

Tối ưu hoá quá trình lên men thu nhận Bacterial cellulose từ môi trường rỉ đường và môi trường nước mía

• Phạm Văn Phiến

• Nguyễn Thúy Hương

Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 04 tháng 03 năm 2013, nhận đăng ngày 28 tháng 9 năm 2013)

TÓM TẮT

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu điều kiện lên men sử dụng vi khuẩn *Acetorbacter xylinum* tổng hợp bacterial cellulose trên môi trường rỉ đường và môi trường nước mía. Bằng phương pháp tối ưu hóa hàm đa mục tiêu đã tìm được các điều kiện lên men tối ưu thu nhận cellulose vi khuẩn (BC) đạt hiệu quả. Cụ thể:

- Điều kiện nuôi cấy tối ưu: môi trường rỉ đường (pH: 4,9; nhiệt độ: 30°C; thời gian:

107 giờ), môi trường nước mía (pH: 5,2; nhiệt độ: 30,5°C; thời gian: 102 giờ).

- Điều kiện dinh dưỡng cơ bản tối ưu: môi trường rỉ đường (pepton: 1,0%; glucose: 2,78%), môi trường nước mía (pepton: 0,93%; glucose: 3,65%).

Qua so sánh với môi trường truyền thống nước dừa cho thấy có thể sử dụng môi trường rỉ đường và nước mía thay thế. Từ đó xây dựng quy trình lên men thu nhận BC hiệu quả trên các môi trường này.

Từ khóa: bacterial cellulose, *Acetorbacter xylinum*, rỉ đường, nước mía.

MỞ ĐẦU

Bacterial cellulose (BC) là hợp chất tương hợp sinh học, không độc hại, có nhiều tính chất độc đáo với cấu trúc siêu mịn, xốp nên có nhiều ứng dụng ở nhiều lĩnh vực trong thực tế [4, 6].

Chất lượng và năng suất BC phụ thuộc nhiều vào chất lượng giống, môi trường nuôi cấy cũng như chi phí đầu tư sản xuất, do vậy đã có những nghiên cứu cải thiện giống, đa dạng hóa môi trường nuôi cấy, đặc biệt là tận dụng các nguồn phụ phế phẩm, điều kiện nuôi cấy để phát triển quy trình công nghệ lên men sản xuất BC hiệu quả [7, 8].

Nghiên cứu này ứng dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm để xác định các điều kiện lên men tối ưu: pH, nhiệt độ và thời gian và điều

kiện dinh dưỡng cơ bản tối ưu cho quá trình lên men thu nhận BC đạt hiệu suất cao trên hai loại môi trường nguyên liệu phổ biến là rỉ đường và nước mía. Từ đó hoàn chỉnh quy trình lên men thu nhận sản phẩm BC hiệu quả.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Giống vi sinh vật

Vi khuẩn *A.xylinum* BC16 dùng để lên men thu nhận BC, trong bộ sưu tập giống của trường Đại học Bách Khoa Tp.HCM.

Môi trường nuôi cấy

Các môi trường nuôi cấy điều chế từ các nguồn nguyên liệu rỉ đường, nước mía, đã bổ sung dinh dưỡng cơ bản [8].

Phương pháp thử nghiệm

Các thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Tối ưu điều kiện nuôi cấy phòng thí nghiệm: pH, nhiệt độ, thời gian.

Chúng tôi tiến hành thí nghiệm theo phương pháp leo dốc ứng với ba yếu tố ảnh hưởng được khảo sát: pH (x1), nhiệt độ (x2) và thời gian (x3). Hàm mục tiêu (y) là mật độ quang (OD) của dịch nuôi cấy ứng với mật độ vi khuẩn. Phương trình hồi quy có dạng:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

Với : b0, b1, b2, b3, b12, b13, b23 - các hệ số của phương trình hồi quy.

Giống được tiến hành kiểm tra, nhân giống cấp 1, cấp 2. Sau đó đưa vào môi trường nuôi cấy với cùng tỷ lệ 10%.

Lập ma trận quy hoạch thực nghiệm và xác định các hệ số của phương trình hồi quy với mục tiêu khảo sát ba yếu tố ảnh hưởng, số thí nghiệm cần phải tiến hành $N = 2^3 = 8$ [2].

Bảng 1. Các mức và khoảng biến thiên của thí nghiệm.

