



DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.082

## KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN LÊN MEN LACTIC ACID TỪ RỈ ĐƯỜNG BỞI VI KHUẨN LACTOBACILLUS

Lê Thị Thanh Tâm<sup>1\*</sup> và Ngô Thị Kim Hà<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Ứng dụng kỹ thuật hạt nhân trong công nghiệp, Viện Năng lượng nguyên tử Việt Nam

<sup>2</sup>Phòng thí nghiệm Vi sinh, Công ty cổ phần dịch vụ khoa học Caltech

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lê Thị Thanh Tâm (email: [tamltt@canti.vn](mailto:tamltt@canti.vn))

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 20/12/2019

Ngày nhận bài sửa: 12/06/2020

Ngày duyệt đăng: 28/08/2020

### Title:

Investigation on lactic acid fermentation from molasses by *Lactobacillus*

### Từ khóa:

*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, lên men acid lactic, rỉ đường

### Keywords:

*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, lactic acid fermentation, molasses

### ABSTRACT

Molasses, the by-product of sugar manufacturing process, generally comprises approximately 50% (w/w) of total sugars, but it is currently used primarily as an animal feed and as a raw material in alcohol production. Lactic acid fermentation can add value to molasses and reduce pollution. The objective of this study was to examine lactic acid fermentation from molasses by *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*. The molasses was treated with sulfuric acid, added bacteria at a density of  $10^{10}$  CFU/mL and fermented lactic acid at different conditions (molasses ratio, pH, temperature, incubation time and inoculum ratio). In this study, the suitable conditions for lactic acid fermentation from molasses were determined at the molasses ratio of 15% (v/v), pH of 6.0, inoculum ratio of 10% (v/v), temperature of 37°C and 30-hour incubation time and *Lactobacillus acidophilus* could create the highest lactic acid amount (16.7 g/L) among three strains.

### TÓM TẮT

Rỉ đường, một sản phẩm phụ của quá trình sản xuất đường, có khoảng 50% (w/w) đường tổng số thường được dùng làm thức ăn gia súc và nguyên liệu sản xuất cồn. Lên men lactic acid có khả năng tạo giá trị gia tăng cho rỉ đường và giảm thiểu ô nhiễm môi trường. Đề tài này được tiến hành với mục tiêu khảo sát quá trình lên men lactic acid từ nguyên liệu rỉ đường sử dụng 3 chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus fermentum*. Rỉ đường được xử lý với acid sulfuric, bổ sung vi khuẩn đã được tăng sinh đến mật độ  $10^{10}$  CFU/mL và lên men lactic acid ở điều kiện khác nhau (tỷ lệ rỉ đường, pH, nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ vi khuẩn bổ sung). Kết quả của đề tài đã xác định được điều kiện thích hợp cho lên men lactic acid từ rỉ đường là tỷ lệ rỉ đường 15% (v/v), pH 6,0, tỷ lệ vi khuẩn bổ sung 10% (v/v), tiến hành lên men ở 37°C trong 30 giờ và trong ba chủng vi khuẩn sử dụng, *Lactobacillus acidophilus* có khả năng chuyển hóa tạo lactic acid có hàm lượng cao nhất 16,7 g/L.

Trích dẫn: Lê Thị Thanh Tâm và Ngô Thị Kim Hà, 2020. Khảo sát điều kiện lên men lactic acid từ rỉ đường bởi vi khuẩn *Lactobacillus*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(4B): 54-60.

## 1 GIỚI THIỆU

Lactic acid là một trong những gốc acid hữu cơ phổ biến nhất trong tự nhiên và được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp y dược, mỹ phẩm, hóa chất và đặc biệt là thực phẩm (Narayanan *et al.*, 2004). Nhu cầu sử dụng lactic acid ngày càng tăng do nó là monomer trong quá trình sản xuất PLA (poly lactic acid), một loại vật liệu có khả năng phân hủy sinh học, thân thiện với môi trường thay thế cho các polymer có nguồn gốc dầu mỏ. Lactic acid có thể được tạo thành bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc lên men sinh học (Vidra *et al.*, 2017). Lên men sản xuất lactic acid là một phương pháp thân thiện với môi trường và acid tạo ra có độ tinh khiết cao (Gao *et al.*, 2011). Việc lên men lactic acid được nghiên cứu từ năm 1935 bằng cách sử dụng các loại vi sinh vật và điều kiện lên men khác nhau như pH, nguồn carbon, nhiệt độ, tỷ lệ vi khuẩn, tỷ lệ cơ chất ban đầu và nguồn nitrogen (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000).

