

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH MỘT SỐ THÔNG SỐ CÔNG NGHỆ ĐỂ THỦY PHÂN VÀ LÊN MEN BÃ ĐẬU NÀNH BỞI CÁC CHẾ PHẨM *Bacillus amyloliquefaciens* N1 VÀ *Lactobacillus fermentum* DC4t2

Đỗ Thị Bích Thủy, Lê Thị Kim Anh

Khoa Cơ khí - Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại Học Huế

Liên hệ email: dothibichthuy@huaf.edu.vn

TÓM TẮT

Trong công trình này, chúng tôi đã nghiên cứu xác định một số thông số công nghệ thích hợp để thủy phân bã đậu nành bởi *B. amyloliquefaciens* N1 và lên men phế phụ phẩm này bởi *L. fermentum* DC4t2. Kết quả của công trình làm tiền đề cho nghiên cứu xử lý kết hợp hai chế phẩm vi sinh này nhằm nâng cao giá trị sử dụng của bã đậu nành. Các thông số công nghệ thích hợp trong việc ứng dụng chế phẩm *L. fermentum* DC4t2 để lên men bã đậu nành là: Mật độ gieo cấy ban đầu 10^6 CFU/g, thời gian ủ là 22 giờ, nhiệt độ 43°C . Kết quả nghiên cứu thủy phân bã đậu nành bởi *B. amyloliquefacien* N1 cho phép xác định được các thông số thích hợp là: mật độ gieo cấy ban đầu: 10^7 CFU/g và quá trình ủ được chia làm hai giai đoạn. Giai đoạn ủ ở 37°C để vi khuẩn phát triển sinh khối và sinh tổng hợp enzyme ngoại bào với thời gian ủ thích hợp là 24 giờ. Giai đoạn ủ để tạo điều kiện cho enzyme hoạt động thủy phân trong 4 giờ với nhiệt độ thích hợp là 45°C .

Từ khóa: amylase, bã đậu nành, *B. amyloliquefaciens*, *L. fermentum*, lên men, protease

Nhận bài: 23/05/2017

Hoàn thành phản biện: 13/06/2017

Chấp nhận bài: 16/06/2017

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bã đậu nành (BĐN) là phế phụ phẩm của quá trình chế biến đậu nành (*Glycine max*). Khi sử dụng 1 kg hạt đậu nành khô để sản xuất sữa đậu nành, người ta thu được 1,1 kg đến 1,2 kg BĐN ướt (Khare và cs., 1995). Lượng này được thải ra từ các nhà máy sản xuất đậu phụ ở Nhật Bản, Hàn Quốc và Trung Quốc lần lượt là 800.000 tấn, 310.000 tấn và 2.800.000 tấn (Li và cs., 2011). Ở nước ta, theo Tổng cục thống kê Việt Nam và Bộ Nông nghiệp-Phát triển Nông thôn, năm 2014, sản lượng hạt đậu nành dự kiến là 176,4 nghìn tấn. Cùng với sản lượng đậu nành không ngừng tăng lên, lượng BĐN thu được trong sản xuất sữa đậu nành dự báo cũng sẽ tăng theo. Tính theo khối lượng chất khô, hàm lượng protein có trong BĐN dao động từ 15,2% đến 33,4%, hàm lượng chất xơ ăn được là 42,4 – 58,1%. Các hợp chất này có thể được thủy phân tạo nên các hợp chất đơn giản như amino acid, đường khử bởi các enzyme đặc hiệu làm tăng giá trị tiêu hóa của BĐN, đồng thời là môi trường tốt cho vi sinh vật sử dụng để lên men. Nhờ vào quá trình chuyển hóa của vi sinh vật mà protein cao phân tử trong BĐN có thể được thủy phân thành các phân tử nhỏ hơn làm tăng khả năng hòa tan đồng thời làm tăng hoạt tính sinh học của các peptide và amino acid. Trong quá trình lên men, vi sinh vật có thể chuyển hóa các acid béo và các dẫn xuất của chúng tạo nên các hợp chất thơm.

Các loài *Bacillus* được công bố là có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme ngoại bào như protease, amylase cellulase, lipase... nên ngày càng trở thành những vi sinh vật quan trọng hàng đầu về mặt ứng dụng. Nhiều chủng *Bacillus* sp. được công bố cho thấy khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào như *Bacillus acidicola* (Sharma và cs., 2011), *Bacillus* sp. ANT-6 (Burhan và cs., 2003), *Bacillus* sp. PN5 (Saxena, 2007). Suganthi và cs. (2013) đã tuyển chọn và tối ưu hóa điều kiện sinh tổng hợp protease ngoại bào của *Bacillus licheniformis* TD4. Một số tính chất của chế phẩm protease ngoại bào sinh tổng hợp bởi chủng *Bacillus firmus* CAS khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung bột vỏ tôm, cua đã được công bố (Annamalai và cs., 2014). Enzyme protease ngoại bào của *Bacillus alveayuensis* GAS 5 được thu nhận sau 60 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 55°C trong môi trường có bổ sung 1% bột vỏ tôm (Annamalai và cs., 2013). Bên cạnh đó, các chủng *Bacillus* sp. còn được công bố là có thể tiết cellulase (Mawadza và cs., 2000; Harshvardhan và cs., 2013), lipase (Castro-Ochoa và cs., 2005); (Tamilarasan và cs., 2012); (Sharma và cs., 2002); (Kumar và cs., 2005) ra môi trường.