Yếu tố ảnh hưởng	Các mức của thí nghiệm			Khoảng biến thiên
	Mức dưới -1	Mức cơ sở 0	Mức trên +1	
pH môi trường (x ₁)	4,5	5,0	5,5	0,5
Nhiệt độ ủ (x ₂)	28°C	30°C	32°C	2,0°C
Thời gian nuôi cấy (x ₃)	48 giờ	96 giờ	144 giờ	48 giờ

Hệ số tương tác bi, bij được tính theo công thức:

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij} y_i ; \quad b_{12} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_1 x_2)_i y_i ;$$

$$b_{123} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_1 x_2 x_3)_i y_i \quad (\text{với } N = 8)$$

Từ đó xác định được phương trình hồi quy mô tả thực nghiệm.

Tối ưu thành phần peptone và glucose trong lên men tĩnh

Để xác định điều kiện dinh dưỡng tối ưu với hai yếu tố ảnh hưởng: tỷ lệ peptone (x1) và glucose (x2) trong quá trình lên men tĩnh nuôi cấy ở khay nhỏ. Chúng tôi tiến hành thí nghiệm theo phương pháp leo dốc ứng với điều kiện lên men tối ưu (pH, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy) đã được xác định từ các thí nghiệm trên. Hàm mục tiêu là năng suất S-BC (g/l) thu được. Phương trình hồi quy có dạng

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2$$

Với : b0, b1, b2, b12, - các hệ số của phương trình.

Giống được tiến hành kiểm tra và nhân giống như điều kiện thí nghiệm trên. Sau đó đưa vào môi trường lên men với cùng tỷ lệ 10% giống (10ml giống : 90ml môi trường).

trộn đều, cho vào khay để lên men tĩnh truyền thống.

Mục tiêu khảo sát hai yếu tố ảnh hưởng nên số thí nghiệm cần phải tiến hành $N = 2^2 = 4$.

Bảng 2. Các mức và khoảng biến thiên của thí nghiệm.

Yếu tố ảnh hưởng	Các mức			Khoảng biến thiên
	Mức dưới -1	Mức cơ sở 0	Mức trên +1	
Khối lượng Peptone (x ₁)	0,5 g	1,25 g	2,0 g	0,75 g
Khối lượng Glucose (x ₂)	2,0 g	4,0 g	6,0 g	2,0 g

Hệ số tương tác b_i, b_{ij} được tính theo công thức:

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij} y_i; \quad b_{12} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_1 x_2)_i y_i;$$

(với $N = 4$)

Từ đó xác định được phương trình hồi quy mô tả thực nghiệm.

Kiểm định sự có nghĩa các hệ số hồi quy theo tiêu chuẩn Student

Chúng tôi tiến hành thêm 3 thí nghiệm ở tâm.

Phương sai tái hiện: $S_{th}^2 = \frac{\sum_{u=1}^m (y_u^0 - \bar{y}^0)^2}{m-1}$

(với $u = 1, 2, 3$)

Sai số tính cho b_i : $S_{b_i} = \frac{S_{th}}{\sqrt{N}}$

y_u^0 : giá trị y thu được tại tâm thực nghiệm;
 \bar{y}^0 : giá trị trung bình của các lần đo giá trị y_u^0 ;
 m : số thí nghiệm làm tại tâm, ở đây $m=3$.

Các giá trị tính toán theo số liệu thực nghiệm của phân bố Student tính theo công thức:

$$t_j = \frac{|b_j|}{S_{b_j}}$$

Tra bảng phân vị xác định giá trị của tiêu chuẩn Student đối với mức ý nghĩa $p = 0,05$; bậc tự do $f = 2$.

Nếu $t_j > t_{b(p,f)}$ thì hệ số b_j khác đáng kể với 0, ảnh hưởng của x_j có ý nghĩa đến việc làm thay đổi thông số tối ưu hóa y_1 , hệ số b_j được chọn.

Ngược lại nếu $t_j < t_{b(p,f)}$ thì hệ số b_j không khác đáng kể với 0, ảnh hưởng của x_j ít có ý nghĩa đến việc làm thay đổi thông số tối ưu hóa y , hệ số b_j không được chọn.

Kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi qui

Kiểm tra sự tương thích của phương trình theo tiêu chuẩn Fisher.

$$F = \frac{S_{du}^2}{S_{th}^2} = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - N'}$$

với phương sai dư: $S_{du}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - N'}$

Trong đó: N là số thí nghiệm; N' là số hệ số có nghĩa trong phương trình; y_i là giá trị đo được trong thực nghiệm; \bar{y}_i : giá trị tính toán theo phương trình hồi quy.