Vi khuẩn lactic (LAB) đóng vai trò quan trọng đối với sức khỏe con người và được sử dụng khá nhiều trong công nghiệp như là chế phẩm sinh học an toàn cho con người. Vi khuẩn LAB gồm các chi *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*,

*Carnobacterium*, *Sporolactobacillus* (Hoàng Thị Bảo Yến, 2014). Ri đường là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất và tinh sạch đường mía, có tồn dư dinh dưỡng cao. Sucrose có trong ri đường khi thủy phân tạo thành glucose và fructose có thể được vi khuẩn *Lactobacillus* sử dụng lên men tạo acid lactic. Việc tận dụng nguồn ri đường làm môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus* có tiềm năng góp phần giải quyết ô nhiễm môi trường và phục vụ phát triển bền vững (Bùi Hoàng Đăng Long và *ctv.*, 2019).

Các loài *Lactobacillus* có thể phân chia làm 3 nhóm dựa vào các sản phẩm của quá trình trao đổi chất (Sharpe, 1981; Kandler and Weiss, 1986). Các nghiên cứu lên men lactic acid sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus* đã xác định *Lactobacillus acidophilus* (nhóm I) lên men tạo 16,1 g/L lactic acid (Liguori *et al.*, 2015), *Lactobacillus plantarum* (nhóm II) tạo 19,07g/L lactic acid khi lên men từ lõi ngô ở điều kiện tỷ lệ vi khuẩn 6%, nồng độ đường 5%, pH 6, nhiệt độ lên men 38°C, thời gian lên men 84 giờ (Nguyễn Thị Thanh Hà, 2012) và *Lactobacillus fermentum* (nhóm III) tạo 20,93 g/L lactic acid sau 72 giờ nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng pH 6,2 có bổ sung vi khuẩn 5% (v/v) và 20 g/L glucose ở 37°C (Nguyễn Thị Diễm Hương và Đỗ Thị Bích Thủy, 2012).

**Bảng 1: Phân loại *Lactobacillus* (Sharpe, 1981; Kandler and Weiss, 1986)**

Đặc điểm	Nhóm I	Nhóm II	Nhóm III
Lên men pentose	-	+	+
Tạo CO <sub>2</sub> từ glucose	-	-	+
Tạo CO <sub>2</sub> từ gluconate	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
Sự hiện diện FDP aldolase	+	+	-
Sự hiện diện phosphoketolase	-	+ <sup>b</sup>	+
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
Một vài đại diện	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. reuteri</i>

<sup>a</sup>: khi lên men

<sup>b</sup>: cảm ứng khi có pentose

Đề tài này được thực hiện với mục tiêu xác định điều kiện lên men lactic acid thích hợp từ ri đường (tỷ lệ ri đường, pH, nhiệt độ, thời gian lên men, tỷ lệ vi khuẩn bổ sung) sử dụng ba chủng vi khuẩn *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. plantarum* và *L. fermentum*) để tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa tạo lactic acid cao nhất.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương tiện nghiên cứu

Chủng vi khuẩn:

– *Lactobacillus plantarum* VTCC 10891 (LP) và *Lactobacillus fermentum* VTCC 10802 (LF) do Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp.

– Vi khuẩn *L. acidophilus* (LA) mua của Công ty Cổ phần Hóa dược và Công nghệ Sinh học BioGreen, Hà Nội

Hóa chất và môi trường: môi trường MRS lỏng, MRS agar, NaCl, NaOH 2M, HCl 2M, Ethanol 96°, đĩa giấy oxidase, ri đường.

