

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH LÊN MEN THU NHẬN BACTERIAL CELLULOSE TỪ MÔI TRƯỜNG WHEY VÀ MÔI TRƯỜNG PHỤ PHẨM THƠM

Phạm Văn Phiến*, Nguyễn Thúy Hương*

TÓM TẮT

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu điều kiện lên men sử dụng vi khuẩn *Acetobacter xylinum* BC16 tổng hợp bacterial cellulose trên môi trường phụ phẩm thơm và môi trường Whey protein. 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:

- Trên môi trường phụ phẩm từ thơm: (pH: 5,3; nhiệt độ: 30,6°C; thời gian: 105 giờ; pepton: 0,77%; glucose: 3,48%).

- Trên môi trường Whey protein: (pH: 5,2; nhiệt độ: 30°C; thời gian: 110 giờ; whey protein: 1,02%; glucose: 3,64%).

Qua so sánh với môi trường truyền thống nước dừa cho thấy có thể sử dụng phụ phẩm từ thơm và Whey protein làm môi trường thay thế. Từ đó xây dựng quy trình lên men thu nhận BC hiệu quả trên các loại môi trường này.

Từ khóa: bacterial cellulose, *Acetobacter xylinum*, Whey protein, phụ phẩm thơm.

OPTIMIZATION OF FERMENTATION PROCESS TO ACHIEVE BACTERIAL CELLULOSE ON PINEAPPLE MEDIUM AND WHEY PROTEIN MEDIUM

SUMMARY

The objective of this thesis is studying the condition of fermentation using *Acetobacter xylinum* on Whey protein and pineapple 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: 0.77%; glucose: 3.48%; pH 5.3, temperature 30.6°C in 105 hours were optimal fermentation conditions for pineapple medium while pepton: 1.02%; glucose: 3.64%; pH 5.2; temperature 30°C in 110 hours were optimal fermentation conditions for Whey protein medium.

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

Key word: bacterial cellulose, *Acetobacter xylinum*, pineapple, Whey protein.

1. GIỚI THIỆU

BC là hợp chất tương hợp sinh học, không độc hại, có nhiều tính chất ứng dụng 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, nên đã có những nghiên cứu cải thiện giống, đa dạng hóa môi trường 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]}.

* Trường Đại học Bách Khoa - ĐHQG TP.HCM

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 (Whey, pepton và glucose) cho quá trình lên men thu nhận BC đạt hiệu suất cao trên hai loại môi trường nguyên liệu phổ biến, rẽ tiền là phụ phẩm thơm và Whey protein. Từ đó hoàn chỉnh quy trình lên men thu nhận sản phẩm BC hiệu quả.

2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

2.1. 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.

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

Với : $b_0, b_1, b_2, b_3, b_{12}, b_{13}, b_{23}$ - các hệ số của phương trình hồi quy.

Giống được tiến hành kiểm tra và 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

2.2. Môi trường nuôi cấy

Các môi trường nuôi cấy điều chế từ các nguồn nguyên liệu Whey protein, dịch thơm sau khi bổ sung nguồn dinh dưỡng cơ bản [8].

2.3. Phương pháp thử nghiệm

2.3.1. 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- x_1 , nhiệt độ- x_2 ($^{\circ}C$) và thời gian- x_3 (giờ). Hàm mục tiêu (y) là mật độ quang (OD) của dịch nuôi cấy ứng với sinh khối vi khuẩn [3]. Phương trình hồi quy có dạng:

mục tiêu khảo sát ba yếu tố ảnh hưởng nên số thí nghiệm cần tiến hành $N = 2^3 = 8$.

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 $^{\circ}C$	30 $^{\circ}C$	32 $^{\circ}C$	2,0 $^{\circ}C$
Thời gian nuôi cấy (x_3)	48 giờ	96 giờ	144 giờ	48 giờ

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

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

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

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

2.3.2. Tối ưu thành phần Whey (hoặc peptone) và glucose trong lên men tĩnh

Để xác định điều kiện dinh dưỡng tối ưu với hai yếu tố ảnh hưởng: tỷ lệ whey- x_1 (%) (hoặc peptone) và glucose- x_2 (%) 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 : b_0, b_1, b_2, b_{12} , - các hệ số 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 tiến hành $N = 2^2 = 4$.

