

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHỦNG PROBIOTICS DÙNG TRONG CHĂN NUÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG BỐN YẾU TỐ

OPTIMIZING THE CULTURE CONDITIONS OF PROBIOTICS STRAIN IN LIVESTOCK BY FOUR-FACTORS RESPONSE SURFACE

Bùi Văn Tú, Tăng Thị Phụng

Trường Đại học Sao Đỏ

TÓM TẮT

Trong bài viết này, ba chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Pedicoccus pentosaceu*, *Lactobacillus plantarum* đã được lựa chọn để nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *E.Coli*, *B. cereus*. Mục đích của nghiên cứu nhằm phối hợp, tạo ra cặp chủng probiotics có khả năng sinh trưởng phát triển tốt, kháng được vi sinh vật gây bệnh trong chăn nuôi lợn, đồng thời tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy của chủng probiotics. Kết quả cho thấy, trong số 3 chủng vi khuẩn nghiên cứu thì *Bacillus subtilis* và *Pedicoccus pentosaceu* có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh ở mức độ cao hơn, vòng tròn vô khuẩn tạo ra là 7,4÷8,5mm. Trong số các cặp nghiên cứu thì cặp *Pedicoccus pentosaceu*, *Bacillus subtilis* cho hiệu quả cao nhất. Kích thước vòng vô khuẩn đạt được thử với *E.Coli* là 5,6÷8,7mm, với *B. cereus* là từ 5,3 – 8,7mm. Giá trị pH của môi trường đạt được sau 24 giờ nuôi cấy là 4,0÷4,5.

Nghiên cứu sử dụng môi trường cơ bản với 10 g pepton, 3 g NaCl, 5 g cao thịt, Cao nấm men: 5,0 g/l; Glucoza: 20,0 g/l; Natri – axetat: 5,0 g/l, Diamonium citrat : 2,0 g/l; MgSO₄. 7H₂O: 0,2 g/l; MnSO₄, bổ sung 50 mM ion Ca²⁺ và nước cất vừa đủ. Kết quả xác định điều kiện để nuôi sinh khối chủng probiotics như sau: Tỷ lệ tiếp giống 7,8% (v/v); thời gian nuôi cấy 35,9 giờ; pH môi trường 6,5; Nhiệt độ môi trường 37°C. Tổng vi sinh vật đạt được là 9,514x10¹⁰CFU/ml.

Từ khóa: Vi khuẩn; *Bacillus subtilis*; *Pedicoccus pentosaceu*; *Lactobacillus plantarum*; *E.Coli*.

ASBTRACT

In this article, three strains of *Bacillus subtilis*, *Pedicoccus pentosaceu*, *Lactobacillus plantarum* were selected to study resistance against bacteria that cause *E.Coli*, *B. cereus*. The purpose of the study is to coordinate and create pairs of probiotics with good growth and development, resistant to microorganisms that cause disease in pig production, and optimize the culture conditions of probiotics strains. The results showed that, among the three studied bacterial strains, *Bacillus subtilis* and *Pedicoccus pentosaceu* were more resistant to the bacteria, the sterile circle produced was 7.4÷8.5mm. Among the study pairs, the *Pedicoccus pentosaceu*, *Bacillus subtilis* pair showed the highest efficiency. The sterile ring size obtained by testing letter with *E.Coli* is 5.6-8.7mm, with *B. cereus* is from 5.3 ÷ 8.7mm. The pH value of the medium achieved after 24 hours of culture is 4.0 ÷ 4.5.

The study used basic medium with 10 g of peptone, 3 g of NaCl, 5 g of meat high, yeast extract: 5.0 g/l; Glucose: 20,0 g/l; Sodium - acetate: 5.0 g/l, Diamonium citrate: 2.0 g/l; MgSO₄. 7H₂O: 0.2 g/l; MnSO₄, add 50 mM Ca²⁺ ions and distilled water just enough. Results of determining conditions for raising probiotics strain as follows: Breeding ratio 7.8% (v/v); culture time 35.9 hours; Environmental pH 6.5; Ambient temperature 37°C. The total number of microorganisms is 9,514x10¹⁰CFU/ml.