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

Nhằm khảo sát điều kiện thích hợp cho lên men lactic acid từ rỉ đường sử dụng 3 chủng vi khuẩn *Lactobacillus*, các chủng được tăng sinh trong môi trường MRS lỏng từ 16 đến 22 giờ ở 37°C, tương đương mật số  $10^{10}$  CFU/mL (xác định theo đường cong sinh trưởng của từng chủng). Đây là thời điểm vi khuẩn ở cuối pha log, đầu pha ổn định, sinh tổng hợp enzyme mạnh cũng như nhiều hợp chất có hoạt tính mạnh khác. Thí nghiệm được thực hiện với 100 mL dịch rỉ đường đã được bổ sung dịch tăng sinh vi khuẩn, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Hàm lượng lactic acid tạo thành được xác định bằng phương pháp chuẩn độ Thorner (Fabro *et al.*, 2006), hàm lượng đường được xác định theo TCVN 4594:1988.

### 2.2.1 Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ rỉ đường đến hàm lượng lactic acid tạo thành

Dịch rỉ đường được pha loãng đến tỷ lệ 5,0%; 10,0%; 15,0% và 20,0% v/v, điều chỉnh pH 6,0 (Nguyễn Trọng Bình, 2005). Dịch tăng sinh vi khuẩn được bổ sung vào bình tam giác chứa 100 mL dịch rỉ đường để đạt mật số  $10^8$  CFU/mL và ủ ở 37°C.

### 2.2.2 Khảo sát ảnh hưởng của pH dịch lên men

Dịch rỉ đường được pha loãng đến tỷ lệ đã chọn theo mục 2.2.1, điều chỉnh pH môi trường về 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 và 7,0. Dịch tăng sinh vi khuẩn được bổ sung vào bình tam giác chứa 100 mL dịch rỉ đường để đạt mật số  $10^8$  CFU/mL và ủ 22 giờ ở 37°C.

### 2.2.3 Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Dịch rỉ đường được pha loãng đến tỷ lệ đã chọn theo mục 2.2.1, điều chỉnh pH thích hợp theo mục 2.2.2. Dịch tăng sinh vi khuẩn được bổ sung vào bình tam giác chứa 100 mL dịch rỉ đường để đạt mật số  $10^8$  CFU/mL và ủ 22 giờ ở nhiệt độ ủ thay đổi từ 30-40°C.

### 2.2.4 Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men

Dịch rỉ đường được pha loãng đến tỷ lệ đã chọn theo mục 2.2.1, điều chỉnh pH thích hợp theo mục 2.2.2. Dịch tăng sinh vi khuẩn được bổ sung vào bình tam giác chứa 100 mL dịch rỉ đường để đạt mật số  $10^8$  CFU/mL và ủ ở nhiệt độ thích hợp theo mục 2.2.3 trong khoảng thời gian từ 22 giờ đến 34 giờ.

### 2.2.5 Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ vi khuẩn bổ sung đến hàm lượng lactic acid tạo thành

Dịch rỉ đường được pha loãng đến tỷ lệ đã chọn theo mục 2.2.1, điều chỉnh pH thích hợp theo mục

2.2.2. Dịch tăng sinh vi khuẩn được bổ sung vào bình tam giác chứa 100 mL dịch rỉ đường theo tỷ lệ 3, 5, 10, 15% v/v để đạt mật số  $10^8$  CFU/mL và ủ ở nhiệt độ thích hợp theo mục 2.2.3 trong thời gian ủ theo mục 2.2.4.

### 2.2.6 Thí nghiệm lên men lactic acid với 5 L và 50 L dịch rỉ đường

Dịch rỉ đường được pha loãng đến tỷ lệ đã chọn theo mục 2.2.1, điều chỉnh pH thích hợp theo mục 2.2.2. Dịch tăng sinh vi khuẩn được bổ sung vào bình chứa 5 L dịch rỉ đường theo tỷ lệ đã chọn ở mục 2.2.5 để đạt mật số  $10^8$  CFU/mL và ủ ở nhiệt độ thích hợp theo mục 2.2.3 trong thời gian ủ theo mục 2.2.4.

Chủng vi khuẩn lên men lactic acid có hàm lượng cao nhất trong 3 chủng khảo sát được chọn để lên men với 50 L dịch rỉ đường ở điều kiện lên men thích hợp đã chọn như trên.

## 2.3 Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

– Mật độ tế bào vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đo OD ở bước sóng 600 nm kết hợp với phương pháp đếm khuẩn lạc (Trần Linh Thuộc, 2007).