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

Yếu tố	Các mức giới hạn của thí nghiệm			Khoảng biến thiên
	Mức dưới -1	Mức cơ sở 0	Mức trên +1	
Tỷ lệ Peptone (x_1)	0,5 g	1,25 g	2,0 g	0,75 g
Tỷ lệ 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.

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

Chúng tôi tiến hành 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 sẽ bị loại bỏ [2].

2.3.4. Kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy

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

$$F = \frac{S_{du}^2}{S_{th}^2}$$

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.

2.3.5. 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_1 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 quy 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 [2].

2.3.6. 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.

2.3.7. Khảo sát tốc độ lactic 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 lactic 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 250ml. Chỉ tiêu theo dõi là năng suất A-BC (g/l).

3. KẾT QUẢ-THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy phòng thí nghiệm

3.1.1. Trên môi trường Whey protein

Kết quả thực nghiệm y(OD) của dịch nuôi cấy được đo trên máy quang phổ kế và được bố trí trên bảng ma trận mờ rộng (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả quy hoạch thực nghiệm trên môi trường Whey

STT	x_1 -pH	x_2 -Nhiệt độ	x_3 -Thời gian	z_1	z_2	z_3	y
1	5,5	32	144	1	1	1	0,154
2	5,5	32	48	1	1	-1	0,139
3	5,5	28	144	1	-1	1	0,170
4	5,5	28	48	1	-1	-1	0,164
5	4,5	32	144	-1	1	1	0,149
6	4,5	32	48	-1	1	-1	0,116
7	4,5	28	144	-1	-1	1	0,136
8	4,5	28	48	-1	-1	-1	0,102
9	5,0	30	96	0	0	0	0,174
10	5,0	30	96	0	0	0	0,181
11	5,0	30	96	0	0	0	0,186

Với z_1, z_2, z_3 – lần lượt là biến số mã hoá của biến thực x_1, x_2, x_3

Các hệ số hồi quy được xác định:

$b_0 = 0,141; b_1 = 0,016; b_2 = -0,002; b_3 = 0,011; b_{12} = -0,009; b_{13} = -0,006; b_{23} = 0,001; b_{123} = 0,001.$

Từ công thức ta có các giá trị:

$$S_{bj} = 0,002;$$

$$t_0=66,28; t_1= 7,273; t_2= 0,821; t_3= 5,162; t_{12}= 3,989; t_{13}= 2,698; t_{23}= 0,469; t_{123}= 0,587.$$

Tra bảng phân phối phân vị Student ta có $t(0,05;2) = 4,3$. Đối chiếu với các trị số Student tính ta thấy $t_2; t_{12}; t_{13}; t_{23}; t_{123} < t(0,05;2) = 4,3$ nên các hệ số $b_2; b_{12}; b_{13}; b_{23}; b_{123}$ không có ý nghĩa, phương trình hồi qui của hàm y là:

$$y = 0,141 + 0,016x_1 + 0,011x_3$$

Phương sai dư tính theo công thức có giá trị bằng: $S^2_{dư} = 0,0001775$

Tiêu chuẩn Fisher: $F = 4,8853211$

So sánh giá trị F với $F_b = F_{(1-p)(f_2, f_1)}$ trong đó chọn $p = 0,5; f_1 = N - N' = 8 - 3 = 5; f_2 = 2$. 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 qui là:

$$y = 0,141 + 0,016x_1 + 0,011x_3$$

Ta thấy pH môi trường và thời gian nuôi cấy đều ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng của vi khuẩn. pH môi trường ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất qua màng của tế bào vi khuẩn, pH môi trường quá thấp hoặc quá cao sẽ gây ức chế, kìm hãm quá trình lên men. Do vậy khi pH và nhiệt độ đạt giá trị tối ưu thì hiệu suất quá trình lên men sẽ đạt tối đa vì tế bào vi khuẩn trong điều kiện thuận lợi nhất sẽ tăng trưởng mạnh nhất. Thời gian nuôi cấy đủ 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 thu hồi sẽ giảm.