Keyword: Bacteria; *Bacillus subtilis*; *Pedicoccus pentosaceu*; *Lactobacillus plantarum*; *E.Coli*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo tổ chức y tế thế giới FAO/WHO: "Probiotics là các vi sinh vật sống khi được đưa một lượng cần thiết vào cơ thể sẽ đem lại hiệu quả có lợi cho cơ thể". Probiotics không gây bệnh, chịu được pH thấp của dạ dày, khả năng bám dính và tăng sinh trên biểu mô thành ruột, khả năng đối kháng và làm giảm số lượng vi khuẩn có hại với vật chủ, khả năng tiết các enzyme thủy phân thức ăn, các vitamin hay các hợp chất thứ cấp có lợi khác cho vật chủ

(Fuller,1989) [3]. Ngoài ra, Probiotics còn cạnh tranh dinh dưỡng với hại khuẩn; Tăng sức đề kháng; Cung cấp nhiều chất như: folic acid, niacin, riboflavin, vitamin B₆ và B₁₂; Giảm cholesterol, Triglycerit, huyết áp, giúp chóng bình phục sau khi mắc bệnh tiêu chảy và sử dụng nhiều kháng sinh. Đối với ngành chăn nuôi hiện nay, việc sử dụng các lợi khuẩn bằng lên men sản sinh axit lactic hoặc bổ sung trực tiếp axit lactic, làm cho pH đường ruột giảm thấp (4,0 ÷ 4,5). Quá trình lên men bởi vi khuẩn

lactic tạo ra acid lactic, acid axetic làm giảm pH ban đầu của hỗn hợp. Ở môi trường này các vi khuẩn bệnh như *Coliforms*, *E. coli*, *Samonella*,... bị ức chế và tiêu diệt, nhờ vậy hạn chế được tiêu chảy và rối loạn tiêu hoá, nhất là ở lợn con sau cai sữa. Thức ăn lỏng lên men có pH thấp đã giúp tăng hoạt tính của pepsin ở dạ dày, từ đó nâng cao được tỷ lệ tiêu hoá protein thức ăn. Khi pH đường ruột thấp, vi khuẩn bệnh ở ruột bị loại bỏ, niêm mạc ruột được bảo vệ, ruột khoẻ, nhờ vậy khả năng tiêu hoá hấp thu thức ăn được nâng cao và chức năng miễn dịch của ruột cũng được cải thiện (80 - 85% hệ miễn dịch cơ thể nằm ở đường ruột).

Các chủng vi sinh vật sử dụng làm probiotic chủ yếu là các chủng vi khuẩn thuộc các chi *Lactobacillus* (Mookiah et al., 2014) [5], *Bifidobacterium* và *Bacillus* (Khaksar et al., 2012) [4]. Ngoài ra, các loài *Bacillus*, đặc biệt là *B. subtilis* còn có khả năng tiết ra nhiều loại enzyme tiêu hóa giúp cải thiện khả năng hấp thụ thức ăn của vật chủ cũng như khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh cho vật chủ (Westers et al., 2004; Stein, 2005) [7][8]. Việc lựa chọn các yếu tố về điều kiện lên men bao gồm thành phần môi trường, nhiệt độ, pH, thời gian, tỷ lệ giống trong phòng thí nghiệm trước khi áp dụng vào sản xuất trên quy mô công nghiệp nhằm tiết kiệm chi phí, mang lại sản phẩm probiotic chất lượng tốt, có lợi cho cả người sản xuất và tiêu dùng.

2. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1. Môi trường nuôi cấy

a. Môi trường MRS

Peptone từ casein : 10,0 g/l; Cao thịt bò: 10,0 g/l; Cao nấm men: 5,0 g/l; Glucoza: 20,0 g/l; Natri – axetat: 5,0 g/l; Tween 80: 1,0 ml/l; Diamonium citrat : 2,0 g/l; MgSO₄. 7H₂O: 0,2 g/l; MnSO₄ : 0,2 g/l; Agar: 2,0%.

b. Môi trường cơ bản

10 g pepton, 3 g NaCl, 5 g cao thịt, Cao nấm men: 5,0 g/l; Glucoza: 20,0 g/l; Natri – axetat: 5,0 g/l, Diamonium citrat : 2,0 g/l; MgSO₄. 7H₂O: 0,2 g/l; MnSO₄, bổ sung 50 mM ion Ca²⁺ và nước cất vừa đủ.

c. Môi trường NA agar

Thành phần môi trường Nutrient Agar (g/l):

Extract yeast: 3;

Peptone: 5;

Agar: 15.

Các môi trường nghiên cứu được điều chỉnh pH bằng hai dung dịch NaOH 1M và HCl 1M, được vô trùng ở 121°C, 1atm, 15 phút.

2.2. Chủng vi sinh vật

Các chủng vi khuẩn: *Bacillus subtilis*, *Pedicoccus pentosaceu*, *Lactobacillus plantarum*, *E. coli* và *B. cereus* sử dụng được lấy từ phòng thí nghiệm vi sinh vật Khoa Thực phẩm và Hóa học, Trường Đại học Sao Đỏ.

