



ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ THÔNG SỐ CÔNG NGHỆ LÊN QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM PROBIOTIC GIÀU CAROTEN-PROTEIN TỪ PHẾ LIỆU TÔM SỬ DỤNG HỖN HỢP *Bacillus subtilis* C10 và *Lactobacillus fermentum* TC10

Đỗ Thị Bích Thủy*, Lê Thị Thanh

Khoa Cơ khí – Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

Tóm tắt. Trong công trình này, chúng tôi đã nghiên cứu xác định một số thông số công nghệ thích hợp để thủy phân và lên men phế liệu tôm (PLT) trong quy trình sản xuất chế phẩm probiotic giàu carotenprotein từ PLT bằng chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10. Kết quả của công trình làm tiền đề cho nghiên cứu xử lý PLT kết hợp hai chế phẩm vi sinh nhằm tạo ra chế phẩm probiotic giàu caroten-protein. Các thông số công nghệ thích hợp để xử lý PLT trong quy trình sản xuất chế phẩm probiotic giàu carotenprotein từ PLT là tỷ lệ phối trộn của chủng *B. Subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 vào PLT là (1:2). Nhiệt độ và thời gian lên men của hỗn hợp PLT tương ứng là 35 °C và 24 giờ.

Từ khóa: *B. subtilis*, *L. fermentum*, lên men, phế liệu tôm, probiotic

1 Đặt vấn đề

Việt Nam là một nước nông nghiệp có ngành chăn nuôi phát triển và có đóng góp rất lớn vào sự phát triển kinh tế của đất nước. Vì vậy, vấn đề nâng cao năng suất, chất lượng sản phẩm và cải thiện môi trường chăn nuôi rất được quan tâm ở Việt Nam hiện nay. Việc lạm dụng kháng sinh của người chăn nuôi đang trở thành vấn đề nan giải. Hệ quả là lượng tồn dư kháng sinh có trong thực phẩm không chỉ ảnh hưởng đến vật nuôi mà còn nguy hại đến sức khỏe con người khi tiêu thụ thực phẩm.

Để hạn chế và tiến tới loại bỏ kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi, sử dụng probiotic là một trong những giải pháp thay thế kháng sinh quan trọng. Probiotic là những vi khuẩn có ích hoặc nấm men khi đưa vào cơ thể một liều lượng vừa đủ sẽ sản sinh ra các enzym tiêu hóa, các vitamin và các chất có hoạt tính kháng khuẩn, tạo ra những tác động tích cực đối với quá trình tiêu hóa, giúp hấp thu dưỡng chất tốt hơn [13].

Các loài *Bacillus* và *Lactobacillus* được xem là một trong những đối tượng giàu tiềm năng để sản xuất probiotic. Do *Bacillus* không chỉ có khả năng sinh bào tử để chống chịu với điều kiện môi trường bất lợi [18, 24], mà còn có thể sinh chất kháng sinh, chất kháng khuẩn kìm hãm

*Liên hệ: dothibichthuy@huaf.edu.vn

vi sinh vật (VSV) gây bệnh [24]. *B. subtilis* sinh ra rất nhiều loại enzyme, đặc biệt là α amylase và protease kiềm có giá trị cao; ngoài ra *B. subtilis* có khả năng sinh ra riboflavin (tiền vitamin B2) [1]. *Lactobacillus* được biết đến là nhóm vi khuẩn có chức năng probiotic có nhiều tác động có lợi cho sức khỏe con người cũng như động vật. Khả năng sinh tổng hợp bacterioxin của vi khuẩn lactic làm cho chúng ức chế các vi khuẩn gây bệnh đường ruột [8]. *L. fermentum* là vi khuẩn có khả năng chống chịu trong dịch dạ dày, dịch ruột non, kháng các vi sinh vật gây bệnh, tăng cường hệ miễn dịch, tăng khả năng kháng oxy hóa [14-16].