Tối ưu hóa thực nghiệm theo đường dốc nhất, kết quả thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Thí nghiệm theo hướng gradient trên môi trường Whey

Tên	x ₁	x ₃	y
Mức cơ sở	5,000	96,000	
Hệ số bj	0,016	0,011	
Khoảng biến thiên Δj	0,500	48,000	
bjΔj	0,008	0,528	
Bước nhảy δ	0,100	6,813	
Bước làm tròn	0,100	7.000	
Thí nghiệm 12	5,000	96,000	0,174
Thí nghiệm 13	5,100	103,000	0,179
Thí nghiệm 14	5,200	110,000	0,181
Thí nghiệm 15	5,300	117,000	0,172
Thí nghiệm 16	5,400	124,000	0,166
Thí nghiệm 17	5,500	131,000	0,160

Kết quả trên cho thấy sinh khối tế bào nuôi cấy thu được cao nhất ở thí nghiệm thứ 14 và giảm dần ở các thí nghiệm kế tiếp. Thí nghiệm thứ 14 cho kết quả tốt nhất theo hướng gradient đã chọn (OD của dịch nuôi cấy đạt 0,181).

Qua khảo sát quá trình nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường Whey protein:

- Đã xác định được phương trình hồi quy:

$$y = 0,141 + 0,016x_1 + 0,011x_3$$

với các hệ số: $b_1 = 0,016 > 0; b_3 = 0,011 > 0$

- Điều này cho thấy pH môi trường và thời gian có ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy.

- Điều kiện phù hợp nhất trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn với sinh khối tế bào lớn nhất (OD đạt 0,181) là pH : 5,2; nhiệt độ: 30°C ; thời gian nuôi cấy: 110 giờ. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Sumate Tantratian (2005).

3.1.2. Trên môi trường phụ phẩm thơm

Bảng 5. Kết quả quy hoạch thực nghiệm trên môi trường dịch thơm

STT	x ₁ -pH	x ₂ -Nhiệt độ	x ₃ -Thời gian	z ₁	z ₂	z ₃	y (OD)
1	5,5	32	144	1	1	1	0,135
2	5,5	32	48	1	1	-1	0,129
3	5,5	28	144	1	-1	1	0,125
4	5,5	28	48	1	-1	-1	0,119
5	4,5	32	144	-1	1	1	0,105
6	4,5	32	48	-1	1	-1	0,101
7	4,5	28	144	-1	-1	1	0,099
8	4,5	28	48	-1	-1	-1	0,081
9	5,0	30	96	0	0	0	0,133
10	5,0	30	96	0	0	0	0,135
11	5,0	30	96	0	0	0	0,138

Các hệ số hồi quy được xác định:

b₀=0,112; b₁=-0,015; b₂=0,006; b₃= 0,004;
 b₁₂=-0,001; b₁₃=-0,001; b₂₃= -0,002;
 b₁₂₃ = 0,002.

Từ công thức ta có các giá trị:

S_{bj} = 0,0009; t₀ = 125,60; t₁ = 17,14; t₂ = 6,46;
 t₃ = 4,78; t₁₂ = 0,84; t₁₃ = 1,40; t₂₃ = 1,97; t₁₂₃ = 1,97.

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

$$y = 0,112 + 0,015x_1 + 0,006x_2 + 0,004x_3$$

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

Phương sai dư theo công thức có giá trị bằng:

$$S^2_{\text{dư}} = 0,0000165$$

Tiêu chuẩn Fisher: F= 2,6052632

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

Với p= 0,5; f₁= 8-4 = 4; f₂= 2. Tra bảng ta có F_b = 19,30, suy ra F_b>F, phương trình phù hợp với các số liệu thực nghiệm. Phương trình hồi qui:

$$y = 0,112 + 0,015x_1 + 0,006x_2 + 0,004x_3$$

Từ phương trình hồi qui: pH môi trường (x₁), nhiệt độ nuôi cấy (x₂) và thời gian nuôi cấy (x₃) đều ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của tế bào vi khuẩn. Nhiệt độ 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 và sự tổng hợp enzym, sự phân chia tế bào. 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 6.