3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Khả năng đối kháng giữa vi sinh vật thử nghiệm với vi khuẩn gây bệnh

a. Mục đích thí nghiệm: Xác định khả năng kháng *E. coli* và *B. cereus* của các chủng được lựa chọn nghiên cứu (*Bacillus subtilis*, *Pedicoccus pentosaceu*, *Lactobacillus plantarum*) bằng cách dựa vào đường kính vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh lỗ thạch.

b. Phương pháp xác định: Khả năng kháng khuẩn của các chủng vi sinh vật thử nghiệm đối với các chủng vi khuẩn kiểm định (*E. coli* và *B. cereus*) được xác định theo phương pháp của De Angelis và cs. (2006) [2], Aslim và cs. (2006) [1]. Vi sinh vật được nuôi cấy qua đêm (khoảng 16 ÷ 18 giờ) trong môi trường lỏng trên máy lắc để đạt mật độ tế bào là 10⁸ CFU/ml. Các chủng vi sinh vật kiểm định (*E. coli* và *B. cereus*) có nồng độ từ 10⁶ - 10⁸ CFU/ml được cấy trải trên các đĩa môi trường NA agar với thể tích 100 µl. Sau đó, sử dụng các ống thép đã được vô trùng khoan các lỗ đường kính 5 mm trên các đĩa thạch. Dịch lọc của từng chủng vi sinh vật thử nghiệm được cho vào vào các lỗ thạch với thể tích 50 µl. Các đĩa thạch được ủ qua đêm ở 37°C.

Khả năng kháng *E. coli* và *B. cereus* của các chủng vi sinh vật thử nghiệm được xác định dựa vào đường kính vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh lỗ thạch.

3.2. Xác định hiệu quả phối hợp các chủng probiotic

a. Mục đích thí nghiệm: Phối hợp chủng tạo hương vị bằng cách kết hợp 3 chủng tạo thành 3 cặp nhằm xác định hiệu quả kháng khuẩn. Các cặp được phối hợp là: *Bacillus subtilis* + *Lactobacillus plantarum*; *Pedicoccus pentosaceu* + *Bacillus subtilis*; *Pedicoccus pentosaceu* + *Lactobacillus plantarum*. Các chủng vi sinh vật nghiên cứu được chuẩn bị như sau:

Đối với vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* và *Pedicoccus pentosaceu*, chuẩn bị môi trường 50 mL dung dịch MRS (đã tiệt trùng) là môi trường tăng sinh. Làm nguội dung dịch đến nhiệt độ 37°C. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* và *Pedicoccus pentosaceu* từ ống

thực hiện cho vào dung dịch MRS broth. Tiến hành ủ tăng sinh 30 giờ ở nhiệt độ 37°C, thực hiện đếm số khuẩn lạc và tính mật số vi khuẩn lactic.

Đối với vi khuẩn *Bacillus subtilis*, chuẩn bị 50 mL dung dịch môi trường cơ bản như mục 2.1 sau đó được tiệt trùng trong vòng 15 phút ở nhiệt độ 121 °C rồi làm nguội dung dịch đến nhiệt độ 37°C. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* cho vào dung dịch môi trường cơ bản. Tất cả các thao tác đều tiến hành trong điều kiện vô trùng. Sau khoảng thời gian ủ tăng sinh 30 giờ ở nhiệt độ 37°C, thực hiện đếm số khuẩn lạc và tính mật số vi khuẩn.

b. Thiết kế thí nghiệm

Mỗi cặp vi sinh vật thử nghiệm được xác định khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh (*E.Coli* và *B.cereus*) và xác định khả năng tạo acid ở 5 mức là 10⁴CFU/ml; 10⁵CFU/ml; 10⁶CFU/ml; 10⁷CFU/ml; 10⁸CFU/ml. Nồng độ vi sinh vật gây bệnh là 10⁶CFU/ml, 10⁷CFU/ml, 10⁸CFU/ml. Khả năng kháng khuẩn của các chủng vi sinh vật thử nghiệm đối với các chủng vi khuẩn kiểm định (*E. coli* và *B. cereus*) được xác định theo phương pháp của De Angelis và cs. (2006), Aslim và cs. (2006). Giá trị pH được xác định ở môi trường MRS (*Lactobacillus plantarum* và *Pedicoccus pentosaceu*) và môi trường cơ bản bao gồm: 10 g pepton, 3 g NaCl, 5 g cao thịt và nước cất (*B.subtilis*) sau khi nuôi cấy 6 giờ.