Trong công nghệ chế biến thủy sản xuất khẩu của Việt Nam, công nghệ chế biến tôm tạo ra một lượng lớn phế thải rắn bao gồm đầu tôm và vỏ tôm, thường chiếm 50–70% nguyên liệu ban đầu. Phế liệu tôm (PLT) là nguồn cung cấp protein, chitin và carotenoids [17]. Trong đó, carotenoid được biết là một chất màu tự nhiên an toàn cho các ngành công nghệ thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Gần đây, nhiều phương pháp đã được sử dụng để tách chiết và thu nhận các chế phẩm đậm giàu carotenoid. Chúng có thành phần chính là protein và carotenoid ở dạng phức hợp caroten-protein và có nhiều trong phế liệu giáp xác (tôm hùm, tôm sú, tôm chì, tôm thẻ chân trắng) và một số phế liệu hải sản khác. Việc tách chiết chúng không chỉ thu nhận được các sản phẩm có giá trị gia tăng mà còn giảm thiểu ô nhiễm môi trường [4,12]. Vì vậy, nghiên cứu thủy phân và lên men PLT bằng phương pháp vi sinh vừa thu hồi được hàm lượng caroten-protein vừa tách được lượng chitin đáng kể [5].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định một số thông số công nghệ thích hợp để thủy phân PLT bằng *B. subtilis* C10 và lên men phế liệu này bằng *L. fermentum* TC10. Giá trị dinh dưỡng của của sản phẩm sau khi xử lý được đánh giá thông qua mật độ tế bào sống, khả năng kháng oxy hóa, hoạt độ enzyme ngoại bào protease và hàm lượng amino acid tự do thông qua hàm lượng nitro formol. 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 PLT.

2 Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu

Phế liệu tôm được cung cấp bởi Công ty Cổ Phần Chăn Nuôi C.P. Việt Nam – Chi Nhánh Đông Lạnh Thừa Thiên Huế. Yêu cầu phế liệu phải tươi, không có mùi lạ, không bị biến đổi, không lẫn tạp chất. Phế liệu sau khi lấy cho ngay vào thùng xốp cách nhiệt chứa nước đá và vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm. Phế liệu trước khi sử dụng được rửa sạch, để ráo trong thời gian 5 phút. Trong trường hợp chưa làm ngay thì rửa sạch, đóng gói và bảo quản đông ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm vi sinh, Khoa Cơ khí – Công nghệ, Trường đại học Nông Lâm Huế, Đại học Huế.

2.2 Phương pháp

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 chứa tế bào VSV 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 ở 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 1 mL mẫu thử được tính theo công thức (Phương pháp Koch):

$$N = \log \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

trong đó N là tổng số vi khuẩn sống có trong 1 mL mẫu thử (CFU/ mL); $\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa đã chọn; V là thể tích cấy trên mỗi đĩa (mL); n_1 là số đĩa của đậm độ pha loãng thứ nhất được giữ lại; n_2 là số đĩa của đậm độ pha loãng thứ hai được giữ lại; d là hệ số pha loãng của đậm độ pha loãng thứ nhất

* *Xác định số lượng tế bào sống đối với vi khuẩn *B. subtilis*:*

Mẫu thí nghiệm chứa tế bào VSV được đồng hóa và pha loãng thập phân. 0,1 mL của độ pha loãng thích hợp được dàn đều trên đĩa thạch 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 Ason cải tiến*

Hỗn hợp phản ứng thủy phân gồm dung dịch enzyme và dung dịch casein 2,0%, tỷ lệ 1:2 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 0,2 N = 1:4:1). Mẫu đối chứng 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 750 nm. 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 300 °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 [21].

(3) *Xác định hàm lượng protein tổng số bằng phương pháp Kjeldahl*

Protein trong mẫu sau khi được vô cơ hóa bởi H_2SO_4 đậm đặc với chất xúc tác là hỗn hợp K_2SO_4 : $CuSO_4$ (10:1) tạo thành NH_3 . NH_3 tiếp tục tác dụng với H_2SO_4 tạo thành $(NH_4)_2SO_4$. Dùng kiềm mạnh $NaOH$ đẩy NH_3 từ $(NH_4)_2SO_4$. NH_3 được hấp thụ bởi H_3PO_3 tạo thành $(NH_4)_2B_4O_7$ (amoni tetraborat). Định lượng muối amoni tetraborat tạo thành bằng dung dịch H_2SO_4 0,1N cho đến khi xuất hiện màu hồng nhạt với chất chỉ thị tasiro [10].