Bảng 6. Thí nghiệm theo hướng gradient trên môi trường dịch thom

Tên	x_1 -pH	x_2 - nhiệt độ	x_3 -thời gian	y
Mức cơ sở	5,000	30,00	96,00	
Hệ số b_j	0,015	0,006	0,004	
Khoảng biến thiên Δ_j	0,500	2,000	48,00	
$b_j\Delta_j$	0,008	0,012	0,192	
Bước nhảy δ	0,100	0,160	2,560	
Bước làm tròn	0,100	0,200	3,000	
Thí nghiệm 12	5,000	30,000	96,00	0,133
Thí nghiệm 13	5,100	30,200	99,00	0,137
Thí nghiệm 14	5,200	30,400	102,0	0,139
Thí nghiệm 15	5,300	30,600	105,0	0,145
Thí nghiệm 16	5,400	30,800	108,0	0,138
Thí nghiệm 17	5,500	31,000	111,0	0,122

Kết quả trên cho thấy sinh khối của dịch nuôi cấy thu được cao nhất ở thí nghiệm thứ 15 và giảm dần ở các thí nghiệm kế tiếp, vì vậy thí nghiệm thứ 15 cho kết quả tốt nhất theo hướng gradient đã chọn với OD của dịch nuôi cấy đạt (0,145).

Qua khảo sát quá trình nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường phụ phẩm thom:

- Đã xác định được phương trình hồi quy:

$$y = 0,112 + 0,015x_1 + 0,006x_2 + 0,004x_3$$

Với các hệ số: $b_1 = 0,015 > 0$; $b_2 = 0,006 > 0$; $b_3 = 0,004 > 0$.

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

- Giá trị phù hợp nhất cho quá trình nuôi cấy vi khuẩn với sinh khối tế bào lớn nhất (OD= 0,145): pH: 5,3; nhiệt độ: 30,6°C; thời gian nuôi cấy: 105 giờ.

3.2. Tối ưu hóa điều kiện dinh dưỡng

3.2.1. Trên môi trường Whey protein

Kết quả thực nghiệm được bố trí trên bảng ma trận mở rộng sau khi đưa thêm cột biến ảo $Z_0 = +1$.

Bảng 7. Kết quả quy hoạch thực nghiệm quá trình nuôi cấy

STT	x_1	x_2	z_1	z_2	Y
1	0,50	6,00	-1,00	1,00	410,6
2	0,50	2,00	-1,00	-1,00	586,3
3	2,00	6,00	1,00	1,00	101,0
4	2,00	2,00	1,00	-1,00	284,9
5	1,25	4,00	0	0	400,3
6	1,25	4,00	0	0	40,10
7	1,25	4,00	0	0	36,19

Các hệ số hồi quy được xác định: $b_0 = 34,570$; $b_1 = -15,275$; $b_2 = -8,990$; $b_{12} = -0,205$.

Từ công thức ta có các giá trị: $S_{b_j} = 0,7911$;

$t_0 = 43,6999$; $t_1 = 19,3091$; $t_2 = 11,3642$; $t_{12} = 0,2591$.

Đối chiếu 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 qui của hàm y_1 là:

$$y = 34,570 - 15,275x_1 - 8,990x_2$$

Phương sai dư theo công thức có giá trị:

$$S^2_{du} = 0,1681000$$

Tiêu chuẩn Fisher: $F = 0,0335768$

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:

$$y = 34,570 - 15,275x_1 - 8,990x_2$$

Từ phương trình hồi quy trên cho thấy: Thành phần whey protein (x_1) và glucose (x_2) đều ảnh hưởng đến quá trình lên men. Tỷ lệ 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).

Bảng 8. Thí nghiệm theo hướng gradient trên môi trường Whey protein

Tên	x_1	x_2	y (g/l)
Mức cơ sở	1,250	4,000	
Hệ số b_j	-15,275	-8,990	
Khoảng biến thiên Δ_j	0,750	2,000	
$b_j \Delta_j$	-11,456	-17,980	
Bước nhảy δ	-0,229	-0,360	
Bước làm tròn	-0,230	-0,360	
Thí nghiệm 8	1,020	3,640	460,5
Thí nghiệm 9	0,790	3,280	441,0
Thí nghiệm 10	0,560	2,920	340,0
Thí nghiệm 11	0,330	2,560	302,0
Thí nghiệm 12	0,100	2,200	198,0

Kết quả trên bảng cho thấy năng suất S-BC thu được cao nhất ở thí nghiệm thứ 8 và giảm dần ở các thí nghiệm leo dốc kế tiếp, vì vậy thí nghiệm thứ 8 cho kết quả tốt nhất theo hướng gradient đã chọn với năng suất S-BC cực đại (= 460,5g/l).