3.3. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng probiotic

a. Mục đích thí nghiệm: Vi khuẩn lactic chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như chủng loại vi khuẩn, điều kiện dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy. Mục đích của thí nghiệm này là xác định tỷ lệ giống, thời gian nuôi cấy, pH môi trường, nhiệt độ nuôi cấy nhằm thu được chủng probiotics phù hợp với chăn nuôi.

b. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy

Phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology) được lựa

Bảng 1. Ma trận bố trí thí nghiệm mã hóa các biến độc lập

Tên biến	Mức nghiên cứu					
Biến thực	Biến mã	- α	- 1	0	+ 1	+ α α
Z1: Tỷ lệ giống (%)	x ₁	2,5	5	7,5	10	12,5
Z2: Thời gian (giờ)	x ₂	12	20	28	36	44
Z3: pH lên men	x ₃	4.0	5,0	6,0	7,0	8.0
Z4: Nhiệt độ (°C)	x ₄	25	30	35	40	45

Ghi chú: α = 2, x_{max}, x_{min} là giá trị cận trên (+1) và cận dưới (-1) của biến độc lập, x₀ = (x_{min} + x_{max})/2 là giá trị trung bình của cận trên và cận dưới.

chọn để tối ưu hóa điều kiện lên men. Bốn thông số quan trọng của quá trình chiết được nghiên cứu bao gồm: Z₁- tỷ lệ giống: 5÷10 % (giống được chuẩn bị theo mục 3.2, chủng *Pedicoccus pentosaceu* có mật độ là 3,65x10¹⁰CFU/ml ;Chủng *Bacillus subtilis* có mật độ là 4,32x10¹⁰ CFU/ml); Z₂- thời gian nuôi cấy: 20÷36 giờ; Z₃- pH môi trường: 5,0÷7,0; Z₄-Nhiệt độ: 30÷40°C. Miền nghiên cứu của các yếu tố thu được thông qua các thí nghiệm khảo sát trực tiếp tại phòng thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy sử dụng môi trường cơ bản bao gồm: 10 g pepton, 3 g NaCl, 5 g cao thịt, bổ sung 50 mM ion Ca²⁺ và nước cất sau đó được tiệt trùng trong vòng 15 phút ở nhiệt độ 121 °C rồi làm nguội dung dịch đến nhiệt độ 37°C.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trục tâm quay (Rotatable Central Composite Design) và ma trận thí nghiệm được xây dựng bằng phần mềm Design Expert 11.0. Trong các nghiên cứu thăm dò, chúng tôi đã xác định được giá trị biên của các nhân tố chiết như trình bày trong bảng 1. Trong số 30 thí nghiệm được tiến hành, 16(2⁴) thí nghiệm ở hai mức (trên và dưới), 8 (2 × 4) thí nghiệm ở điểm sao và 6 thí nghiệm ở tâm. Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại ba lần và lấy kết quả trung bình. Mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập đối với biến phụ thuộc có dạng hàm đa thức bậc hai có dạng tổng quát như sau:

$$Y_k = B_0 + \sum_{j=1}^4 B_j X_j + \sum_{i,j=1}^4 B_{ij} X_i X_j + \sum_{j=1}^4 B_{ij} B_j^2$$

Trong đó:

Y_k : Biến phụ thuộc (k = 1 ÷ 4)

X_{ij}: Nhân tố mã hóa của biến độc lập ảnh hưởng đến Y_k

B₀: Hệ số hồi qui bậc 0

B_j: Hệ số hồi qui bậc 1 mô tả ảnh hưởng của biến X_j đến Y_k

B_{ij}: Hệ số ảnh hưởng đồng thời của biến X_i và X_j đến Y_k

B_{ijj}: Hệ số hồi qui bậc hai mô tả ảnh hưởng của biến X_{2j} đến Y_k

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

4.1. Khả năng kháng vi khuẩn *E. coli* và *B. cereus*

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn gây bệnh của các chủng vi sinh vật

VSV thử nghiệm	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)					
	<i>E. coli</i>			<i>B. cereus</i>		
	10 ⁶ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁸ CFU/ml	10 ⁶ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁸ CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	8,3	8,1	7,8	8,1	7,7	7,4
<i>Pedicoccus pentosaceu</i>	8,5	8,3	8,0	8,4	8,2	7,8
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7,5	7,2	6,9	7,7	7,4	7,1

Kết quả nghiên cứu cho thấy 3 chủng nghiên cứu đều có khả năng kháng *E.coli* và *B.cereus*. Khả năng kháng khuẩn của *Bacillus subtilis* và *Pedicoccus pentosaceu* với các vi khuẩn gây bệnh ở mức độ cao hơn và tạo ra vòng tròn vô khuẩn nằm trong dải 7,4-8,5mm. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có khả năng

tạo ra vòng tròn kháng khuẩn thấp hơn và nằm trong dải 7,1-7,7mm.