Tra bảng ta có F_b , nếu $F_b > F$: tương thích, phương trình phù hợp với các số liệu thực nghiệm, ngược lại khi $F_b < F$: không tương thích với thực nghiệm, phải tăng bậc của phương trình.

Tối ưu hóa thực nghiệm theo đường dốc nhất

Tối ưu tối hoá quá trình khảo sát các hàm mục tiêu bằng phương pháp leo dốc (phương pháp Box-Wilson), chọn bước nhảy δ_i của yếu tố z_1 , dựa vào δ_1 để tính $\delta_2, \delta_3, \dots$ theo công thức:

$$\delta_i = \delta_1 \frac{b_i \Delta_i}{b_1 \Delta_1}$$

Trong đó δ_i là bước nhảy của yếu tố thứ i ; b_i : là hệ số hồi qui của các yếu tố tương quan; Δ_i là khoảng biến thiên của từng yếu tố tương ứng.

Tiến hành thực nghiệm theo đường dốc nhất.

Phương pháp xử lý thống kê

Chúng tôi sử dụng chương trình phân tích ANOVA của phần mềm Microsoft Excel để phân tích, thống kê và xử lý số liệu thực nghiệm.

Khảo sát tốc độ lắ trong lên men chìm

Tiến hành thí nghiệm lên men chìm thu nhận A-BC trên máy lắc vòng ở điều kiện nuôi cấy tối ưu và điều kiện dinh dưỡng tối ưu (xác định ở các thí nghiệm trên) để khảo sát tốc độ lắ tối ưu nhằm đạt hiệu suất lên men cực đại.

Các thí nghiệm bố trí từ (150 ÷ 300) vòng/phút, tỷ lệ giống 10% (10 ml giống: 90 ml môi trường), lên men trong bình tam giác 250 ml. Chỉ tiêu theo dõi là năng suất A-BC (g/l).

KẾT QUẢ-THẢO LUẬN

Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy phòng thí nghiệm

Trên môi trường rỉ đường

Kết quả thực nghiệm y(OD) của dịch nuôi cấy được bố trí trên bảng ma trận mở rộng (Bảng 3).

Bảng 3. Kết quả quy hoạch thực nghiệm quá trình nuôi cấy trên môi trường rỉ đường.

STT	x ₁	x ₂	x ₃	z ₁	z ₂	z ₃	y
1	5,5	32	144	1	1	1	0,133
2	5,5	32	48	1	1	-1	0,130
3	5,5	28	144	1	-1	1	0,133
4	5,5	28	48	1	-1	-1	0,118
5	4,5	32	144	-1	1	1	0,154
6	4,5	32	48	-1	1	-1	0,142
7	4,5	28	144	-1	-1	1	0,163
8	4,5	28	48	-1	-1	-1	0,119
9	5,0	30	96	0	0	0	0,151
10	5,0	30	96	0	0	0	0,144
11	5,0	30	96	0	0	0	0,152

Với z₁, z₂, z₃: lần lượt là biến mã hoá của biến thực x₁, x₂, x₃

Bảng 4. Thí nghiệm theo hướng gradient của mật độ quang của dịch nuôi cấy.

Tên	x ₁ -pH	x ₃ -thời gian (giờ)	y
Mức cơ sở	5,000	96,000	
Hệ số b _j	-0,008	0,009	
Khoảng biến thiên Δ _j	0,500	48,000	
b _j Δ _j	-0,001	0,111	
Bước nhảy δ	-0,100	11,100	
Bước làm tròn	-0,100	11,000	
Thí nghiệm 12	5,0	96,000	0,149
Thí nghiệm 13	4,900	107,000	0,175
Thí nghiệm 14	4,800	118,000	0,136
Thí nghiệm 15	4,700	129,000	0,130
Thí nghiệm 16	4,600	140,000	0,124
Thí nghiệm 17	4,500	151,000	0,120

Kết quả trên cho thấy mật độ quang OD của dịch nuôi cấy thu được cao nhất ở thí nghiệm thứ 13 và giảm dần ở các thí nghiệm kế tiếp. Thí nghiệm thứ 13 cho kết quả tốt nhất theo hướng

gradient đã chọn với OD của dịch nuôi cấy đạt (0,175).