– pH dịch lên men được xác định theo TCVN 6492:2011.

– Hàm lượng đường được xác định theo TCVN 4594:1988.

– Lactic acid tạo thành được xác định bằng phương pháp chuẩn độ Thorner với dung dịch NaOH 0,1N (Fabro *et al.*, 2006): Lấy 10 mL dịch nuôi cấy đã li tâm cho vào ống nghiệm, bổ sung 20 mL nước cất và 1-2 giọt Phenolphthalein (nồng độ 1% trong cồn 90°). Chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì dừng lại. Ghi lại thể tích NaOH đã dùng để chuẩn độ.

Độ acid được tính theo độ Thorner:

$$^{\circ}T = V_{\text{NaOH}} \text{ tiêu tốn} \times 10$$

$$\% \text{ lactic acid} = ^{\circ}T \times 0,009$$

Trong đó:  $^{\circ}T$  là độ Thorner,  $1^{\circ}T$  tương ứng với 9 mg acid lactic.

– Hiệu suất lên men

$$H (\%) = \frac{M \text{ acid tạo thành}}{M \text{ đường tiêu thụ}} \times 100$$

– Phương pháp xử lý số liệu: các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, giá trị báo cáo là giá trị trung bình của 3 lần

lặp lại. Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê theo phương pháp Tukey bằng phần mềm Origin 2016.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Ảnh hưởng của tỷ lệ rỉ đường đến hàm lượng lactic acid tạo thành

Bảng 2 cho thấy hàm lượng lactic acid tạo thành từ cả 3 chủng vi khuẩn có xu hướng tăng khi tăng tỷ lệ rỉ đường từ 5-15% (v/v) và đạt cao nhất ở tỷ lệ rỉ đường 15% (v/v) sau đó có giảm nhẹ ở tỷ lệ 20% (v/v). Điều này có thể giải thích là ở tỷ lệ mật rỉ 20% do nồng độ đường quá cao làm hoạt độ nước giảm gây ức chế hoạt động của vi khuẩn làm giảm khả

năng chuyên hóa acid lactic. Tỷ lệ rỉ đường 15% (v/v) có hàm lượng đường glucose tương ứng là 6,1%. Kết quả này phù hợp với các kết quả nghiên cứu lên men lactic acid bằng vi khuẩn LAB (Nguyễn Văn Tuyên, 2011; Minh, 2014; Trinh *et al.*, 2018).

Hiệu suất lên men của 3 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* ở các tỷ lệ rỉ đường khác nhau được trình bày trong Bảng 3. Qua Bảng 3 có thể thấy hàm lượng đường tăng lên không làm tăng hiệu suất lên men acid. Như vậy, tỷ lệ rỉ đường phù hợp cho quá trình lên men lactic acid của cả 3 chủng *Lactobacillus* là 15% tương đương 6,1% hàm lượng đường.

**Bảng 2: Hàm lượng lactic acid tạo thành của 3 chủng vi khuẩn ở các tỷ lệ rỉ đường khác nhau**

Chủng vi khuẩn	Hàm lượng lactic acid (g/L) theo tỷ lệ rỉ đường (%)			
	5	10	15	20
LA	8,6±0,5	10,5±0,9 <sup>a</sup>	11,7±0,4 <sup>a</sup>	9,7±0,4 <sup>a</sup>
LF	9,0±0,6	13,2±0,2 <sup>b</sup>	13,3±0,4 <sup>b</sup>	11,6±0,1 <sup>b</sup>
LP	8,6±0,4	9,7±0,2 <sup>a</sup>	12,7±0,6 <sup>ab</sup>	12,6±0,5 <sup>c</sup>
CV (%)	5,47	15,20	6,56	11,57
Mức ý nghĩa	ns	*	*	*

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê

\* Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95% theo phép thử Tukey.

