.1
	4	30	24	10	0.5	0.3
	5	35	36	15	0.7	0.5
	6	40		20		
	7	45		25		

2.3.2. Xây dựng ma trận Plackett-Burman sàng lọc các yếu tố

Để xác định được các yếu tố ảnh hưởng và mức độ ảnh hưởng của từng yếu tố đến sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus*, ma trận sàng lọc Plackett-Burman [4] được thiết kế dựa trên kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus*.

Trong ma trận Plackett-Burman, 6 yếu tố được đưa vào sàng lọc là mật độ giống ban đầu, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, nồng độ

sucrose, nồng độ (NH₄)₂SO₄, và nồng độ KH₂PO₄ được nghiên cứu với 2 mức độ là thấp nhất (-1) và cao nhất (1) ứng với các phạm vi khảo sát được thực hiện trong tối ưu hóa đơn yếu tố (bảng 1). Ma trận 12 thí nghiệm (bảng 2) được xây dựng để sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus*. Các yếu tố được sàng lọc cho độ tin cậy cao ($p < 0.05$) sẽ được đưa vào mô hình tối ưu hóa sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt theo phương án cấu trúc có tâm (RSM-CCD).

Bảng 2. Ma trận Blackett – Burman mã hóa các yếu tố

Thứ tự TN	Mật độ giống (log CFU/mL)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	Sucrose (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	KH ₂ PO ₄ (%)
1	1	1	1	1	1	-1
2	-1	1	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	1	1
4	-1	-1	1	1	1	1
5	-1	1	1	1	-1	-1
6	-1	1	1	-1	-1	1
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1
8	1	-1	-1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	-1
10	1	-1	1	-1	-1	-1
11	1	1	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	-1	1	-1

2.3.3. Kế hoạch thực nghiệm RSM-CCD

Sau khi sàng lọc bằng ma trận Plackett-Burman, các yếu tố có độ tin cậy $p < 0.05$ được lựa chọn để đưa vào thực nghiệm tối ưu hóa RSM-CCD và được nghiên cứu ở 5 mức (-2, -1, 0, +1, +2) trong CCD 28 thí nghiệm [5] (bảng 3). Theo đó, tâm thực nghiệm được xác định thông qua quá trình sàng lọc bằng ma trận

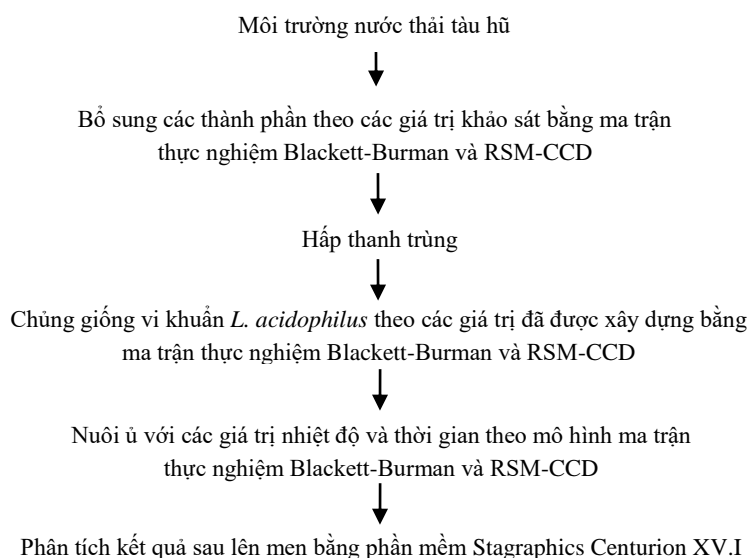
Blackett-Burman được gọi là mức 0, các mức -2, -1, 1, 2 là các bước nhảy từ tâm đi dần đến mức thấp nhất và cao nhất trong phạm vi nghiên cứu của mỗi yếu tố.

Số liệu được phân tích bằng chương trình Stagraphics Centurion XV.I [6]. Từ kết quả phân tích xác định điểm tối ưu của các yếu tố cho sinh khối *L. acidophilus* đạt cực đại.