Vậy, qua khảo sát quá trình nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường rỉ đường :

-Đã xác định được phương trình hồi quy:

$$y = 0,137 - 0,008x_1 + 0,009x_3$$

với các hệ số hệ số : b₁ = -0,008<0; b₃ = 0,009>0

- Điều này cho thấy pH môi trường ảnh hưởng tỷ lệ nghịch và thời gian ảnh hưởng tỷ lệ thuận đến quá trình nuôi cấy.

- Điều kiện phù hợp nhất trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn ứng với sinh khối tế bào lớn nhất (OD đạt 0,175) là pH: 4,9; nhiệt độ ủ: 30°C; thời gian nuôi cấy: 107 giờ.

Trên môi trường nước mía

Bảng 5. Kết quả quy hoạch thực nghiệm quá trình nuôi cấy trên nước mía.

STT	x ₁	x ₂	x ₃	z ₁	z ₂	z ₃	y
1	5,5	32	144	1	1	1	0,174
2	5,5	32	48	1	1	-1	0,172
3	5,5	28	144	1	-1	1	0,167
4	5,5	28	48	1	-1	-1	0,161
5	4,5	32	144	-1	1	1	0,158
6	4,5	32	48	-1	1	-1	0,159
7	4,5	28	144	-1	-1	1	0,151
8	4,5	28	48	-1	-1	-1	0,137
9	5,0	30	96	0	0	0	0,162
10	5,0	30	96	0	0	0	0,165
11	5,0	30	96	0	0	0	0,163

Các hệ số hồi quy được xác định: b₀ = 0,160; b₁ = 0,009; b₂ = 0,006; b₃ = 0,003; b₁₂ = -0,001; b₁₃ = -0,001; b₂₃ = -0,002; b₁₂₃ = 0,001.

Từ công thức ta có các giá trị: S_{b_j} = 0,00054;

$$t_0 = 296,031; t_1 = 15,970; t_2 = 10,878;$$

$$t_3 = 4,861; t_{12} = 2,546; t_{13} = 1,157; t_{23} = 4,298; t_{123} = 2,546.$$

Phân tích, xử lý tương tự trên ta xác định phương trình hồi quy của hàm y₁ là:

$$y = 0,160 + 0,009x_1 + 0,006x_2 + 0,003x_3$$

Kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy theo tiêu chuẩn Fisher.

Phương sai dư theo công thức có giá trị bằng:

$$S^2_{\text{dư}} = 0,0000262$$

Tiêu chuẩn Fisher: $F = 11,21428$

So sánh giá trị F với $F_b = F_{(1-p)(f_2, f_1)}$

Với $p = 0,5$; $f_1 = 8-4 = 4$; $f_2 = 2$. Tra bảng ta có $F_b = 19,30$, suy ra $F_b > F$, phương trình phù hợp với các số liệu thực nghiệm. Vậy phương trình hồi quy là:

$$y = 0,160 + 0,009x_1 + 0,006x_2 + 0,003x_3$$

Từ phương trình hồi quy: pH môi trường (x_1), nhiệt độ nuôi cấy (x_2) và thời gian nuôi cấy (x_3) đều ảnh hưởng tỷ lệ thuận với sự sinh trưởng của tế bào vi khuẩn. Nhiệt độ ảnh hưởng đến đời sống vi khuẩn thông qua việc tác động đến các phản ứng sinh hóa và hoạt động của hệ enzyme trong tế bào. pH môi trường ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất qua màng của tế bào vi khuẩn. Nhiệt độ và pH môi trường quá thấp hoặc quá cao sẽ gây ức chế, kìm hãm quá trình sinh trưởng. Do vậy khi pH và nhiệt độ môi trường đạt tối ưu thì hiệu suất quá trình lên men sẽ đạt tối đa do tế bào vi khuẩn trong điều kiện thuận lợi nhất sẽ tăng trưởng mạnh mẽ và sản phẩm trao đổi chất tăng cao. Trong khi thời gian nuôi cấy càng dài thì khối lượng sản phẩm lên men thu được càng cao, tuy nhiên thời gian quá dài khi môi trường dinh dưỡng cạn dần thì hiệu suất lên men giảm.

Tối ưu hóa thực nghiệm theo đường dốc nhất, kết quả thể hiện ở bảng dưới (Bảng 6).