Vậy, qua khảo sát quá trình lên men trong môi trường whey protein tạo sản phẩm S-BC:

- Đã xác định phương trình hồi quy :

$$y = 34,570 - 15,275x_1 - 8,990x_2$$

với các hệ số: $b_1 = -15,275 < 0$; $b_2 = -8,990 < 0$

- Điều này có nghĩa là tỷ lệ Whey và tỷ lệ Glucose đều ảnh hưởng đến quá trình lên men.

- Giá trị phù hợp nhất trong quá trình lên men tạo BC cực đại: whey ($x_1 = 1,02\%$), glucose ($x_2 = 3,64\%$), pH : 5,2; nhiệt độ ủ: 30°C; thời gian lên men: 110 giờ.

3.2.2. Trên môi trường phụ phẩm thom

Bảng 9. Kết quả quy hoạch thực nghiệm quá trình

STT	x_1	x_2	z_1	z_2	y
1	0,500	6,000	-1,00	1,00	507,4
2	0,500	2,000	-1,00	-1,00	673,5
3	2,000	6,000	1,00	1,00	229,5
4	2,000	2,000	1,00	-1,00	317,4
5	1,25	4,000	0	0	505,2
6	1,25	4,000	0	0	468,2
7	1,25	4,000	0	0	459,0

Các hệ số hồi quy xác định: $b_0 = 43,195$; $b_1 = -15,850$; $b_2 = -6,350$; $b_{12} = 4,172$;

Từ công thức ta có các giá trị: $S_{b_j} = 0,8646$;

$t_0 = 49,9601$; $t_1 = 18,3324$; $t_2 = 7,3445$;
 $t_{12} = 4,2550$.

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:

$$y = 43,195 - 15,850x_1 - 6,350x_2$$

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

Phương sai dư : $S^2_{du} = 15,2881$

Tiêu chuẩn Fisher: $F = 2,5564815$

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

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:

$$y = 43,195 - 15,850x_1 - 6,350x_2$$

Từ phương trình hồi quy trên cho thấy: thành phần peptone (x_1) và glucose (x_2) đều ảnh hưởng đến quá trình lên men. Trường hợp này tương tự như trên môi trường Whey protein.

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	-15,850	-6,350	
Khoảng biến thiên Δ_j	0,750	2,000	
$b_j \Delta_j$	-11,888	-12,700	
Bước nhảy δ	-0,238	-0,254	
Bước làm tròn	-0,240	-0,260	
Thí nghiệm 8	1,010	3,740	498,3
Thí nghiệm 9	0,770	3,480	508,3
Thí nghiệm 10	0,530	3,220	488,8
Thí nghiệm 11	0,290	2,960	464,7
Thí nghiệm 12	0,050	2,700	175,90

Kết quả trên cho thấy năng suất S-BC thu được cao nhất ở thí nghiệm thứ 9 và ở các thí nghiệm kế tiếp khối lượng S-BC thu được giảm dần, vì vậy thí nghiệm thứ 9 cho kết quả tốt nhất theo hướng gradient đã chọn với năng suất S-BC ($m=508,30g/l$).

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

- Phương trình hồi quy :

$$y = 43,195 - 15,850x_1 - 6,350x_2$$

với các hệ số: $b_1 = -15,850 < 0$; $b_2 = -6,350 < 0$;

- Tỷ lệ Peptone và tỷ lệ Glucose đều ảnh hưởng đến quá trình lên men.

- Giá trị phù hợp nhất cho quá trình lên men tạo BC ứng với điều kiện: peptone ($x_1 = 0,77\%$), Glucose ($x_2 = 3,48\%$), pH: 5,3; nhiệt độ ủ: $30,6^\circ C$; thời gian nuôi cấy: 105 giờ.

3.3. Khảo sát tốc độ lactic tối ưu trong lên men chìm thu nhận A-BC

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

Tên Môi trường	Sản lượng A-BC tươi (g/l)								
	TN1	TN2	TN3	TN4	TN5	TN6	TN7	TN8	TN9
Dịch thơm	150 (v/p)	175 (v/p)	200 (v/p)	215 (v/p)	225 (v/p)	235 (v/p)	250 (v/p)	275 (v/p)	300 (v/p)
Whey protein	96,4	257,0	347,7	367,7	211,6	203,3	165,5	134,7	64,90
	111,6	180,5	332,4	362,2	341,8	328,0	302,5	268,3	102,6

Từ kết quả cho thấy :

Tốc độ lactic 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 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.