**Bảng 3: Hiệu suất lên men của 3 chủng vi khuẩn ở các tỷ lệ rỉ đường khác nhau**

Chủng LAB	Giá trị cơ chất		Đường tiêu thụ (g/L)	Acid lactic (g/L)	Hiệu suất (%)
	Tỷ lệ rỉ đường	Hàm lượng đường			
	%	%			
LA	5	2,2	9,7 <sup>a</sup>	8,6 <sup>a</sup>	88,1 <sup>a</sup>
	10	4,5	15,8 <sup>a</sup>	10,5 <sup>a</sup>	66,7 <sup>a</sup>
	15	6,1	23,1 <sup>a</sup>	11,7 <sup>a</sup>	50,6 <sup>a</sup>
	20	7,6	21,3 <sup>a</sup>	9,7 <sup>a</sup>	45,7 <sup>b</sup>
LF	5	2,2	14,6 <sup>b</sup>	9,0 <sup>a</sup>	61,6 <sup>b</sup>
	10	4,5	25,5 <sup>b</sup>	13,2 <sup>b</sup>	52,2 <sup>b</sup>
	15	6,1	17,5 <sup>b</sup>	13,3 <sup>b</sup>	76,1 <sup>b</sup>
	20	7,6	19,3 <sup>b</sup>	11,6 <sup>b</sup>	60,2 <sup>a</sup>
LP	5	2,2	10,1 <sup>a</sup>	8,6 <sup>a</sup>	84,7 <sup>a</sup>
	10	4,5	15,2 <sup>a</sup>	9,7 <sup>a</sup>	64,0 <sup>a</sup>
	15	6,1	20,0 <sup>c</sup>	12,7 <sup>ab</sup>	63,5 <sup>c</sup>
	20	7,6	20,5 <sup>a</sup>	12,6 <sup>c</sup>	61,3 <sup>a</sup>

\* Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95% theo phép thử Tukey.

#### 3.2 Ảnh hưởng của pH dịch lên men đến hàm lượng lactic acid tạo thành

Bảng 4 thể hiện khả năng lên men tạo lactic acid của 3 chủng vi khuẩn khảo sát ở các mức pH khác nhau. Ở giá trị pH 6,0 lactic acid tạo thành là cao nhất ở cả 3 chủng, *L. acidophilus* đạt 15,48 g/L, *L. fermentum* đạt 14,4 g/L và *L. plantarum* đạt 12,6

g/L. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu về xác định pH tối ưu cho lên men lactic acid sử dụng chủng *L. acidophilus* (Taillandier *et al.*, 1996; Nguyễn Trọng Bình, 2005; Wang *et al.*, 2005), *L. plantarum* (Giraud *et al.*, 1991; Nguyễn Thị Thanh Hà, 2012; Minh, 2014) và *L. fermentum* (Nguyễn Thị Diễm Hương và Đỗ Thị Bích Thủy, 2012).

**Bảng 4: Hàm lượng lactic acid tạo thành của 3 chủng vi khuẩn ở các pH khác nhau**

Chủng vi khuẩn	Hàm lượng lactic acid (g/L) theo pH				
	5	5,5	6	6,5	7
LA	5,0±0,4	9,0±0,2 <sup>a</sup>	15,5±0,7 <sup>a</sup>	13,0±0,6 <sup>a</sup>	13,0±0,2 <sup>a</sup>
LF	7,6±1,7	13,0±0,7 <sup>b</sup>	14,4±1,0 <sup>a</sup>	14,0±0,6 <sup>a</sup>	13,0±0,7 <sup>a</sup>
LP	5,8±0,7	8,3±0,3 <sup>a</sup>	12,6±0,8 <sup>ab</sup>	12,2±0,7 <sup>ab</sup>	11,7±0,5 <sup>ab</sup>
CV (%)	24,18	22,03	10,33	7,31	5,60
Mức ý nghĩa	ns	*	*	*	*

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê

\* Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95% theo phép thử Tukey.

**3.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng lactic acid tạo thành**

Nhiệt độ phát triển tối ưu của các loài vi khuẩn Lactobacillus là 30-40°C (Robin *et al.*, 2000). Kết

quả ở Bảng 5 cho thấy nhiệt độ lên men thích hợp cho 3 chủng Lactobacillus trong khoảng từ 35-40°C, trong đó ở nhiệt độ ù 37°C, quá trình lên men chuyển hóa acid là tốt nhất.