Bảng 6. Thí nghiệm theo hướng gradient của mật độ quang của dịch nuôi cấy.

Tên	x_1	x_2	x_3	y
Mức cơ sở	5,000	30,000	96,000	
Hệ số b_j	0,039	0,012	-0,007	
Khoảng biến thiên Δ_j	0,500	2,000	48,000	
$b_j \Delta_j$	0,020	0,024	-0,330	
Bước nhảy δ	0,200	0,241	-3,352	
Bước làm tròn	0,200	0,300	-4,000	

Thí nghiệm 12	5,000	30,000	96,000	0,163
Thí nghiệm 13	5,200	30,500	102,000	0,180
Thí nghiệm 14	5,400	31,000	108,000	0,173
Thí nghiệm 15	5,600	31,500	114,000	0,169
Thí nghiệm 16	5,800	32,000	120,000	0,154
Thí nghiệm 17	6,000	32,500	126,000	0,138

Kết quả trên cho thấy mật độ quang OD của dịch nuôi cấy thu được cao nhất ở thí nghiệm thứ 13 và giảm dần ở các thí nghiệm kế tiếp, vì vậy thí nghiệm thứ 13 cho kết quả tốt nhất theo hướng gradient đã chọn với OD của dịch nuôi cấy đạt (0,180).

Vậy, qua khảo sát quá trình nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường nước mía:

- Đã xác định được phương trình hồi quy:

$$y = 0,160 + 0,009x_1 + 0,006x_2 + 0,003x_3$$

Với các hệ số hệ số: $b_1 = 0,009 > 0$; $b_2 = 0,006 > 0$;

$$b_3 = 0,003 > 0.$$

- Điều này cho thấy pH, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy đều ảnh hưởng tỷ lệ thuận với quá trình.

- Giá trị phù hợp nhất cho quá trình nuôi cấy vi khuẩn ứng với sinh khối tế bào lớn nhất (OD= 0,180): pH: 5,2; nhiệt độ: 30,5°C; thời gian nuôi cấy: 102 giờ.

Tối ưu hóa điều kiện dinh dưỡng cơ bản

Trên môi trường rỉ đường

Kết quả thực nghiệm được bố trí trên bảng ma trận mở rộng sau khi đưa thêm cột biến ảo $z_0 = +1$.

Các hệ số hồi quy được xác định:

$$b_0 = 18,905; b_1 = -7,180;$$

$$b_2 = -13,115; b_{12} = 2,890;$$

Từ công thức ta có các giá trị: $S_{b_j} = 1,1169$;

$$t_0 = 16,9260; t_1 = 6,4284; t_2 = 11,7421;$$

$$t_{12} = 2,5875.$$

Đối chiếu với các trị số Student tính ta thấy

$t_{12} < t(0,05; 2) = 4,3$ nên hệ số b_{12} không có ý nghĩa, phương trình hồi quy của hàm y_1 là:

$$y = 18,905 - 7,180x_1 - 13,115x_2$$

Phương sai dư theo công thức có giá trị:

$$S^2_{\text{dư}} = 33,4084$$

Tiêu chuẩn Fisher: $F = 3,347490$

So sánh giá trị F với $F_b = F_{(1-p)(f_2, f_1)}$ với $p = 0,5$;

$$f_1 = N - N' = 4 - 3 = 1; f_2 = 2.$$

Tra bảng ta có $F_b = 18,50$, suy ra $F_b > F$, phương trình phù hợp với các số liệu thực nghiệm. Vậy phương trình hồi quy là:

$$y = 18,905 - 7,180x_1 - 13,115x_2$$

Từ phương trình hồi quy trên cho thấy: Thành phần peptone (x_1) và glucose (x_2) đều ảnh hưởng tỷ lệ nghịch đến quá trình lên men. Thành phần dinh dưỡng có ý nghĩa quyết định đối với sự sinh trưởng và phát triển của *A. xylinum*. Nếu tỷ lệ quá thấp sẽ không đủ dinh dưỡng cho vi khuẩn phát triển và tổng hợp sản phẩm BC, ngược lại khi tỷ lệ quá cao vi khuẩn không hấp thụ hết sẽ lãng phí đồng thời gây hại cho vi khuẩn và gây ức chế, kìm hãm quá trình lên men.

Tối ưu thực nghiệm theo đường dốc nhất, kết quả thể hiện ở bảng dưới.