Lactobacillus fermentum thuộc nhóm vi khuẩn lactic, có khả năng lên men yếm khí tạo ra sản phẩm chính là lactic acid làm giảm pH môi trường xuống dưới 5 nên ức chế sự hoạt động của vi khuẩn gây thối. Lượng lactic acid sinh ra vừa có tác dụng hoàn thiện hương vị đồng thời có tác dụng bảo quản cho sản phẩm. Bên cạnh đó, vi khuẩn lactic có tiềm năng probiotic lớn, có chức năng probiotic có nhiều tác động có lợi cho sức khỏe con người cũng như động vật. Hơn nữa, vi khuẩn lactic trong đường ruột tạo ra một số vitamin như thiamine, nicotin, folic acid, pyridoxin, vitamin B₁₂ ... tạo ra enzyme có lợi như lactase; giải phóng các amino acid tự do, các axit béo mạch ngắn. Vì vậy, việc sử dụng vi khuẩn lactic để lên men bã đậu nành đã được xử lý sẽ vừa kéo dài thời gian bảo quản vừa tăng hiệu quả sử dụng lên rất lớn (Lee và cs., 2009; Parvez1 và cs., 2006).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định một số thông số công nghệ thích hợp để thủy phân BDN bởi *B. amyloliquefaciens* N1 và lên men phế phụ phẩm này bởi *L. fermentum* DC4t2. Giá trị dinh dưỡng của sản phẩm sau khi xử lý được đánh giá thông qua hoạt độ enzyme ngoại bào protease, amylase, hàm lượng amino acid tự do thông qua lượng nitơ formol và hàm lượng đường khử. Kết quả của công trình làm tiền đề cho nghiên cứu kết hợp hai chế phẩm này nhằm nâng cao giá trị sử dụng của BDN sau này.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

BDN, phế phụ phẩm của công ty VINASOY, có hàm lượng protein và chất xơ không tan trong môi trường trung tính tính theo bã ướt lần lượt là 4,8% và 3,37%.

Chế phẩm *L. fermentum* DC4t2 (9,179 lg CFU/ml) và *B. amyloliquefaciens* N1 (8,854 lg CFU/ml) được cung cấp bởi phòng thí nghiệm vi sinh, khoa Cơ khí - Công nghệ, Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Các phương pháp sử dụng để phân tích vi sinh vật và hóa sinh

(1) *Xác định số tế bào sống trong sản phẩm bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch.*

* Xác định số lượng tế bào sống đối với vi khuẩn lactic

Mẫu thí nghiệm có chứa tế bào vi sinh vật được đồng hóa và pha loãng thập phân. 1 ml dịch pha loãng thích hợp được cho vào đĩa petri vô trùng và trộn với môi trường MRS agar 43°C. Sau khi lớp môi trường thứ nhất đông, lớp môi trường MRS agar thứ hai được đổ lên cho đến khi kín bề mặt. Số lượng tế bào sống được xác định bằng cách đếm số khuẩn lạc phát triển trên các đĩa có số lượng nằm trong khoảng 50 – 250 sau khi ủ ở 37°C trong 48 giờ. Tổng số vi khuẩn lactic trong 1ml mẫu thử được tính theo công thức:

$$N = \text{Log} \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1.n_2)d}$$

Trong đó, N : Tổng số vi khuẩn sống có trong 1ml mẫu thử (CFU/ml), $\sum C$: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa đã chọn; V : Thể tích cấy trên mỗi đĩa (ml); n_1 : Số đĩa của đậm độ pha loãng thứ nhất được giữ lại; n_2 : Số đĩa của đậm độ pha loãng thứ hai được giữ lại; d : Hệ số pha loãng của đậm độ pha loãng thứ nhất

* Xác định số lượng tế bào sống đối với vi khuẩn *Bacillus sp.*

Mẫu thí nghiệm có chứa tế bào vi sinh vật được đồng hóa và pha loãng thập phân. 0,1 ml của độ pha loãng thích hợp được dàn đều trên đĩa thạch có chứa môi trường thạch thịt-petone. Số tế bào sống được xác định như đối với vi khuẩn lactic.