4.2. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của các cặp probiotics

Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của các cặp probiotics được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Khả năng kháng khuẩn của các cặp chủng vi khuẩn probiotics

VSV thử nghiệm		Đường kính vòng vô khuẩn (mm)					
		<i>E. coli</i>			<i>B. cereus</i>		
		10 ⁶ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁸ CFU/ml	10 ⁶ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁸ CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i> ;	10 ⁴ CFU/ml	-	-	-	-	-	-
	10 ⁵ CFU/ml	5,8	5,3	5,1	5,5	5,3	5,2
	10 ⁶ CFU/ml	6,5	6,1	5,2	6,2	6,0	5,4
	10 ⁷ CFU/ml	8,0	7,6	6,8	7,7	7,3	6,8
	10 ⁸ CFU/ml	8,1	7,7	7,4	7,9	7,5	7,3
<i>Pedicoccus pentosaceu</i> + <i>Bacillus subtilis</i> ;	10 ⁴ CFU/ml	-	-	-	-	-	-
	10 ⁵ CFU/ml	5,6	5,2	5,1	5,7	5,3	5,4
	10 ⁶ CFU/ml	6,7	6,4	5,3	6,4	6,1	5,2
	10 ⁷ CFU/ml	8,2	8,0	7,6	7,7	7,3	5,9
	10 ⁸ CFU/ml	8,6	8,3	8,0	8,7	7,9	7,4
<i>Pedicoccus pentosaceu</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i>	10 ⁴ CFU/ml	-	-	-	-	-	-
	10 ⁵ CFU/ml	5,5	5,2	5,1	5,2	5,4	5,1
	10 ⁶ CFU/ml	5,6	5,7	5,6	5,3	5,8	5,1
	10 ⁷ CFU/ml	6,7	6,0	5,3	6,2	5,5	5,2
	10 ⁸ CFU/ml	7,3	7,1	6,5	7,3	7,2	6,1

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự phối hợp giữa các chủng nghiên cứu đạt hiệu quả kháng vi khuẩn gây bệnh khá cao. Kích thước

vòng vô khuẩn tạo thành ở các cặp vi khuẩn nghiên cứu có sự khác biệt rõ ràng. Ở nồng độ vi khuẩn nghiên cứu là 10⁴CFU/ml không tạo

được vòng vô khuẩn ở cả 3 cặp nghiên cứu. Khi tăng nồng độ các cặp thí nghiệm thì kích thước vòng vô khuẩn cũng tăng theo. Cụ thể, ở cặp *Bacillus subtilis* + *Lactobacillus plantarum* khi tăng nồng độ vi khuẩn từ 10^4 CFU/ml đến 10^8 CFU/ml thì kích thước vòng vô khuẩn với *E.Coli* ở nồng độ lây nhiễm 10^8 CFU/ml lần lượt là 5,1; 5,2; 6,8; 7,4 mm. Trong số các cặp nghiên cứu thì cặp *Pedicoccus pentosaceu* + *Bacillus subtilis* cho hiệu quả hơn cả. Kích thước vòng vô khuẩn đạt được với *E.Coli* là

5,6÷8,7mm, với *B. cereus* là từ 5,3 ÷ 8,7mm. Năm 1999 [6], khi nghiên cứu phối hợp 2 chủng *Lactobacillus plantarum* và *Bacillus subtilis*, Reid đã cho biết sự phối hợp 2 chủng mang lại nhiều lợi ích cho vật chủ bởi chúng có khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột, tồn tại và tăng trưởng với vật chủ; đồng thời ngăn chặn hoặc giảm sự bám vào của các tác nhân gây bệnh, cạnh tranh dinh dưỡng với vi khuẩn gây bệnh, kích thích hệ miễn dịch cho vật chủ và ức chế sự tăng trưởng của các tác nhân gây bệnh.

Bảng 4. Kết quả xác định giá trị pH

Chủng vi sinh vật	Giá trị pH tại các nồng độ				
	10^4 CFU/ml	10^5 CFU/ml	10^6 CFU/ml	10^7 CFU/ml	10^8 CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i> ;	5,6	4,9	4,5	4,3	4,2
<i>Pedicoccus pentosaceu</i> + <i>Bacillus subtilis</i> ;	5,2	4,8	4,5	4,2	4,0
<i>Pedicoccus pentosaceu</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i>	4,6	4,3	4,0	3,8	3,7

Giá trị pH của môi trường khi nghiên cứu các cặp chủng vi sinh vật sau 6 giờ lên men ở các nồng độ lây nhiễm ban đầu từ 10^4 CFU/ml – 10^8 CFU/ml cho thấy nồng độ vi sinh vật ban đầu càng cao thì khả năng lên men tạo acid càng nhanh và dễ dàng đạt được pH từ 3,7-4,0 sau 6 giờ lên men. Trong 3 cặp nghiên cứu,

Pedicoccus pentosaceu + *Bacillus subtilis* tạo độ pH nằm trong khoảng 4,0÷4,5 ở nồng độ ban đầu 10^6 CFU/ml ÷ 10^8 CFU/ml và phù hợp với pH trong cám dạng lỏng mà nhiều tác giả nước ngoài đã công bố. Cặp chủng *Bacillus subtilis* + *Lactobacillus plantarum* cũng có tốc độ phát triển tốt và cho giá trị pH 4,2-5,6.