Bảng 8. Thí nghiệm theo hướng gradient của mật độ quang của dịch nuôi cấy

Tên	x_1 (g%)	x_2 (%g)	y (g/l)
Mức cơ sở	1,250	4,000	
Hệ số b_j	-7,180	-13,115	
Khoảng biến thiên Δ_j	0,750	2,000	
$b_j \Delta_j$	-5,385	-26,230	
Bước nhảy δ	-0,125	-0,610	
Bước làm tròn	-0,125	-0,610	
Thí nghiệm 8	1,125	3,390	292,40
Thí nghiệm 9	1,000	2,780	433,40
Thí nghiệm 10	0,875	2,170	417,00
Thí nghiệm 11	0,750	1,560	403,80
Thí nghiệm 12	0,625	0,950	374,20

Kết quả trên bảng cho thấy khối lượng S-BC thu được cao nhất ở thí nghiệm thứ 9 và giảm dần ở các thí nghiệm leo dốc kế tiếp, vì vậy thí nghiệm thứ 9 cho kết quả tốt nhất theo hướng gradient đã chọn với khối lượng S-BC cực đại ($m=433,4g$).

Vậy, qua khảo sát quá trình lên men trong môi trường dịch ri đường để tạo sản phẩm S-BC:

- Đã xác định phương trình hồi quy :

$$y = 18,905 - 7,180x_1 - 13,115x_2$$

với các hệ số hệ số: $b_1 = -7,180 < 0$;

$$b_2 = -13,115 < 0$$

- Điều này có nghĩa là thành phần peptone và Glucose đều ảnh hưởng tỷ lệ nghịch đến quá trình lên men.

- Giá trị phù hợp nhất trong quá trình lên men tạo BC cực đại: khối lượng peptone ($x_1 = 1,0\%$), khối lượng Glucose ($x_2 = 2,78\%$), pH : 4,9; nhiệt độ ủ: 30°C ; thời gian lên men: 107 giờ.

Trên môi trường nước mía

Bảng 9. Kết quả quy hoạch thực nghiệm quá trình nuôi cấy.

STT	x_1	x_2	z_1	z_2	y
1	0,500	6,000	-1,000	1,000	39,230
2	0,500	2,000	-1,000	-1,000	64,670
3	2,000	6,000	1,000	1,000	5,248
4	2,000	2,000	1,000	-1,000	14,000
5	1,25	4,000	0	0	38,810
6	1,25	4,000	0	0	38,045
7	1,25	4,000	0	0	33,670

Các hệ số hồi quy xác định: $b_0 = 30,787$;

$$b_1 = -21,163;$$

$$b_2 = -8,548; b_{12} = 4,172;$$

Từ công thức ta có các giá trị: $S_{b_j} = 1,1169$;

$$t_0 = 16,9260; t_1 = 6,4284; t_2 = 11,7421;$$

$$t_{12} = 2,5875.$$

Giá trị của tiêu chuẩn Student đối với $p = 0,05$; bậc tự do là $f = 2$.

Tra bảng ta có $t(0,05;2) = 4,3$.

Đối chiếu với các trị số Student tính ta thấy

$t_{12} < t(0,05;2) = 4,3$ nên hệ số b_{12} không có ý nghĩa, phương trình hồi quy của hàm y là:

$$y = 30,787 - 21,163x_1 - 8,548x_2 + 4,172x_{12}$$

Kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy theo tiêu chuẩn Fisher.

$$\text{Phương sai dư} : S^2_{\text{dư}} = 69,622336$$

Tiêu chuẩn Fisher: $F = 9,05255$

So sánh giá trị F với $F_b = F_{(1-p)(f_2, f_1)}$ trong đó $p = 0,5$; $f_1 = 1$; $f_2 = m-1 = 3-1 = 2$.

Tra bảng ta có $F_b = 18,50$, suy ra $F_b > F$, phương trình phù hợp với các số liệu thực nghiệm. Vậy phương trình hồi quy là:

$$y = 30,787 - 21,163x_1 - 8,548x_2$$

Từ phương trình hồi quy trên cho thấy: Thành phần peptone (x_1) và glucose (x_2), đều ảnh hưởng tỷ lệ nghịch đến quá trình lên men. Trường hợp này tương tự như trên môi trường ri đường.