Bảng 3. Bảng mã hóa các yếu tố theo mô hình RSM-CCD

Thứ tự TN	Yếu tố					Thứ tự TN	Yếu tố				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
1	1	1	-1	1	-1	15	2	0	0	0	0
2	1	-1	1	-1	1	16	0	0	0	2	0
3	-1	-1	1	-1	-1	17	0	0	2	0	0
4	0	-2	0	0	0	18	-1	1	-1	-1	-1
5	1	1	1	1	1	19	-1	-1	-1	-1	1
6	-1	-1	1	1	1	20	0	0	0	0	2
7	1	1	-1	-1	1	21	-1	1	1	1	-1
8	1	1	1	-1	-1	22	0	0	0	0	-2
9	0	0	0	-2	0	23	-2	0	0	0	0
10	0	0	-2	0	0	24	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1	25	-1	-1	-1	1	-1
12	-1	1	1	-1	1	26	0	2	0	0	0
13	1	-1	-1	-1	-1	27	0	0	0	0	0
14	1	-1	1	1	-1	28	0	0	0	0	0

2.4. Quy trình thực nghiệm



3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa từng yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối *L. acidophilus*

Sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật phụ thuộc rất lớn vào các yếu tố dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, sinh khối *L. acidophilus* được thử nghiệm nghiên cứu trên môi trường nước chua tàu hũ để khảo sát về điều kiện nuôi cấy và điều kiện dinh dưỡng.

Khả năng tăng sinh của *L. acidophilus* được đánh giá thông qua ảnh hưởng của mật độ giống ban đầu đến mật độ *L. acidophilus* sau 24h nuôi cấy ở 37°C. Kết quả thu được mật độ *L. acidophilus* sau khi nuôi cấy là 8 - 9 log CFU/mL khi nuôi cấy với mật độ giống ban đầu 3 - 7 log CFU/mL. Điều này cho thấy với môi trường nước chua tàu hũ đơn thuần thì *L. acidophilus* vẫn có thể sinh trưởng và phát triển. Kết quả này là khá cao so với mật độ *L. acidophilus* của môi trường MRS đối chứng là 9 log CFU/mL và kết quả này cũng đã khẳng định

lại kết luận của Inoue khi nghiên cứu về môi trường nước chua tàu hũ [3]. Do đó môi trường nước chua tàu hũ hoàn toàn có thể sử dụng để sản xuất sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus*.

Với yếu tố khảo sát trước là tiền đề của yếu tố khảo sát sau, các giá trị tối ưu đơn yếu tố đã được xác định tại các điểm có giá trị sinh khối khô cao nhất trong từng yếu tố khảo sát. Với 100mL dịch nuôi cấy thì sinh khối khô của *L. acidophilus* đạt được cao nhất là 0.33g sau 24h nuôi cấy. Sinh khối cao nhất thu được là 0.42g khi nhiệt độ nuôi cấy là 35°C. Với nồng độ sucrose bổ sung 15% thì sinh khối thu được là 0.54g, khi bổ sung thêm 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thì sinh khối thu được là 0.59g, sinh khối đạt cao nhất là 0.63g khi tiếp tục bổ sung 0.3% KH_2PO_4 vào môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ và thời gian thích hợp cho việc thu sinh khối *L. acidophilus* được xác định trong thí nghiệm này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Tomas và cộng sự (2003) [7].

Từ kết quả về sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* thu được sau từng khảo sát cho thấy tất cả các yếu tố đã khảo sát đều có ảnh hưởng nhất định đến sự hình thành sinh khối *L. acidophilus*. Do đó các yếu tố này tiếp tục được nghiên cứu sàng lọc bằng mô hình Blackett-Burman để tối ưu hóa các điều kiện thu nhận sinh khối bằng phương pháp RSM-CCD.

3.2. Ma trận Plackett-Burman trong sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối *L. acidophilus*

Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng là một bước

quan trọng trong quy hoạch thực nghiệm khi có nhiều yếu tố đồng thời tác động lên đối tượng nghiên cứu. Quá trình sàng lọc giúp xác định các yếu tố thực sự có tác động mạnh đến đối tượng nghiên cứu, loại bỏ các yếu tố không ảnh hưởng hoặc ít tác động nhằm đơn giản hóa tiến trình nghiên cứu.

Kết quả sàng lọc 6 yếu tố ảnh hưởng theo ma trận Plackett-Burman dựa vào sinh khối *L. acidophilus* (bảng 4) được phân tích phương sai (ANOVA) để xác định các mức ảnh hưởng và độ tin cậy (bảng 5).