(2) *Xác định hoạt độ protease bằng phương pháp Anson cải tiến (Mukherjee và cs., 2008)*

Hỗn hợp phản ứng thủy phân gồm dung dịch enzyme và dung dịch casein 2,0%, tỷ lệ 1:2 (v/v) được ủ ở 30°C, 10 phút; phản ứng được kết thúc bằng cách cho dung dịch axit tricloacetic (TCA) 5,0% theo tỷ lệ 5 thể tích dung dịch axit cho 1 thể tích enzyme vào hỗn hợp phản ứng; dịch nổi thu được sau khi ly tâm được sử dụng để thực hiện phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin 0,2N có mặt Na_2CO_3 6% (tỷ lệ dịch nổi: dung dịch Na_2CO_3 : Folin 0,2N = 1:4:1). Mẫu kiểm tra được thực hiện đồng thời bằng cách cho dung dịch tricloacetic acid (TCA) vào enzyme trước khi ủ với cơ chất. Độ hấp thụ ánh sáng (OD) của dung dịch màu thu được sau phản ứng được đo trên máy quang phổ kế ở bước sóng 750nm. Dựa vào đồ thị chuẩn tyrosine, để tính sản phẩm tạo thành tương ứng dưới tác dụng của enzyme. Một đơn vị hoạt độ protease (HP) được định nghĩa là lượng enzyme mà trong một phút ở 30°C có khả năng phân giải protein tạo thành các sản phẩm hoà tan trong (TCA), cho phản ứng màu tương đương với 1,0 μmol tyrosine.

(3) *Xác định hoạt độ amylase bằng phương pháp Bernfiel (Asgher và cs., 2007)*

Tinh bột được sử dụng làm cơ chất để xác định hoạt độ amylase trên cơ sở định lượng sản phẩm tạo thành bằng phản ứng màu với thuốc thử 3,5 - axit dinitrosalisilic (DNS) (hòa tan 1g DNS trong 20 ml NaOH 2N và 50ml nước cất, cho thêm 30g kali/natri tartrate và dẫn nước đến 100 ml). Độ hấp thụ ánh sáng (OD) được đo trên máy quang phổ ở bước sóng 540

nm. Dựa vào đường chuẩn để tính sản phẩm tạo thành dưới tác dụng của enzyme. Hỗn hợp phản ứng gồm 0,1 ml 1% tinh bột (hòa tan 1g tinh bột và 35mg NaCl trong 60ml dịch đệm phosphate, pH 7, đun sôi cho đến tan, để nguội và dẫn đến 100ml) và 0,1ml dung dịch enzyme. Hỗn hợp phản ứng được ủ 10 phút ở 30°C, sau đó, được bổ sung 0,2 ml dung dịch 1% DNS và ủ 10 phút ở 100°C và ủ 10 phút trong nước đá. Bổ sung 2 ml nước cất vào hỗn hợp và so màu ở 540nm. Mẫu trắng được làm song song với mẫu chuẩn nhưng enzyme bị biến tính 10 phút trong nước sôi và 1% DNS. Lượng đường khử tạo thành được xác định dựa vào đường chuẩn maltose. Một đơn vị hoạt độ α -amylase được xác định là lượng μ mol maltose tạo thành bởi 1 ml dịch enzyme trong thời gian 1 phút ở 30°C.

(4) Xác định hàm lượng nitơ formol bằng phương pháp chuẩn độ

Amino acid hòa tan trong nước có tính chất muối nội phân tử, các nhóm amino và carboxyl trung hòa lẫn nhau. Nhóm $-\text{COO}^-$ của amino acid bị cản trở bởi các nhóm amino nên không thể chuẩn độ trực tiếp được. Trong fomandehyd, các nhóm amino của amino acid phản ứng với nhóm andehyd cho metylen, kết quả của phản ứng là nhóm amino mất tính chất cơ bản của nó, ngược lại nhóm cacboxyl trong amino acid tồn tại dạng tự do và có thể chuẩn độ được. Vì vậy cho phép định lượng được amino acid có trong dung dịch nghiên cứu.

(5) Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp Bertrand

Phương pháp này dựa trên cơ sở trong môi trường kiềm, đường khử có thể dễ dàng kết hợp với $\text{Cu}(\text{OH})_2$ thành CuO . Hàm lượng đường khử được xác định thông qua lượng CuO .