4.3. Điều kiện nuôi cấy chủng probiotics

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trực tâm quay (Rotatable Central Composite

Design) và ma trận thí nghiệm được xây dựng bằng phần mềm Design Expert 11.0. Kết quả thu được ở bảng 4

Bảng 4. Kết quả bố trí thí nghiệm đầy đủ theo phương pháp bề mặt đáp ứng

TT	Biến mã hóa				Biến thực				Y ₁ : Tổng VSV (CFU/mlx10 ¹⁰)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Z ₁ (% giống)	Z ₂ : Thời gian (giờ)	Z ₃ : pH	Z ₄ : Nhiệt độ (°C)	
1	-1	-1	-1	-1	5,0	20,0	5,0	30,0	6,75
2	1	-1	-1	-1	10,0	20,0	5,0	30,0	7,05
3	-1	1	-1	-1	5,0	36,0	5,0	30,0	8,30
4	1	1	-1	-1	10,0	36,0	5,0	30,0	8,75
5	-1	-1	1	-1	5,0	20,0	7,0	30,0	7,20
6	1	-1	1	-1	10,0	20,0	7,0	30,0	8,65
7	-1	1	1	-1	5,0	36,0	7,0	30,0	8,50
8	1	1	1	-1	10,0	36,0	7,0	30,0	8,85
9	-1	-1	-1	1	5,0	20,0	5,0	40,0	8,35

10	1	-1	-1	1	10,0	20,0	5,0	40,0	8,90
11	-1	1	-1	1	5,0	36,0	5,0	40,0	9,30
12	1	1	-1	1	10,0	36,0	5,0	40,0	9,35
13	-1	-1	1	1	5,0	20,0	7,0	40,0	9,05
14	1	-1	1	1	10,0	20,0	7,0	40,0	9,25
15	-1	1	1	1	5,0	36,0	7,0	40,0	9,15
16	1	1	1	1	10,0	36,0	7,0	40,0	9,35
17*	-2	0	0	0	2,5	28,0	6,0	35,0	5,50
18*	2	0	0	0	12,5	28,0	6,0	35,0	8,50
19*	0	-2	0	0	7,5	12,0	6,0	35,0	6,25
20*	0	2	0	0	7,5	44,0	6,0	35,0	9,00
21*	0	0	-2	0	7,5	28,0	4,0	35,0	6,10
22*	0	0	2	0	7,5	28,0	8,0	35,0	9,45
23*	0	0	0	-2	7,5	28,0	6,0	25,0	8,55
24*	0	0	0	2	7,5	28,0	6,0	45,0	9,35
25 ^t	0	0	0	0	7,5	28,0	6,0	35,0	9,20
26 ^t	0	0	0	0	7,5	28,0	6,0	35,0	9,15
27 ^t	0	0	0	0	7,5	28,0	6,0	35,0	9,05
28 ^t	0	0	0	0	7,5	28,0	6,0	35,0	9,00
29 ^t	0	0	0	0	7,5	28,0	6,0	35,0	9,15
30 ^t	0	0	0	0	7,5	28,0	6,0	35,0	9,05

Ghi chú: (*) thí nghiệm được tiến hành ở điểm sao; (t) thí nghiệm được tiến hành ở điểm tâm.