**Bảng 5: Hàm lượng lactic acid tạo thành của 3 chủng vi khuẩn ở các nhiệt độ khác nhau**

Chủng vi khuẩn	Hàm lượng lactic acid (g/L) theo nhiệt độ (°C)			
	30	35	37	40
LA	7,2±0,3 <sup>b</sup>	9,0±0,3 <sup>a</sup>	13,3±0,5 <sup>a</sup>	10,4±0,7 <sup>a</sup>
LF	10,8±0,7 <sup>a</sup>	10,8±0,8 <sup>b</sup>	13,0±0,2 <sup>a</sup>	12,2±0,7 <sup>b</sup>
LP	11,2±0,6 <sup>a</sup>	12,6±0,3 <sup>c</sup>	11,2±0,6 <sup>b</sup>	10,1±0,5 <sup>a</sup>
CV (%)	20,11	15,06	8,63	10,43
Mức ý nghĩa	*	*	*	*

\*Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95% theo phép thử Tukey.

**3.4 Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hàm lượng lactic acid tạo thành**

Kết quả lên men lactic trong dịch rỉ đường 15% (v/v) ở môi trường pH 6,0 với nhiệt độ ù 37°C trong

khoảng thời gian từ 22 giờ đến 34 giờ được trình bày trong bảng 6.

**Bảng 6: Hàm lượng lactic acid tạo thành của 3 chủng vi khuẩn ở các thời gian khác nhau**

Chủng vi khuẩn	Hàm lượng lactic acid (g/L) theo thời gian (giờ)					
	22	26	28	30	32	34
LA	11,2±0,5 <sup>a</sup>	11,7±0,3	12,4±0,3	15,3±0,6 <sup>b</sup>	15,1±0,5	15,4±0,6 <sup>b</sup>
LF	12,8±0,6 <sup>b</sup>	13,3±0,7	13,5±0,5	14,2±0,9 <sup>a</sup>	14,0±0,6	14,1±0,9 <sup>a</sup>
LP	11,7±0,3 <sup>ab</sup>	12,1±0,4	12,2±0,4	14,0±0,7 <sup>a</sup>	14,0±0,3	12,9±0,4 <sup>a</sup>
CV (%)	6,92	5,35	5,19	10,29	5,57	5,67
Mức ý nghĩa	*	ns	ns	*	ns	*

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê

\* Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95% theo phép thử Tukey.

Thời gian lên men càng dài thì lượng acid thu được càng cao, từ 30 giờ trở đi lượng acid tạo thành không tăng thêm nên lựa chọn dừng quá trình lên men ở 30 giờ để tiết kiệm chi phí.

**3.5 Ảnh hưởng của tỷ lệ vi khuẩn bổ sung đến hàm lượng lactic acid tạo thành**

Một số nghiên cứu lên men lactic acid từ vi khuẩn LAB khảo sát tỷ lệ vi khuẩn giống ban đầu bổ sung thay đổi từ 5-10% v/v (Nguyễn Trọng Bình,

2005; Nguyễn Thị Thanh Hà, 2012; Nguyễn Thị Diễm Hương, 2012; Nguyễn Phước Minh, 2014). Bảng 7 cho thấy sự ảnh hưởng của tỷ lệ vi khuẩn bổ sung vào dịch rỉ đường lên men lactic acid của 3 chủng *L. acidophilus*; *L. fermentum* và *L. plantarum* ở điều kiện pH 6,0, ù 37°C trong thời gian 30 giờ. Khi thay đổi tỷ lệ vi khuẩn bổ sung từ 3-10%, hàm lượng lactic acid thu được cũng tăng theo và đạt cao nhất tại tỷ lệ 10% ở cả 3 chủng vi khuẩn. Tuy nhiên,

khí tăng tỷ lệ vi khuẩn bổ sung lên 15%, lượng acid thu được lại giảm. Vậy tỷ lệ vi khuẩn bổ sung phù hợp cho lên men lactic acid là 10%. Nếu tỷ lệ vi khuẩn bổ sung nhiều, áp suất thẩm thấu giảm, tế bào vi sinh vật bị ức chế, quá trình lên men lactic sinh ra các sản phẩm phụ (Nguyễn Thị Thanh Hà, 2012).

Những thành phần này đã làm giảm khả năng tạo acid của vi khuẩn *Lactobacillus*. Hơn nữa, ở nồng độ vi khuẩn quá cao sẽ xảy ra sự cạnh tranh chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của vi khuẩn *Lactobacillus*.