Thí nghiệm tối ưu hóa theo đường dốc nhất

Bảng 10. Thí nghiệm theo hướng gradient của mật độ quang

Tên	x_1 (%)	x_2 (%)	y (g/l)
Mức cơ sở	1,250	4,000	
Hệ số b_j	-21,163	-8,548	
Khoảng biến thiên Δ_j	0,750	2,000	
$b_j \Delta_j$	-15,872	-17,096	
Bước nhảy δ	-0,320	-0,350	
Bước làm tròn	-0,320	-0,350	
Thí nghiệm 8	0,930	3,650	541,10
Thí nghiệm 9	0,610	3,300	523,00

Thí nghiệm 10	0,290	2,950	400,00
Thí nghiệm 11	0,000	2,600	114,50
Thí nghiệm 12	0,000	2,250	56,00

Kết quả trên cho thấy năng suất S-BC thu được cao nhất ở thí nghiệm thứ 8, ở các thí nghiệm kế tiếp khối lượng S-BC thu được giảm dần, vì vậy thí nghiệm thứ 8 cho kết quả tốt nhất theo hướng gradient đã chọn với năng suất S-BC ($m=541,1g/l$).

Vậy, qua khảo sát quá trình lên men trong môi trường nước mía để tạo sản phẩm S-BC đã xác định được:

- Phương trình hồi quy :

$$y = 30,787 - 21,163x_1 - 8,548x_2$$

với các hệ số hệ số : $b_1 = -21,163 < 0$;

$b_2 = -8,548 < 0$;

- Thành phần peptone và glucose đều ảnh hưởng tỷ lệ nghịch đến quá trình.

- Giá trị phù hợp nhất cho quá trình lên men tạo BC ứng với điều kiện: thành phần peptone ($x_1 = 0,93\%$); glucose ($m = 3,65\%$); pH: 5,2; nhiệt độ ủ: $30,5^\circ C$; thời gian nuôi cấy: 102 giờ.

Khảo sát tốc độ lắng tối ưu trong lên men chìm thu nhận A-BC

Bảng 11. Tóm tắt kết quả thí nghiệm khảo sát tốc độ lắng

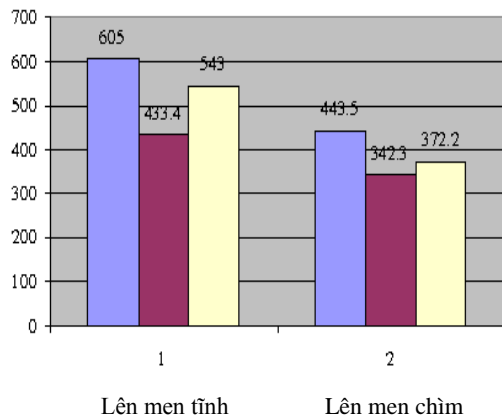
Tên Môi trường	Sản lượng A-BC tươi (g/l)								
	TN1 150 (v/p)	TN2 175 (v/p)	TN3 200 (v/p)	TN4 215 (v/p)	TN5 225 (v/p)	TN6 235 (v/p)	TN7 250 (v/p)	TN8 275 (v/p)	TN9 300 (v/p)
Ri đường	114,50	178,10	281,20	342,30	315,40	284,40	254,50	179,80	80,70
Nước mía	110,60	198,10	234,00	372,20	312,30	267,80	211,20	146,50	71,20

Từ kết quả cho thấy :

Tốc độ lắng tối ưu trong lên men chìm tạo A-BC trên các môi trường nghiên cứu được xác định là giống nhau: 215 vòng/ phút, đây là tốc độ phù hợp trong thực tế, tiết kiệm năng lượng và an toàn cho vận hành.

Khối lượng A-BC tươi thu được thấp hơn so với lên men tĩnh S-BC ($= 74,36\%$) kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả trước đây.

Năng suất BC (g/l)



Biểu đồ 1. So sánh năng suất BC trên môi trường nước dừa, ri đường và nước mía

KẾT LUẬN

Có thể nuôi cấy vi khuẩn *A. xylinum* BC16 trên môi trường nguyên liệu: ri đường, nước mía để lên men thu nhận BC thay thế cho môi trường truyền thống nước dừa.

Các điều kiện tối ưu để nuôi cấy phòng thí nghiệm: (i) Môi trường ri đường: pH: 4,9; nhiệt độ: 30°C; thời gian: 107 giờ; (ii) Môi trường nước mía: pH: 5,2 ; nhiệt độ: 30,5°C; thời

gian:102 giờ. Các điều kiện này khá tương đồng với môi trường truyền thống nước dừa: pH: 5,2; nhiệt độ: 30,3°C; thời gian: 92 giờ. Đây là các điều kiện nuôi cấy gần với điều kiện tự nhiên, dễ dàng áp dụng vào thực tế.