(4) *Xác định hàm lượng nito 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 $-COO$ 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. Điều này cho phép định lượng được amino acid có trong dung dịch nghiên cứu [3].

(5) *Xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH*

Về nguyên tắc, các chất kháng oxy hóa sẽ trung hòa gốc DPPH bằng cách cho hydro làm giảm độ hấp thụ ở bước sóng cực đại và màu của dung dịch phản ứng nhạt dần, chuyển từ màu tím sang màu vàng nhạt. Giá trị mật độ quang OD càng thấp chứng tỏ khả năng bắt gốc tự do DPPH càng cao.

Quy trình thực hiện: Lấy khoảng 20 μ L đến 40 μ L dịch chiết trộn với nước cất để đạt thể tích là 30 mL. Sau đó thêm vào 1 mL dung dịch DPPH 0,2 nM, lắc đều và để yên trong bóng tối 30 phút. Đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 517 nm [11].

Bố trí thí nghiệm để nghiên cứu nội dung của đề tài

Thí nghiệm 1 (TN1): Chuẩn bị môi trường: cân 100g PLT (đã xay nhỏ tới kích thước 0,3–0,5 cm) và 5,2 g bột sắn khô [6]. Môi trường được hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121 °C trong 20 phút và để nguội trước khi bổ sung 6% sinh khối *B. subtilis* C10 : *L. fermentum* TC10 theo các tỷ lệ (1:1, 1:2, 2:1) với mật độ sinh khối ban đầu là 10^6 CFU/mL. Tiến hành lên men hỗn hợp PLT trong tủ ấm ở nhiệt độ 35 °C trong 48 giờ. Sau 48 giờ lên men, hỗn hợp PLT được lọc thu phần dịch lỏng caroten-protein và loại bỏ bã phần chitin. Phần dịch lỏng caroten-protein được dùng để xác định các chỉ tiêu (mật độ tế bào sống, khả năng kháng oxy hóa, hoạt độ protease, hàm lượng protein và nito formol). Sau khi xác định được các chỉ tiêu có chất lượng tốt nhất sẽ chọn được tỷ lệ thích hợp để nghiên cứu nội dung tiếp theo.

Thí nghiệm 2 (TN2): Sau khi xác định được tỷ lệ VSV thích hợp để bổ sung vào PLT, tiến hành khảo sát nhiệt độ lên men PLT. Chuẩn bị môi trường như trên; sau khi hấp và để nguội, VSV được bổ sung theo tỷ lệ thích hợp đã được khảo sát ở TN1. Tiến hành lên men PLT với các mức nhiệt độ (30 °C, 35 °C, 40 °C) trong 48 giờ. Sau thời gian lên men, hỗn hợp PLT được lọc và thu phần dịch lỏng caroten-protein và tiến hành phân tích các chỉ tiêu mật độ tế bào sống, khả năng kháng oxy hóa, hoạt độ protease, hàm lượng protein và nito formol để xác định nhiệt độ thích hợp lên men PLT.

Thí nghiệm 3 (TN3): Sau khi xác định được nhiệt độ thích hợp để lên men PLT, tiến hành khảo sát thời gian lên men PLT. Chuẩn bị môi trường như trên; sau khi hấp và để nguội, VSV được bổ sung theo tỷ lệ thích hợp đã khảo sát ở TN1 và lên men ở nhiệt độ thích hợp đã khảo sát ở TN2 với các mức thời gian (24 giờ, 48 giờ, 72 giờ). Sau thời gian lên men, hỗn hợp PLT được lọc và thu phần dịch lỏng caroten-protein. Phần dịch lỏng caroten-protein được dùng để xác định các chỉ tiêu (mật độ tế bào sống, khả năng kháng oxy hóa, hoạt độ protease, hàm lượng protein và nito formol). Sau khi xác định được các chỉ tiêu sẽ chọn được thời gian lên men thích hợp để dịch caroten-protein có chất lượng tốt nhất.

Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý (ANOVA) bằng phần mềm Minitab 17.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 vào PLT đến chất lượng của chế phẩm probiotic giàu caroten-protein

Lợi dụng hệ enzyme ngoại bào đa dạng của vi khuẩn *B. subtilis* TC10 để thủy phân PLT giúp chuyển hóa các chất khó tiêu (protein) thành chất dễ tiêu (axit amin). Bên cạnh đó, *B. subtilis* và *L. fermentum* mang lại nhiều lợi ích cho vật chủ bởi vì chúng có khả năng chống lại các vi khuẩn gây bệnh [20], đồng thời, các chủng này còn làm tăng khả năng miễn dịch, khả năng kháng khuẩn và giúp vật nuôi tăng trưởng nhanh [25].

Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 vào PLT đến hoạt độ enzyme protease, khả năng kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol

Môi trường ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh protease của vi khuẩn, dịch thủy phân PLT chứa nhiều đạm (0,9%) [9], do vậy có thể sử dụng PLT làm môi trường để vi khuẩn lên men. PLT được lên men bằng hai chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 với các tỷ lệ phối trộn là (1:1), (1:2), (2:1). Sau khi lên men ở 35 °C trong 48 giờ, hỗn hợp này được xác định các chỉ tiêu trong hỗn hợp PLT (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 vào PLT đến hoạt độ enzyme protease, năng kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol

Chi tiêu	Tỷ lệ phối trộn <i>B. subtilis</i> C10 và <i>L. fermentum</i> TC10			
	ĐC	(1:1)	(1:2)	(2:1)
Hoạt độ protease (UI/mL PLT)	5,6 ^c	40,118 ^b	46,814 ^a	37,807 ^b
Khả năng kháng oxy hóa (%)	11,835 ^b	26,908 ^{ab}	40,579 ^a	23,864 ^{ab}
HL protein khử được (%)	7,631 ^d	55,052 ^c	72,421 ^a	62,000 ^b
HL nito formol (g/L)	0,821 ^c	1,080 ^b	1,311 ^a	1,101 ^b

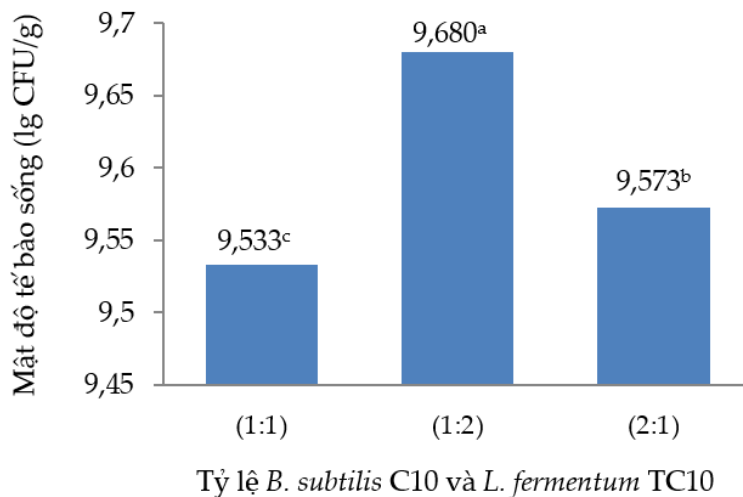
Số liệu có các chữ cái a, b, c biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình theo hàng với $p < 0,05$

Khi cấy hai chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 với tỷ lệ 1:2, hoạt độ protease và khả năng kháng oxy hóa đạt được sau khi lên men ở 35 °C trong 24 giờ có giá trị cao nhất (46,814 UI/mL PLT và 40,579 %) so với các tỷ lệ 1:1 (40,118 UI/mL PLT và 26,908 %) và tỷ lệ 2:1 (37,807 UI/mL PLT và 23,864 %) và mẫu đối chứng (ĐC) có giá trị thấp nhất (5,6 UI/mL PLT và 11,835 %) (Bảng 1).