**Bảng 7: Hàm lượng lactic acid tạo thành của 3 chủng vi khuẩn ở các tỷ lệ vi khuẩn bổ sung khác nhau**

Chủng vi khuẩn	Hàm lượng lactic acid (g/L) theo tỷ lệ vi khuẩn (%)			
	3	5	10	15
LA	10,4±0,5 <sup>b</sup>	12,2±0,4 <sup>b</sup>	17,3±0,6 <sup>a</sup>	15,8±0,3 <sup>a</sup>
LF	13,1±0,3 <sup>a</sup>	14,4±0,2 <sup>a</sup>	18,7±0,5 <sup>b</sup>	17,8±0,5 <sup>b</sup>
LP	13,1±0,4 <sup>a</sup>	13,7±0,2 <sup>a</sup>	16,7±0,4 <sup>a</sup>	15,5±1,2 <sup>a</sup>
CV (%)	11,34	7,34	5,60	7,79
Mức ý nghĩa	*	*	*	*

\* Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95% theo phép thử Tukey.

**3.6 Lên men lactic acid với 5 L và 50 L dịch rỉ đường**

Bảng 8 trình bày hàm lượng lactic acid tạo thành và hiệu suất lên men của 3 chủng vi khuẩn ở các điều kiện lên men thích hợp đã chọn ở thể tích 5 L dịch rỉ đường. So với kết quả thí nghiệm của các mục

2.2.1 đến 2.2.5 có thể thấy hàm lượng lactic acid thu được là cao hơn và hiệu suất lên men của 3 chủng tương đối đồng đều, trong đó chủng *Lactobacillus acidophilus* có khả năng lên men tạo lactic acid có nồng độ cao nhất 16,7 g/L, hiệu suất lên men đạt 56%.

**Bảng 8: Hàm lượng lactic acid và hiệu suất lên men của 3 chủng vi khuẩn**

Chủng LAB	Lactic acid (g/L)	pH sau lên men	Hiệu suất %
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	16,7±0,6 <sup>a</sup>	3,33±0,02	56,1±3,9
<i>Lactobacillus fermentum</i>	14,9±0,4 <sup>b</sup>	3,35±0,04	56,1±0,8
<i>Lactobacillus plantarum</i>	15,6±0,4 <sup>ab</sup>	3,38±0,03	51,5±0,7
CV%	5,87	1,02	5,62
Mức ý nghĩa	*	ns	ns

ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê

\* Các ký tự giống nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 95% theo phép thử Tukey.

Nghiên cứu của Nguyễn Trọng Bình (2005) lên men lactic acid từ rỉ đường bằng *L. acidophilus* chỉ thu được 9,7g/L lactic acid ở pH 6,0 thời gian lên men 24 giờ. Jiang (2018) sử dụng các chủng *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* KLDS1.8501, *L. acidophilus* KLDS1.0327, *L. acidophilus* ATCC11975, *L. plantarum subsp. plantarum* CICC23168, *L. casei* ATCC393 và *L. plantarum* NAU322 lên men lactic acid từ mật rỉ, kết quả chỉ có chủng *L. plantarum subsp. plantarum* CICC23168 lên men thu được lactic acid cao nhất (12,18g/L) khi ủ 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Vậy các điều kiện lên men đã chọn là thích hợp cho lên men lactic acid từ rỉ đường sử dụng *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus plantarum*.

Vi khuẩn *L. acidophilus* được lựa chọn để lên men mẻ 50 L từ rỉ đường với các điều kiện lên men như trên, kết quả thu được 16,7±0,6 g/L acid lactic.