4. KẾT LUẬN

1. Có thể nuôi cấy vi khuẩn *A. xylinum* BC16 trên môi trường nguyên liệu: whey protein và phụ

phẩm thơm, để lên men thu nhận BC thay thế cho môi trường truyền thống nước dừa.

2. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy phòng thí nghiệm:

- Môi trường whey protein: pH: 5,2; nhiệt độ: 30°C; thời gian: 110 giờ.

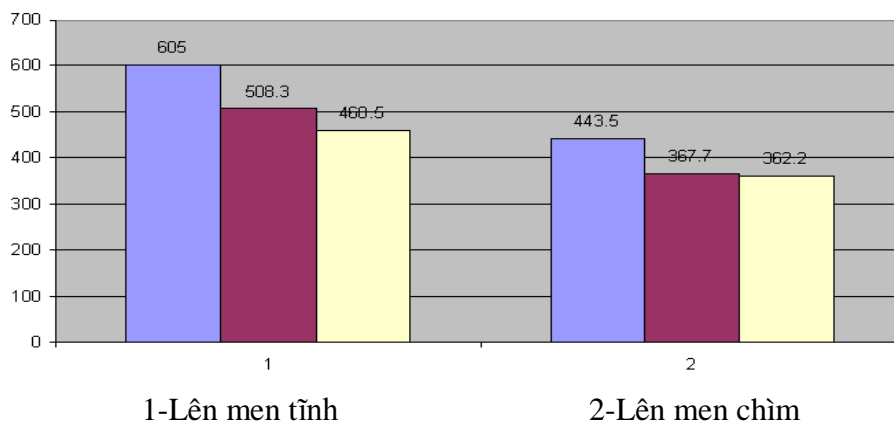
- Môi trường phụ phẩm thơm: pH: 5,3 ; nhiệt độ: 30,6°C; thời gian: 105 giờ.

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 thực tế.

3. Tối ưu hóa tỷ lệ pepton và glucose trong lên men bề mặt tạo S-BC:

Năng suất BC (g/l)



Biểu đồ 1. So sánh năng suất BC trên môi trường nước dừa; dịch thơm; whey protein

Bảng 12. Tóm tắt quy trình lên men tĩnh thu nhận BC

Môi trường	Tỷ lệ giống	Điều kiện lên men	Thành phần môi trường
1/ Whey protein	10%	pH : 5,2 Nhiệt độ : 30 °C Thời gian : 110 giờ	Whey protein 1,02% Glucose 3,64% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,8% (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,2% Acetic 0.5% Dịch chiết khoai tây 50% đủ 100 ml
2/ Phụ phẩm thơm	10%	pH : 5,3 Nhiệt độ : 30,6°C Thời gian : 105 giờ	Dịch thơm 10% Peptone 0,77% Glucose 3,48% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,8% (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,2% Acetic 0.5% Nước cất cho đủ 100 ml

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bielecki S., Krystynowicz A., Turkiewicz M., Kalinowska H. Bacterial Cellulose. *Technical University of Łódź Poland*. 2005; 3, 37-46.
- [2] Nguyễn Cảnh. Quy hoạch thực nghiệm. 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. NXB Khoa học và Kỹ thuật; 1976. TCVN tính chất cơ lý.
- [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*. 1998; 59-93.
- [5] Embuscado M.E., Marks J.S., BeMiller J.N. Bacterial cellulose: Factors affecting the production of cellulose by *A. Xylinum*. *Food Hydrocolloids*. 1994; 8(5): 407-418.
- [6] Fumihiro Yoshinaga, Naoto Tonouchi, Kunihiko Watanabe. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material, *Biosci. Biochem*. 1997; 61 (2): 219-224.
- [7] Hong-joo Son, Moon-Su Heo, Young-Gyun Kim, Sang-Joon Lee. Optimization of fermentation conditions for the production of BC by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures, *Biotechno. Appl. Biochem*. 2001; 33, 1-5.
- [8] Nguyễn Thúy Hương và 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.
- [9] Tantratian. S., Tammarate. P., Krusong. W., Bhattarakosol. P., Phunsri.A. Effect of dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter* sp. *J.Sci. Res. Univ*. 2005; 30 (2).