2.2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm để nghiên cứu nội dung của đề tài

Theo một số kết quả nghiên cứu của chúng tôi (Võ Văn Quốc Bảo và Đỗ Thị Bích Thủy, 2012) về thời gian phát triển sinh khối của tế bào *Bacillus* sp. và nhiệt độ thủy phân bởi các chế phẩm enzyme của các chủng này thì thời gian 16 giờ là thời gian tối ưu để *Bacillus* sp. phát triển tế bào, 24 giờ là thời gian tốt nhất để *Bacillus* sp. sinh enzyme ngoại bào, 50°C là nhiệt độ thích hợp để các enzyme thủy phân bã đậu nành. Chúng tôi kế thừa những kết quả trên để tiến hành bố trí các thí nghiệm trong nghiên cứu. Trong quá trình nghiên cứu xử lý này, mật độ gieo cấy ban đầu, thời gian ủ được thay đổi. Hoạt độ amylase, protease, hàm lượng nitơ formol, đường khử và giá trị pH được xác định sau khi lên men giữa các mẫu thí nghiệm được so sánh để chọn các thông số công nghệ thích hợp.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý ANOVA bởi phần mềm SPSS 16.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu xác định các thông số công nghệ để thủy phân bã đậu nành bởi *B. amyloliquefaciens* N₁

Với mục đích lợi dụng hệ enzyme ngoại bào của *B. amyloliquefaciens* N₁ để thủy phân protein và các hợp chất carbohydrate (rafinose, stachyose) khó tiêu hóa trong BDN thành các hợp chất đơn giản, dễ tiêu hóa. Đồng thời, hoạt độ enzyme có được trong bã đậu

nành đã xử lý sẽ làm tăng giá trị tiêu hóa của thức ăn gia súc. Vì vậy, việc xử lý làm nâng cao giá trị sử dụng của BDN bởi chế phẩm *B. amyloliquefaciens* N₁ sẽ hướng đến khả năng sinh tổng hợp amylase và protease ngoại bào cao.

3.1.1. Ảnh hưởng của mật độ gieo cấy ban đầu *B.amyloliquefaciens* N1 lên hoạt độ enzyme và khả năng thủy phân BDN.

BDN được gieo cấy với mật độ tế bào ban đầu thay đổi ở các mức 10⁵ CFU/g BDN, 10⁶ CFU/g BDN, 10⁷ CFU/g BDN và 10⁸ CFU/g BDN. Sau khi ủ ở 37°C trong 24 giờ, hỗn hợp này được xác định hoạt độ protease và amylase (Bảng 1).

Khi gieo cấy chủng *B. amyloliquefaciens* N1 vào BDN với mật độ ban đầu là 10⁷ CFU/g BDN, hoạt độ protease và amylase đạt được sau khi ủ 24 giờ ở 37°C có giá trị cao hơn (1,294 HP/g BDN và 37,7 UI/g BDN) so với các mật độ 10⁵ CFU/g (0,681 HP/g BDN và 20,653 U/g BDN) và 10⁶ CFU/g BDN (1,247 HP/g BDN và 29,815 UI/g BDN) và không sai khác so với mật độ 10⁸ CFU/g BDN (1,289 HP/g BDN và 36,163 U/g BDN) ($p < 0,05$) (Kết quả ở Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của mật độ tế bào ban đầu của *B. amyloliquefaciens* N1 lên hoạt độ enzyme trong BDN

Chi tiêu	Mật độ tế bào ban đầu (CFU/g BDN)				ĐC
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
Hoạt độ amylase (UI/g BDN)	20,653 ^c	29,815 ^b	37,70 ^a	36,163 ^a	-
Hoạt độ protease (HP/g BDN)	0,681 ^c	1,247 ^b	1,294 ^a	1,289 ^a	-

Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có nghĩa khi xử lý Duncan trong cùng một hàng ($p < 0,05$)

Từ kết quả trên cho thấy, mật độ gieo cấy ban đầu của chủng *B. amyloliquefacien* N1 thích hợp để xử lý BDN là 10⁷CFU/g. Thông số về mật độ gieo cấy ban đầu này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh enzyme ngoại bào trong bã đậu nành

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy *B. amyloliquefacien* N1 lên hoạt độ enzyme ngoại bào trong BDN

Mẫu khảo sát	Hoạt độ enzyme	Amylase (UI/g)	Protease (HP/g)
16 giờ		19,011 ^c	1,368 ^b
20 giờ		28,123 ^b	1,260 ^c
24 giờ		38,241^a	1,488^a
Đối chứng		0 ^d	0 ^d

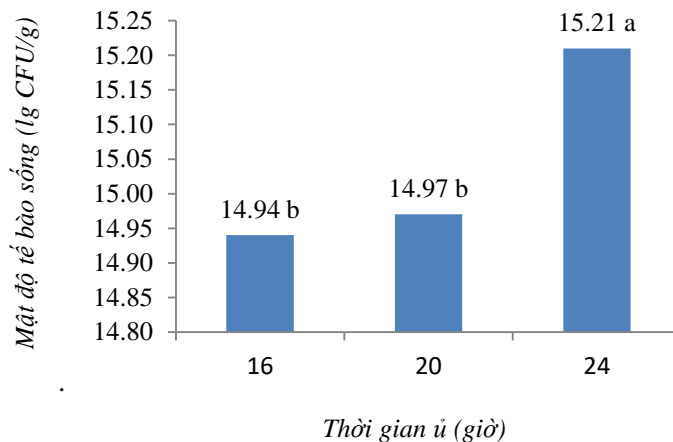
Kết quả xử lý sai khác theo cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê, Duncan 'test ($P < 0,05$)