Bảng 4. Ma trận Blackett – Burman sàng lọc các yếu tố

Thứ tự TN	Mật độ giống (log CFU/mL)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	Sucrose (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	Sinh khối <i>L. acidophilus</i> (g/100mL)
1	7	45	24	25	0.7	0.1	0.63
2	3	45	12	5	0.7	0.5	0.51
3	7	25	24	5	0.7	0.5	0.43
4	3	25	24	25	0.7	0.5	0.38
5	3	45	24	25	0.3	0.1	0.54
6	3	45	24	5	0.3	0.5	0.48
7	3	25	12	5	0.3	0.1	0.31
8	7	25	12	25	0.3	0.5	0.41
9	3	25	12	25	0.7	0.1	0.37
10	7	25	24	5	0.3	0.1	0.41
11	7	45	12	25	0.3	0.5	0.59
12	7	45	12	5	0.7	0.1	0.56

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

Yếu tố	Mức độ ảnh hưởng (E)	Độ tin cậy (p)
Mật độ giống ban đầu	0.2750	0.0002
Nhiệt độ (°C)	0.1667	0.0000
Thời gian (h)	0.0200	0.0409
Sucrose	0.0367	0.0040
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0233	0.0241
KH ₂ PO ₄	-0.0033	0.6672

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy 6 yếu tố được nghiên cứu đều có tác động nhất định đến sự hình thành sinh khối của vi khuẩn *L. acidophilus*. Yếu tố có ảnh hưởng mạnh nhất đến sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* là mật độ giống ban đầu, tiếp theo là nhiệt độ nuôi cấy, nồng độ sucrose, nồng độ (NH₄)₂SO₄, thời gian nuôi cấy và cuối cùng là nồng độ KH₂PO₄.

Trong 6 yếu tố khảo sát, có 5 yếu tố có giá trị độ tin cậy $p < 0.05$ thật sự tác động mạnh đến sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* là mật độ giống ban đầu, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, nồng độ sucrose và nồng độ (NH₄)₂SO₄. So sánh về mức độ ảnh hưởng, yếu tố mật độ giống và nhiệt độ là có ảnh hưởng lớn nhất, 3 yếu tố còn lại có mức ảnh hưởng tương đương nhau. Do đó, cả 5 yếu tố trên được đưa vào mô hình tối ưu hóa RSM-CCD để tìm ra điểm tối ưu cho sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* cực đại.

Vậy, có 5 yếu tố được đưa vào mô hình tối ưu hóa RSM-CCD là mật độ giống vi khuẩn *L. acidophilus* ban đầu, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, nồng độ sucrose và nồng độ (NH₄)₂SO₄. Các yếu tố này được lần lượt ký

hiệu là X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ trong mô hình thực nghiệm tối ưu hóa.

3.3. Mô hình RSM-CCD tối ưu hóa các điều kiện thu nhận sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus*

Mô hình RSM-CCD được dùng như là một mô hình tiên đoán lượng sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* được sinh ra. Từ mô hình này chúng ta có thể xác định điểm tối ưu cho giá trị sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* cực đại.

Kết quả phân tích sinh khối thực nghiệm theo mô hình RSM-CCD (bảng 6) được phân tích và đánh giá mức ảnh hưởng và độ tin cậy (bảng 7) để xác định phương trình hồi quy của mô hình thực nghiệm.

Bảng 6. Kết quả tối ưu hóa theo phương pháp RSM-CCD

Thứ tự TN	Yếu tố					Y _{Sinh khối <i>L.acidophilus</i>} (g/100mL) Thực nghiệm	Y _{Sinh khối <i>L.acidophilus</i>} (g/100mL) Mô hình
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅		
1	6	40	12	20	0.2	0.59	0.579375
2	6	30	24	10	0.4	0.54	0.539375
3	4	30	24	10	0.2	0.25	0.246875
4	5	25	18	15	0.3	0.29	0.272917
5	6	40	24	20	0.4	0.68	0.666875
6	4	30	24	20	0.4	0.55	0.551042
7	6	40	12	10	0.4	0.58	0.570208
8	6	40	24	10	0.2	0.57	0.552708
9	5	35	18	5	0.3	0.35	0.364583
10	5	35	6	15	0.3	0.39	0.391250
11	4	40	12	20	0.4	0.57	0.561875
12	4	40	24	10	0.4	0.54	0.525208
13	6	30	12	10	0.2	0.28	0.281875
14	6	30	24	20	0.2	0.51	0.508542
15	7	35	18	15	0.3	0.68	0.691250
16	5	35	18	25	0.3	0.61	0.617917
17	5	35	30	15	0.3	0.62	0.641250
18	4	40	12	10	0.2	0.24	0.227708
19	4	30	12	10	0.4	0.18	0.184375
20	5	35	18	15	0.5	0.65	0.656250
21	4	40	24	20	0.2	0.56	0.544375
22	5	35	18	15	0.1	0.38	0.396250
23	3	35	18	15	0.3	0.37	0.381250
24	6	30	12	20	0.4	0.55	0.556042
25	4	30	12	20	0.2	0.17	0.173542
26	5	45	18	15	0.3	0.53	0.569583
27	5	35	18	15	0.3	0.68	0.673750
28	5	35	18	15	0.3	0.69	0.673750