**4 KẾT LUẬN**

Ba chủng *Lactobacillus* khảo sát (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus fermentum*) đều có khả năng lên men tạo lactic acid từ nguyên liệu rỉ đường. Đề tài đã lựa chọn được điều kiện thích hợp cho lên men lactic acid từ rỉ đường là tỷ lệ rỉ đường 15% (v/v), pH môi trường 6,0, nhiệt độ lên men 37°C, thời gian ủ 30 giờ, tỷ lệ vi khuẩn bổ sung 10% (v/v), mật số chủng 10<sup>8</sup> CFU/mL, trong đó chủng *Lactobacillus acidophilus* có khả năng lên men lactic acid cao nhất, tạo 16,7g/L acid lactic. Kết quả của đề tài là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm cải thiện hiệu suất lên men acid lactic, tăng khả năng sản xuất

lactic acid từ nguyên liệu ri đường sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus* ở quy mô công nghiệp.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Khoa Học và Công nghệ, 1988. TCVN 4594:1988- Đồ hộp- Phương pháp xác định đường tổng số, đường khử và tinh bột.
- Bộ Khoa Học và Công nghệ, 2011. TCVN 6492:2011-Chất lượng nước- Xác định pH.
- Bùi Hoàng Đăng Long, Phạm Quang Sin, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Ngọc Thanh và Ngô Thị Phương Dung, 2019. Khảo sát điều kiện lên men acid lactic từ ri đường sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus* chịu nhiệt. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, tập 55, Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học (2): 103-109.
- Fabro, M.A., Milanese, H.V., Robert, L.M. et al., 2006. Determination of acidity in whole raw milk: comparison of results obtained by two different analytical methods. *Journal of dairy science*, 89(3): 859–861.
- Gao, C., Ma, C., and Xu, P., 2011. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*, 29(6): 930 – 939
- Giraud, E., Lelong, B. and Raimbault, M., 1991. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(1): 96-99.
- Hoàng Thị Bảo Yến, 2014. Nghiên cứu chọn loại vi khuẩn *Lactobacillus* thích hợp cho mục đích khử protein và khoáng trên đầu và vỏ tôm. Khóa luận tốt nghiệp, đại học Nha Trang
- Hofvendahl, K. and Hahn-Hägerdal, B., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2): 87-107.
- Jiang, Y., Xu, L., Chen, M., Zhou, X., Han, C. and Wang, S., 2018. Lactic Acid Production by Fermentation of Soybean Molasses with Lactic Acid Bacteria and Carbohydrate Metabolism. *Food Science*, 39(6): 130-134.
- Kandler, O. and Weiss, N., 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: Sneath, P. H. A., Mair, N.S., Sharp, M.E. and Holt J.G. (Eds.). *Bergeys Manual of system Bacteriology*, Baltimore: Williams and Wilkins, pp 1209 – 1234.
- Liguori, R., Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P. et al., 2015. Selection of the strain *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and its application to brewers' spent grain conversion into lactic acid. *Biomed Research International*, 2015.
- Minh, N.P., 2014. Investigation of lactic acid fermentation from corn by-product using *L. casei* and *L. plantarum* strain. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development* 2014; 1(3): 92-100
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A., 2004. Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L(+) Lactic acid. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(1): 72-84.
- Nguyễn Thị Diễm Hương và Đỗ Thị Bích Thủy, 2012. Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 phân lập từ sản phẩm dưa cải huế. *Tạp Chí Khoa Học, Đại học Huế*, 71(2):175-185
- Nguyễn Thị Thanh Hà, 2012. Nghiên cứu quá trình lên men axit lactic từ lõi ngô. Luận văn thạc sĩ kỹ thuật, đại học Đà Nẵng.
- Nguyễn Trọng Bình, 2005. Nghiên cứu quá trình lên men acid lactic từ ri đường. Khóa luận tốt nghiệp. Bộ môn Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Nông lâm TP. Hồ Chí Minh
- Nguyễn Văn Tuyên, 2011. Nghiên cứu quá trình lên men axit lactic từ rơm lúa. Luận văn thạc sĩ kỹ thuật, Đại học Đà Nẵng.
- Robinson, R.K., Batt, C.A., and Patel, P.D, 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, UK, 2372 pages.
- Sharpe, M.E., 1981. The genus *Lactobacillus*. In *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, pp. 1653-1674.
- Taillandier, P., Gilis, F., Portugal, F.R., Laforce, P., and Strehaiano, P., 1996. Influence of medium composition, pH and temperature on the growth and viability of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Letters* 18(7): 775–780.
- Trần Linh Thuốc, 2007. Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, trang 69-71.
- Vidra, A., Tóth, A.J. and Németh, Á., 2017. Lactic acid production from cane molasses. *Liquid Waste Recovery*, 2: 13-16.