Từ các kết quả đã công bố, thời gian nuôi cấy *B. amyloliquefacien* N1 thích hợp để thu nhận enzyme ngoại bào cao là 24 giờ và lân cận dưới 24 giờ hoạt độ enzyme sinh ra cũng rất cao. Các nghiên cứu cũng chỉ ra sau 24 giờ, hoạt độ enzyme sinh ra ở các môi trường nghiên cứu giảm xuống (Võ Văn Quốc Bảo và Đỗ Thị Bích Thủy, 2010; Phạm Trần Thùy Hương và Đỗ Thị Bích Thủy, 2012). Do đó, để tiến hành nghiên cứu khả năng sinh enzyme

trong BĐN của *B. amyloliquefacien* N1, chúng tôi nuôi cấy chủng vi khuẩn này theo 3 mốc thời gian là: 16 giờ, 20 giờ và 24 giờ. Hoạt độ amylase và protease trong BĐN qua các thời gian nuôi cấy chủng *B. amyloliquefacien* N1 được trình bày ở Bảng 2. Kết quả xác định hoạt độ enzyme sinh ra trong môi trường BĐN của chủng *B. amyloliquefacien* N1 đạt được cao nhất là ở 24 giờ. Hoạt độ amylase ngoại bào sinh ra ở 24 giờ của chủng *B. amyloliquefacien* N1 (38,241UI/g BĐN) cao gấp 2,012 lần hoạt độ amylase ở 16 giờ (19,011 UI/g BĐN) và gấp 1,360 lần so với hoạt độ amylase ở 20 giờ (28,123 UI/g BĐN). Hoạt độ protease ở 24 giờ (1,488 HP/g BĐN) cao gấp 1,088 lần ở 16 giờ (1,368 HP/g BĐN) và cao gấp 1,181 lần ở 20 giờ (1,260 HP/g BĐN). Với kết quả thu được như trên, chúng tôi chọn thời gian nuôi cấy xử lý BĐN là 24 giờ đối với chủng *B. amyloliquefacien* N1.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian ủ lên mật độ tế bào sống trong BĐN

BĐN được gieo cấy *B. amyloliquefaciens* N1 ở các mật độ thích hợp (10^7 CFU/gam) (Kết quả 3.1.1). Sau các thời gian (16 giờ, 20 giờ và 24 giờ) nuôi cấy ở 37°C, mật độ tế bào sống trong bã đậu nành được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (phương pháp Koch).



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian ủ lên mật độ tế bào sống của *B. amyloliquefaciens* N1 trong BĐN.

Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê, Duncan's test ($P < 0,05$)

Kết quả cho thấy *B. amyloliquefaciens* N1 phát triển tốt trong môi trường bã đậu nành. Mật độ tế bào sống lớn hơn 14 lg CFU/g (Hình 1). Mật độ của *B. amyloliquefaciens* N1 đạt cao nhất sau 24 giờ nuôi cấy (15,21 lg CFU/g).

Từ các kết quả về hoạt độ enzyme ngoại bào và mật độ tế bào sống theo thời gian (Bảng 1, Bảng 2 và Hình 1) cho thấy có sự tương đồng về thời gian giữa các chỉ tiêu này. Mật độ tế bào sống cũng như hoạt độ enzyme ngoại bào cao nhất ở 24 giờ.

Như vậy, qua các kết quả nghiên cứu xử lý bã đậu nành bởi chế phẩm *B. amyloliquefaciens* N1, chúng tôi đã xác định được thời gian nuôi cấy mà chủng vi khuẩn này có khả năng sinh enzyme ngoại bào và mật độ tế bào sống cao là 24 giờ.

Sau khi xử lý bã đậu nành bằng cách nuôi cấy với mật độ tế bào ban đầu và thời gian thích hợp để tích lũy enzyme ngoại bào cao, chúng tôi tiếp tục khảo sát để xác định nhiệt độ thủy phân.

3.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ ủ lên khả năng thủy phân BĐN bởi chế phẩm vi sinh *B. amyloliquefacien* N1

B. amyloliquefacien N1 cũng có khả năng sinh enzyme (amylase, protease) ngoại bào cao khi ủ trong BĐN. Trong thí nghiệm này chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ ủ lên khả năng thủy phân của enzyme ngoại bào của *B. amyloliquefaciens* N1. Các giá trị về hoạt độ enzyme và hàm lượng các chất được giải phóng sau khi thủy phân, nitơ formol và đường khử, của các mẫu thí nghiệm được xác định (Bảng 3).