Bảng 7. Độ tin cậy của các yếu tố tối ưu

Yếu tố	Mức độ ảnh hưởng	Độ tin cậy	Yếu tố	Mức độ ảnh hưởng	Độ tin cậy
X ₁	0.0639	0.0033	X ₂ X ₂	-0.0172	0.0005
X ₂	0.0431	0.0216	X ₂ X ₃	-0.0138	0.0760
X ₃	-0.1775	0.0073	X ₂ X ₄	-0.0206	0.0760
X ₄	-0.0419	0.3943	X ₂ X ₅	-0.0275	0.0042
X ₅	0.0613	0.0750	X ₃ X ₃	-0.0738	0.0004
X ₁ X ₁	-0.0228	0.0001	X ₃ X ₄	-0.0375	0.1005
X ₁ X ₂	-0.0088	0.0330	X ₃ X ₅	-0.0225	0.1325
X ₁ X ₃	0.0013	0.8553	X ₄ X ₄	-0.2841	0.0000
X ₁ X ₄	-0.0056	0.5881	X ₄ X ₅	-0.0563	0.0251
X ₁ X ₅	-0.0125	0.1005	X ₅ X ₅	-0.0787	0.0002

Kết quả phân tích ANOVA xác định các biến độc lập của phương trình hồi quy trong mô hình thực nghiệm gồm các yếu tố trong bảng 4 có độ tin cậy $p < 0.05$. Phương trình hồi quy có dạng: $Y = -6.90479 + 0.11125X_1 + 0.0899167X_4 + 4.45X_5 - 0.000916667X_1X_3 - 0.0007X_1X_4 - 0.000625X_2X_3 - 0.001375X_1^2 - 0.002525X_2^2 - 0.00109375X_3^2 - 0.001825X_4^2 - 3.6875X_5^2$.

Hệ số hồi quy (R^2) tính được là 0,993144 cho thấy có 99,3144% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán theo mô hình. Theo Castillo (2007), giá trị $R^2 > 0.75$ thể hiện mô hình được xây dựng tương thích với thực nghiệm [5]. Điều này nghĩa là có sự tương quan rất chặt chẽ giữa các yếu tố thí nghiệm và sự tạo thành sinh khối *L. acidophilus*, điều này khẳng định tính chính xác của mô hình và sự tồn tại của điểm tối ưu.

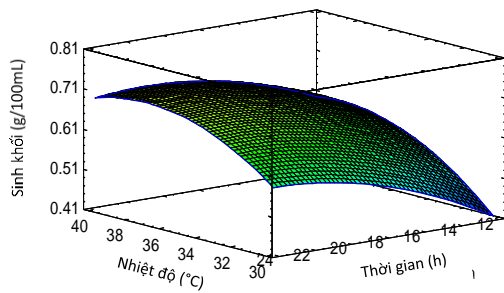
Phương trình hồi quy cho thấy mật độ giống ban đầu, hàm lượng $(NH_4)_2SO_4$ và nồng độ

sucrose tác động tích cực đến sự hình thành sinh khối của *L. acidophilus*. Các giá trị này càng cao thì sinh khối thu nhận được càng nhiều. Tuy nhiên, khi mật độ vi sinh vật cấy vào môi trường quá lớn thì dẫn đến việc thiếu hụt nguồn dinh dưỡng sau một khoảng thời gian nuôi cấy nên vi sinh vật chỉ tăng lên về số lượng đến một giai đoạn sẽ dừng lại. Ngoài ra, vi sinh vật có nhu cầu về dinh dưỡng ở mức độ vừa đủ trong quá trình phát triển. Nên khi tăng hàm lượng dinh dưỡng vượt quá một giới hạn nhất định thì hoạt tính enzyme sẽ giảm do cơ chất tạo áp lực lên quá trình sinh tổng hợp enzyme, đồng thời cơ chất tăng trong khi năng lực tiết tối đa không đổi cũng làm hoạt tính enzyme giảm nên sinh khối tạo ra sẽ giảm.