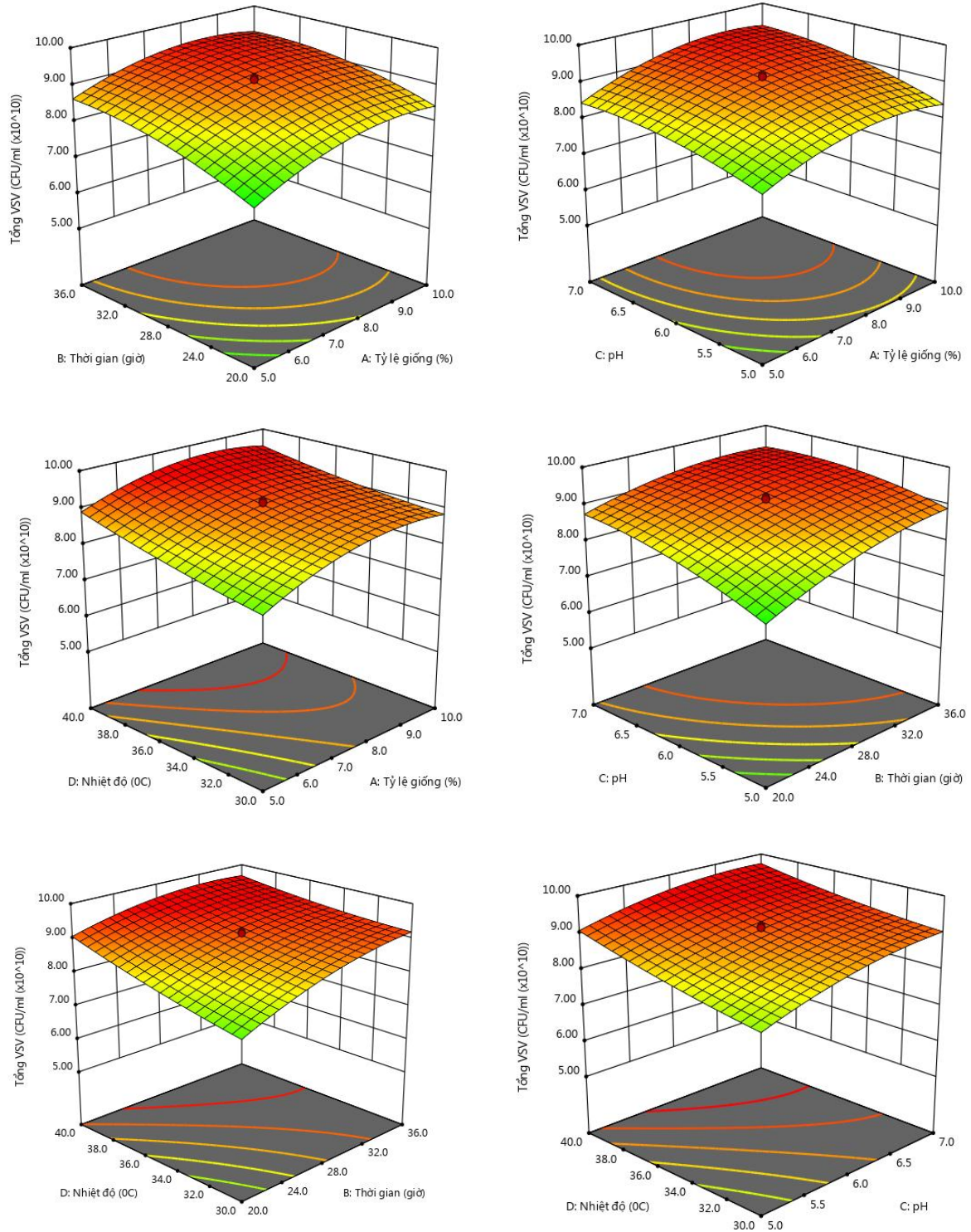
Tiến hành xử lý bằng phần mềm Design Expert 11.0 thu được mô hình toán học như sau:

Mô hình hồi quy với hàm mục tiêu là tổng vi sinh vật:

$$\begin{aligned} \text{Tổng VSV} = & -24,27305 + 1,40604 * \text{Tỷ lệ giống} + 0,625456 * \text{Thời gian} + 4,09115 * \text{pH} + 0,164063 * \text{Nhiệt độ} \\ & - 0,004531 * \text{Tỷ lệ giống} * \text{Thời gian} + 0,021250 * \text{Tỷ lệ giống} * \text{pH} \\ & - 0,007750 * \text{Tỷ lệ giống} * \text{Nhiệt độ} - 0,023047 * \text{Thời gian} * \text{pH} \\ & - 0,004922 * \text{Thời gian} * \text{Nhiệt độ} - 0,018125 * \text{pH} * \text{Nhiệt độ} \\ & - 0,065083 * \text{Tỷ lệ giống}^2 - 0,003914 * \text{Thời gian}^2 - 0,213021 * \text{pH}^2 + 0,003229 * \text{Nhiệt độ}^2 \end{aligned}$$

Mô hình có giá trị p-value = 0,0085 < α=0,05 cho thấy mô hình hồi quy là phù hợp với thực nghiệm. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) cho thấy ảnh hưởng của các nhân tố

chiết đến hàm mục tiêu. Kết quả cho thấy các biến: Z₁, Z₂, Z₃, Z₄, và Z₁², Z₂², Z₃² có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu (p < 0,05). Các biến khác mặc dù không có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu (p > 0,05), nhưng vì các biến đơn có ảnh hưởng đáng kể nên các biến tương tác của chúng cũng được giữ lại trong mô hình để tiến hành tối ưu hóa. Kết quả cho thấy cả bốn yếu tố đều ảnh hưởng đến hàm mục tiêu là số lượng vi khuẩn probiotis. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với lý thuyết về sinh khối vi sinh vật. Theo đó, các nhân tố là tỷ lệ giống (%), Thời gian (giờ), pH môi trường, nhiệt độ đều có ảnh hưởng đến hàm mục tiêu. Kết quả cũng chỉ ra, cả bốn yếu tố đều có tương tác với nhau và tương tác đến hàm mục tiêu Y₁, Y₂. Cụ thể, yếu tố Z₁, Z₂, Z₃, Z₄ có ảnh hưởng đồng biến với hàm mục tiêu.