Bảng 3. Hoạt độ enzyme và hàm lượng nitơ formol và đường khử trong bã đậu nành khi ủ với *B. amyloliquefaciens* N1 ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ (°C)	Hoạt độ amylase (UI/g)	Hoạt độ protease (HP/g)	Hàm lượng đường khử (mg/g)	Hàm lượng ni tơ formol (mg/g)
40	36,081 ^b	1,409 ^b	8,366 ^b	1,021 ^{bb}
45	38,606^a	1,448^a	8,576^a	1,073^a
50	34,333 ^c	1,328 ^c	8,338 ^b	0,881 ^c

Kết quả xử lý sai khác theo cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê, Duncan 'test ($P < 0,05$)

Khi ủ BĐN với *B. amyloliquefaciens* N1, các giá trị về hoạt độ enzyme cũng như sản phẩm thủy phân sau khi ủ giảm ở nhiệt độ lớn hơn 45°C (Bảng 3). Hoạt độ amylase và protease trong các mẫu thí nghiệm ủ ở 45°C (38,606 UI/g BĐN và 1,448 HP/g BĐN) cao hơn so với mẫu ủ ở 40°C (36,081 UI/g BĐN và 1,409 HP/g BĐN). Trong khi đó, các giá trị này có được khi ủ ở 50°C là thấp nhất (34,333 UI/g BĐN và 1,328 HP/g BĐN). Hàm lượng nitơ formol và đường khử có giá trị tương ứng với hoạt độ của enzyme. Đối với các mẫu được ủ ở 40°C và 45°C, hàm lượng nitơ formol (1,021 mg/g BĐN và 1,073 mg/g BĐN) đều cao hơn so với trường hợp 50°C (0,881 mg/g BĐN). Hàm lượng đường khử được xác định khi ủ ở 45°C là cao nhất (8,576 mg/g BĐN). Giá trị này đối với trường hợp 40°C và 50°C có thấp hơn (8,366 mg/g BĐN và 8,338 mg/g BĐN). Kết quả này phù hợp với công bố của chúng tôi trước đây, đó là có sự giảm nhanh hoạt độ enzyme khi nuôi cấy thu nhận enzyme từ chủng *B. amyloliquefacien* N1 từ 50°C đến 60°C (Đỗ Thị Bích Thủy, 2012).

Từ kết quả đó, chúng tôi chọn nhiệt độ ủ xử lý bã đậu nành bởi chế phẩm *B. amyloliquefacien* N1 là 45°C trong quy trình xử lý BĐN.

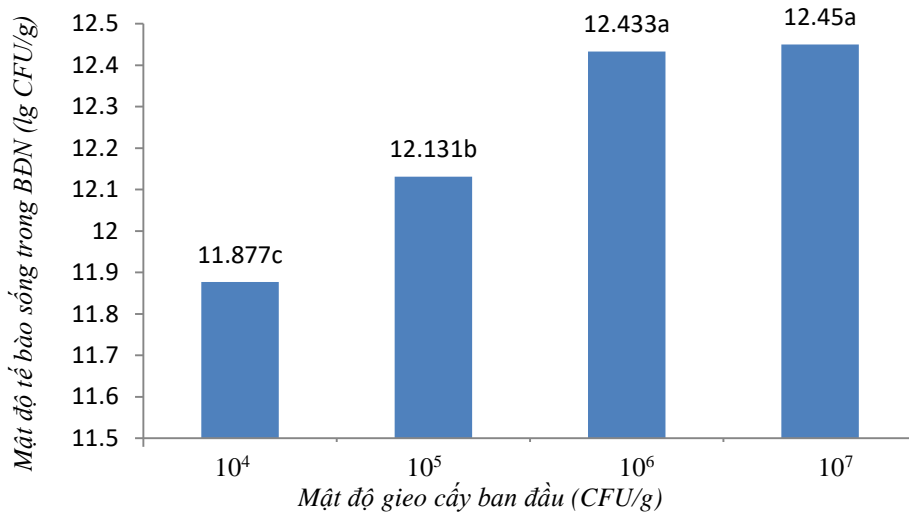
3.2. Kết quả nghiên cứu xác định một số thông số thích hợp trong lên men BĐN bởi *L. fermentum* DC4_{t2}.