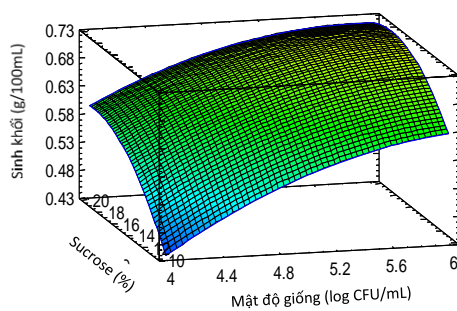
Nhiệt độ và thời gian lên men cũng ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của *L. acidophilus*. Trong khoảng khảo sát từ 25 - 45°C, khi nhiệt độ tăng càng cao và thời

gian khảo nuôi cấy càng dài thì sinh khối thu nhận được càng giảm. Do *L. acidophilus* là chủng vi khuẩn ưa ấm nên nhiệt độ thích nghi tốt nhất là 25 - 35°C. Khi nhiệt độ khảo sát tăng lên quá cao 40 - 45°C thì sự sinh trưởng phát triển của chúng sẽ ức chế do quá trình trao đổi chất bị hạn chế nên sinh khối tạo ra ít. Thời gian nuôi cấy quá lâu thì nguồn dinh dưỡng bị cạn kiệt dần nên sinh khối cũng giảm.

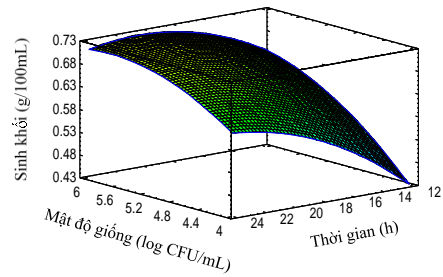
Từ kết quả thực nghiệm cho thấy tất cả các yếu tố được khảo sát đều có ảnh hưởng mạnh đến sự hình thành sinh khối của *L. acidophilus* với các mức độ khác nhau tùy thuộc vào từng yếu tố cụ thể. Biểu đồ bề mặt đáp ứng (hình 1a, hình 1b, hình 1c) thể hiện sự tương tác của từng cặp yếu tố và từ biểu đồ này có thể xác định được giá trị tối ưu của từng yếu tố làm cho hàm đáp ứng cực đại.



(a)



(b)



(c)

Hình 1. Mặt đáp ứng của sinh khối *L. acidophilus* theo các cặp yếu tố ảnh hưởng

(a) nhiệt độ và thời gian, (b) mật độ giống và sucrose, (c) mật độ giống và thời gian

Từ các bề mặt đáp ứng chúng tôi dự đoán tọa độ điểm tối ưu của các yếu tố khảo sát cho giá trị sinh khối cực đại là 0.760995 g/100mL với mật độ giống ban đầu 10^6 CFU/mL, 17.59% sucrose, 0.37% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, thời gian nuôi cấy 20h và nhiệt độ nuôi cấy là 37°C. Thử nghiệm mô hình tại các điểm có giá trị tối ưu chúng tôi đã thu được kết quả cực đại là 0.73g/100mL, đạt độ tương đồng so với mô hình là 96.05%. Kết quả này cao hơn kết quả nghiên cứu của Goderska (2008) khi nghiên cứu thu nhận sinh khối trên môi trường lactose và sucrose là 0.587g/100mL, cao hơn lượng sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* thu nhận trên môi trường fructose – oligosaccharide là 0.625g/100mL cao gần bằng với sinh khối thu nhận trên môi trường MRS đối chứng là 0.748g/100mL (hiệu suất 97.59%) [2]. Điều này chứng tỏ rằng mô hình tối ưu chúng tôi tìm được là một mô hình cho hiệu suất thu sinh khối cao.