Hình 1. Ảnh hưởng tương tác của các yếu tố (Z_1, Z_2, Z_3, Z_4) đến hàm mục tiêu

c. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy probiotic bằng Design Expert 11.0

Bảng 6. Kết quả tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy bằng Design Expert 11.0

TT	Tỷ lệ giống	Thời gian	pH	Nhiệt độ	Tổng VSV	Desirability
1	8.931	35.284	6.576	35.023	9.479	1.000
2	8.498	30.230	6.549	36.400	9.535	1.000

3	9.059	26.804	6.354	37.852	9.494	1.000
4	7.807	35.905	6.484	36.777	9.514	1.000 Selected
5	7.527	33.262	5.453	39.505	9.473	1.000
6	8.008	33.077	6.730	34.830	9.469	1.000
7	8.865	32.228	6.975	33.745	9.455	1.000
8	8.597	32.740	6.765	33.592	9.455	1.000
9	7.150	32.776	5.896	38.159	9.458	1.000
10	9.654	21.109	6.932	39.920	9.489	1.000

Như vậy, điều kiện nuôi cấy chủng probiotic cho kết quả tốt nhất ở chế độ được lựa chọn là tỷ lệ giống 7,8% (v/v), thời gian nuôi cấy 35,9 giờ, pH môi trường 6,5; Nhiệt độ môi trường nuôi cấy 37°C.

5. KẾT LUẬN

Trong số 3 loại vi khuẩn nghiên cứu thì *Bacillus subtilis* và *Pedococcus pentosaceu* có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh ở mức độ cao hơn và tạo ra vòng tròn vô khuẩn nằm trong dải 7,4-8,5mm. Trong số các cặp nghiên cứu thì cặp *Pedococcus pentosaceu* + *Bacillus subtilis* cho hiệu quả hơn cả. Kích thước vòng

vô khuẩn đạt được với *E.Coli* là 5,6-8,7mm, với *B. cereus* là từ 5,3 – 8,7mm. Giá trị pH của môi trường đạt được sau 24 h nuôi cấy là 4,0-4,5.

Sử dụng môi trường cơ bản với 10 g pepton, 3 g NaCl, 5 g cao thịt, Cao nấm men: 5,0 g/l; Glucoza: 20,0 g/l; Natri – axetat: 5,0 g/l, Diamonium citrat : 2,0 g/l; MgSO₄. 7H₂O: 0,2 g/l; MnSO₄, bổ sung 50 mM ion Ca²⁺ và nước cất vừa đủ để nuôi sinh khối chủng probiotics ở điều kiện nuôi cấy như sau: Tỷ lệ tiếp giống 7,8% (v/v); thời gian nuôi cấy 35,9 giờ; pH môi trường 6,5; Nhiệt độ môi trường 37°C. Tổng vi sinh vật đạt được là 9,514x10¹⁰CFU/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aslim B and Kilic E. Some probiotics properties of vaginal Lactobacilli isolated from healthy women. Japanese Journal of Infectious Diseases, 59, (2006), 249-253.
2. De Angelis M, Siragusa S, Berloco M, Caputo L, Settanni L, Alfonsi G, Amerio M, Grandi A and Gobbetti M. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. Research in Microbiology, 157, (2006), 792-801
3. Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 66(5): 365-378.
4. Khaksar V, Golian A, Kermanshahi H (2012) Immune response and ileal microflora in broilers fed wheat-based diet with or without enzyme Endofeed W and supplementation of thyme essential oil or probiotic PrimaLac. Afr J Biotechnol 11(81): 14716.
5. Mookiah S, Sieo C, Ramasamy K, Abdullah N, Ho Y (2014) Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. J Sci Food Agric 94(2): 341 -348.
6. Reid G, McGroarty JA, Angotti R and Cook RL. Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens. Canadian Journal of Microbiology, 34(3), (1999), 344-351.
7. Stein T (2005) Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol 56(4):845-857
8. Westers L, Westers H, Quax W (2004) Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. BBA Mol Cell Res 1694(1): 299-310