Sự tồn tại tế bào sống của vi khuẩn lactic trong sản phẩm BĐN sau khi xử lý sẽ có tác dụng là probiotic tốt cho sức khỏe vật nuôi. Vì vậy, trong thí nghiệm này, chúng tôi tập trung nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố (mật độ gieo cấy ban đầu và thời gian nuôi cấy) lên số lượng tế bào sống của *L. fermentum* DC4_{t2} và *L. plantarum* N5 trong BĐN sau khi đã được xử lý.

3.2.1. Ảnh hưởng của mật độ gieo cấy ban đầu lên sự phát triển số lượng tế bào sống của *L. fermentum* DC4_{t2} trong BĐN.

BĐN được gieo cấy các chủng *L. fermentum* DC4_{t2} với mật độ tế bào ban đầu thay đổi ở các mức 10^4 CFU/g BĐN, 10^5 CFU/g BĐN, 10^6 CFU/g BĐN, 10^7 CFU/g BĐN và ủ ở 43°C. Mật độ tế bào sống trong bã sau khi ủ 24 giờ được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (Hình 2).

Kết quả cho thấy rằng, với mật độ gieo cấy ban đầu 10^6 CFU/g và 10^7 CFU/g, sau 24 giờ ủ, lượng tế bào tăng đáng kể (12,433 lg CFU/g và 12,450 lg CFU/g đối với chủng *L. fermentum* DC4_{t2} (Hình 2); và không có sai khác thống kê ($p < 0,05$). Như vậy, qua kết quả khảo sát, mật độ tế bào gieo cấy ban đầu thích hợp nhất là 10^6 CFU/g. Kết quả này được chọn để bố trí thí nghiệm tiếp theo.

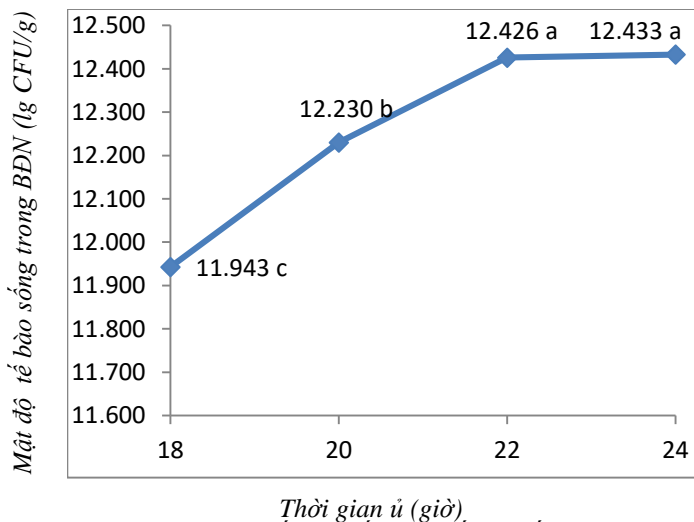


Hình 2. Ảnh hưởng của mật độ gieo cấy ban đầu lên số lượng tế bào sống trong BDN sau khi ủ với *L. fermentum* DC_{4t2}.

Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác về ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.2.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự phát triển số lượng tế bào sống của *L. fermentum* DC_{4t2} trong BDN

BDN được ủ với *L. fermentum* DC_{4t2} có mật độ gieo cấy ban đầu đã chọn là 6 lg CFU/g BDN (Kết quả 3.2.1) ở 43°C trong các thời gian khác nhau (18 giờ, 20 giờ, 22 giờ và 24 giờ). Số lượng tế bào sống được xác định ở các mẫu BDN ủ trong thời gian khác nhau bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch (Hình 3).



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên số lượng tế bào sống của *L. fermentum* DC_{4t2} trong bã đậu nành sau khi ủ.

Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác về ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Kết quả cho thấy rằng mật độ tế bào sống tăng dần theo thời gian. Mật độ tế bào ở hai mốc thời gian ủ 22 giờ và 24 giờ đạt được là 12,426 lg CFU/g BDN và 12,433 lg CFU/g

BĐN (*L. fermentum* DC4t₂) (Hình 3). Thí nghiệm với 2 mức thời gian ủ 22 giờ và 24 giờ cho thấy sự tăng mật độ tế bào sống trong bã đậu nành không có sự sai khác ($p < 0,05$). Chính vì vậy, 22 giờ ủ là mốc thời gian thích hợp nhất được chọn để xử lý BĐN bởi các chủng *L. fermentum* DC4t₂ sau này.

4. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đã xác định được một số thông số công nghệ để thủy phân và lên men BĐN bởi *B. amyloliquefaciens* N1 và *L. fermentum* DC4t₂ như sau:

- Đối với chủng *L. fermentum* DC4t₂: Mật độ gieo cấy ban đầu 10^6 CFU/g BĐN, Thời gian ủ 22 giờ BĐN; Nhiệt độ 43°C.