Như vậy, sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* thu nhận trên môi trường nước chua tàu hũ đã được tối ưu hóa bằng mô hình RSM-CCD cho kết quả sinh khối tạo ra cao hơn sinh khối thu nhận trên môi trường hèm rượu, môi trường

hèm rượu bổ sung nước chua tàu hũ và môi trường sữa đậu nành là những môi trường có giá thành thấp được nghiên cứu với mục đích giảm chi phí đầu tư sản xuất sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus*. Đồng thời hiệu suất thu nhận này đạt 97.59% so với sinh khối tạo ra trên môi trường MRS, đây là một hiệu suất rất cao giữa hai môi trường có giá thành chênh lệch lớn. Do đó sản xuất sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* trên môi trường này sẽ mang lại lợi ích lớn là vừa tiết kiệm được chi phí đầu tư vào môi trường nuôi cấy trong sản xuất sinh khối vi khuẩn, đồng thời lại góp phần làm giảm thiểu ô nhiễm môi trường do tận dụng được nguồn chất thải từ quá trình sản xuất tàu hũ. Vì vậy mô hình tối ưu này có thể áp dụng vào thực tế để thu nhận sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus*.

4. KẾT LUẬN

Với mục tiêu tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành sinh khối của vi khuẩn *L. acidophilus*, chúng tôi đã sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối vi khuẩn bằng ma trận

thực nghiệm Plackett-Burman và xây dựng mô hình tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt bằng phương án cấu trúc có tâm RSM-CCD. Với phương pháp này chúng tôi đã thu nhận được giá trị sinh khối cực đại là 0.73 g/100mL tại các giá trị tỷ lệ giống *L. acidophilus* là 10^6 CFU/mL, 17.59% sucrose, 0.37% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, thời gian thu nhận sinh khối là 20h và nhiệt độ nuôi cấy là 37°C. Kết quả thu nhận sinh khối trên môi trường nước chua tàu hũ cao hơn các kết quả tối ưu hóa trên một số môi trường có giá thành thấp khác đã được nghiên cứu và đạt hiệu suất thu nhận so với môi trường MRS là 93.58%. Áp dụng mô hình tối ưu hóa này vào sản xuất sinh khối vi khuẩn *L. acidophilus* trên môi trường nước chua tàu hũ có ý nghĩa rất quan trọng trong việc giảm chi phí sản xuất và giá thành sản phẩm, và có ý nghĩa tích cực trong việc giảm thiểu ô nhiễm môi trường do nước thải tàu hũ gây ra.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ đề tài mã số C2014-20-14

Plackett-Burman matrix and response surface methodology-central composite design for optimization of *Lactobacillus Acidophilus* biomass production

- Ly Huynh Lien Huong
- Nguyen Thuy Huong

University of Technology, VNU-HCM

ABSTRACT

Biomass of Lactobacillus acidophilus was optimized in the tofu wastewater medium by Plackett-Burman matrix and Response surface methodology – Central composite design (RSM-CCD). The highest biomass was 0.73 g/100mL at 10⁶ CFU/mL of initial density of L. acidophilus in tofu wastewater medium, with 0.37% (NH₄)₂SO₄ and 17.59% sucrose. L. acidophilus produced maximum value of

biomass after 20 hours of incubation at 37°C. There was a similar proportion at 96.05% in comparison to experimental value and optimization theory, approximately 93.58% L. acidophilus biomass in MRS medium. As a result, optimization model could be applied in biomass production of L. acidophilus to enhance commercial value and contribute to environmental protection.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus, Plackett-Burman, RSM-CCD.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Buck B.L., Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 107, Number 1, July 2009, pp. 269-279 (2009).
- [2]. Kamila Goderska, Jacek Nowak, Zbigniew Czarnecki, Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 7(2), pp5-20 (2008).
- [3]. Inoue N., Variation in Chemical Composition of Soybean Curd Lees (Tofukasu). *Bulletin of the Nagano Animal Industry Experiment*. Station 22: 16-23. (In Japanese, with English summary) (1989).
- [4]. Plackett R.L., Burman J.P., The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 37: 305-325 (1946).
- [5]. Castillo E Del., Process Optimization A Statistical Approach. *Springer Science*. New York, USA: 118-12 (2007).

- [6]. Stagraphics Centurion XV, version 15.1.02, edition: multilingual, *License: coporated enterprise*. Copyright 1982-2006 StatPoint, Inc.
- [7]. Tomas. M. S. et al., Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *CERELA-CONICET (Centro de Referencia para Lactobacilos)*. Chacabuco 145, 4000, Tucumán, Argentina Institute of Biometrics, University Hospital, Hannover, Germany (2003)