Tối ưu hóa tỷ lệ pepton và glucose trong lên men bề mặt tạo S-BC cho các kết quả: (i) Môi trường ri đường: pepton: 1,00%; glucose: 2,78%; (ii) Môi trường nước mía: pepton: 0,77%; glucose: 3,65%. So sánh với môi trường nước dừa (pepton: 1,5%; glucose: 3,325%) tỷ lệ pepton trên hai môi trường này ít hơn không đáng kể. Năng suất BC thu được cao nhất trên môi trường nước dừa và thấp nhất trên môi trường ri đường (Biểu đồ 1).

Xây dựng quy trình lên men tĩnh thu nhận BC (Bảng 11).

Đối với lên men chìm thu nhận A-BC: Sử dụng quy trình như lên men tĩnh, tốc độ lắc tối ưu là 215 vòng/phút cho cả hai loại môi trường nghiên cứu.

Bảng 11. Tóm tắt quy trình lên men tĩnh thu nhận BC

Môi trường	Tỷ lệ giống	Điều kiện lên men	Thành phần môi trường
1/Ri đường	10%	pH : 4,9 Nhiệt độ : 30°C Thời gian : 107 giờ	Ri đường 4% Peptone 1,0% Glucose 2,78% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,8% (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,2% Acetic 0.5% Nước cất cho đủ 100 ml
2/Nước mía	10%	pH : 5,2 Nhiệt độ : 30,5°C Thời gian : 102 giờ	Nước mía 10% Peptone 0,93% Glucose 3,65% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,8% (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,2% Acetic 0.5% Nước cất cho đủ 100 ml

Optimization of fermentation process to achieve bacterial cellulose on molasses medium and sugarcane juice medium

• Pham Van Phien

• Nguyen Thuy Huong

University of Technology, VNU-HCM

ABSTRACT

The objective of this thesis is studying the condition of fermentation using *Acetobacter xylinum* on molasses medium and sugarcane juice medium. Multi-objective optimization method was used to optimized the factors of fermentation process in order to achieve the highest yield of Bacterial Cellulose.

The results showed that pepton: 1.0%; glucose 2.78% ; pH 4.9, temperature 30°C in

107 hours were optimal fermentation conditions for molasses medium while pepton: 0.93% ; glucose: 3.65% ; pH 5.2; temperature 30.5 °C in 102 hours were optimal fermentation conditions for sugarcane juice medium.

These two media above can be used as new media for the culture of *Acetobacter xylinum* in comparison to coconut milk medium.

Keyword: bacterial cellulose, *Acetobacter xylinum*, molasses, sugarcane juice.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S. Bielecki, A. Krystynowicz, M. Turkiewicz, H. Kalinowska, Bacterial Cellulose, *Technical University of Łódź Poland*, 3, 37-46 (2005).
- [2]. Nguyễn Cảnh, *Quy hoạch thực nghiệm*, Nhà xuất bản Đại học Bách khoa Tp.HCM (1993).
- [3]. Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập II và III*, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật. TCVN tính chất cơ lý (1976).
- [4]. E.J. Vandamme, S. De Baets, A. Vanbaelen, K. Joris, P. De Wulf, Improved production of bacterial cellulose and its application potential, *Polymer Degradation and Stability*, 59-93 (1998).
- [5]. M.E. Embuscado, J.S. Marks, J.N. BeMiller, Bacterial cellulose: Factors affecting the production of cellulose by *A. xylinum*, *Food Hydrocolloids*, 8, 407-418 (1994).
- [6]. F. Yoshinaga, N. Tonouchi, K. Watanabe, Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material, *Biosci. Biochem.*, 61, 219-224 (1997).
- [7]. H. Son, M. Heo, Y. Kim, S. Lee, Optimization of fermentation conditions for the production of BC by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 33, 1-5 (2001).

[8]. Nguyễn Thúy Hương, Phạm Thành Hồ,
*Chọn lọc dòng A. xylinum thích hợp cho các
loại môi trường dùng trong sản xuất*

*Cellulose vi khuẩn với quy mô lớn, ĐHQG
Tp. HCM (2005).*