- Đối với chủng *B. amyloliquefacien* N1: Mật độ gieo cấy ban đầu: 10^7 CFU/g BĐN và quá trình ủ được chia làm hai giai đoạn. Giai đoạn ủ ở 37°C để vi khuẩn phát triển sinh khối và sinh tổng hợp enzyme ngoại bào với thời gian ủ thích hợp là 24 giờ. Giai đoạn ủ để tạo điều kiện cho enzyme hoạt động thủy phân trong 4 giờ với nhiệt độ thích hợp là 45°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

Võ Văn Quốc Bảo, Đỗ Thị Bích Thủy, (2010). Tuyển chọn và tối ưu một số điều kiện nuôi cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* N1 sinh tổng hợp amylase. *Tạp chí công nghệ sinh học*, 8(3B), 1617-1624.

Phạm Trần Thùy Hương, Đỗ Thị Bích Thủy, (2012). Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình thu nhận chế phẩm amylase ngoại bào cao từ *Bacillus subtilis* DC5. *Tạp chí khoa học, Đại học Huế*, 71(2), 187-199.

Đỗ Thị Bích Thủy, (2012). Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự thu nhận chế phẩm protease ngoại bào của *Bacillus amyloliquefacien* N1. *Tạp chí khoa học Đại học Huế*, 71(2), 277-288.

Tài liệu tiếng nước ngoài

Annamalai, N., Rajeswari M. V., Balasubramanian, T., (2014). Enzyme saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* GAS 3 utilizing linocellulosic wastes through statistical optimization. *Biomass and Bioenergy*, 68, 151-160.

Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Balasubramanian, T., (2013). Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food and Bioproducts Processing*, In Press, Corrected Proof, Available online 29 August 2013.

Asgher, M., Javaid Asad, M., Rahman S.U., Legge, R. L., (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Engineering*, 79, 950-955.

Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G., (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38(10), 1397-1403.

Castro-Ochoa, L. D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., Ros, R. O., (2005). Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(6), 648-654.

Harshvardhan, K., Mishra, A., Jha, B., (2013). Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 93, 51-56.

Khare, S. K., Jha, K., & Gandhi, A. P., (1995). Citric acid production from okara (soy residue) by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 54, 323- 325

- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, As., Kanwar, S. S., Gupta, R., (2005). Production, purification and characterization of lipase from thermophilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 38-44.
- Lee, Y.K., Salminen, S., (2009). *Handbook of probiotics and prebiotics*, 2nd edition, John Wiley & Sons Inc, Canada.
- Li, B., Qiao, M., & Lu, F., (2011). Composition, nutrition and utilisation of okara (soybean residue). *Food Reviews International*, 28, 231-252.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., Mattiasson, B., (2000). Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*, 83(3), 177-187.
- Mukkhejee, A. K., Adhikari, H., (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, 39(2), 353-361.
- Parvez1, S., Malik2, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y., (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1171–1185.
- Saxena, R. K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P., (2007). A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technol*, 98(2), 260-265.
- Sharma, A., Satyanarayana , T., (2011). Optimization of medium components and cultural variables for enhanced production of acidic high maltose-forming and Ca²⁺-independent α -amylase by *Bacillus acidicola*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(5), 550-553.
- Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., Anbalagan, M., Sivakumar, A., Gothandam, K.M., (2013). Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(1), 47-52.
- Tamilarasan, K., Kumar, M. D., (2012). Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* MTCC 7542. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(4), 309-313.

STUDY ON DETERMINATION OF SOME TECHNOLOGICAL PARAMETERS FOR HYDROLYSIS AND FERMENTATION OF OKARA BY *Bacillus amyloliquefaciens* N1 AND *Lactobacillus fermentum* DC4t2 PREPARATIONS

Do Thi Bich Thuy, Le Thi Kim Anh

Faculty of Engineering and Food Technology,
University of Agriculture and Forestry, Hue University.

Contact email: dothibichthuy@huaf.edu.vn

ABSTRACT

In this study, the optimal technological parameters for hydrolysis of okara by *B. amyloliquefaciens* N1 preparation and fermentation by-product by *L. fermentum* DC4t2 preparation were determined. The results of this work will be used for next research of treatment that enhancing the used value of okara by the combination of these preparations. The result shows that the okara added by *L. fermentum* DC4t2 with 10^6 CFU/g and incubated 43°C for 22 hours gives the highest survival cells in okara. For *B. amyloliquefaciens* N1, the treatment has two phases: okara is firstly added 10^7 CFU/g of initial density, incubated at 37°C for 24 hours with the aim of production of extracellular enzymes and growth of this strain; this mixture is then incubated at 45°C for 4 hours for hydrolysis activities of enzymes.

Key words: amylase, *B. amyloliquefaciens*, fermentation, *L. fermentum*, okara, protease

Received: May 23, 2017

Reviewed: June 13, 2017

Accepted: June 16, 2017