Theo như các kết quả đã công bố, hàm lượng protein có trong PLT đạt giá trị cao chiếm khoảng 54,4% [17, 26]. Vì vậy, khi tiến hành nghiên cứu các tỷ lệ bổ sung VSV, hàm lượng protein và nito formol thu được đều đạt giá trị cao. Cụ thể, ở tỷ lệ 1:2, hàm lượng protein và nito formol đạt giá trị cao nhất chiếm 72,421 % và 1,311 g/L; tỷ lệ 1:1 chiếm 55,052% và 1,080 g/L; tỷ lệ 2:1 chiếm 62% và 1,101 g/L và mẫu ĐC có giá trị thấp nhất (7,631% và 0,821 g/L) (Bảng 1). Có thể khi bổ sung một lượng VSV thích hợp vào môi trường PLT thì sản sinh ra các enzyme ngoại bào, đặc biệt là enzyme protease để thủy phân protein của PLT tạo thành các peptid mạch ngắn; các acid amin hòa tan vào dịch lên men. Còn acid lactic sẽ phản ứng với CaCO₃ tạo thành lactatcanxi ở dạng không hòa tan [22, 23]. Ngoài ra, acid lactic sinh ra cũng có tác dụng làm mềm protein, hoạt hoá protein và thúc đẩy quá trình thủy phân, tạo điều kiện cho một số protease hoạt động [2, 19]. Ngược lại, mẫu ĐC có giá trị thấp bởi vì trong môi trường PLT không có VSV để sinh enzyme ngoại bào protease thủy phân protein, vì vậy hàm lượng protein trong phần dịch lỏng đạt giá trị rất thấp.

Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn *B. subtilis* C10 và *L. Fermentum* TC10 vào PLT đến mật độ tế bào sống của chế phẩm probiotic

Sau khi lên men PLT trong 48 giờ ở 35 °C, mật độ tế bào sống của hỗn hợp thu được được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (phương pháp Koch). Kết quả cho thấy hai chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 phát triển tốt trong môi trường PLT phù hợp với kết quả đã công bố của Đỗ Thị Bích Thủy (2008) [7]. Mật độ tế bào sống ở tỷ lệ 1:2 đạt giá trị cao nhất (9,680 lg CFU/mL) (Hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 vào PLT đến mật độ tế bào sống của chế phẩm

Số liệu có các chữ cái a, b, c biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình với $p < 0,05$.

Các kết quả nghiên cứu ở trên (Bảng 1 và Hình 1) cho thấy có sự khác nhau về tỷ lệ phối trộn của hai chủng vi khuẩn. Mật độ tế bào sống, khả năng kháng oxy hóa, hoạt độ enzyme ngoại bào protease, hàm lượng protein và acid amin đều đạt giá trị cao nhất ở tỷ lệ 1:2.

Qua các kết quả nghiên cứu xử lý PLT của hai chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10, chúng tôi đã xác định được tỷ lệ bổ sung thích hợp nhất của hai chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 là 1:2. Sau khi xử lý PLT và chọn ra tỷ lệ nuôi cấy thích hợp, chúng tôi tiếp tục khảo sát nhiệt độ lên men của hỗn hợp PLT.

3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men PLT đến chất lượng của chế phẩm probiotic giàu caroten-protein

Nhiệt độ của môi trường lên men PLT có ảnh hưởng lớn đến hoạt độ enzyme protease cũng như các chỉ tiêu mật độ tế bào sống, khả năng kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol.

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men PLT đến hoạt độ enzyme protease, khả năng kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol

Trong thí nghiệm này chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên men PLT đến chất lượng của chế phẩm probiotic giàu caroten-protein. Các giá trị về hoạt độ enzyme protease, khả năng kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol của các mẫu thí nghiệm được xác định (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men PLT đến hoạt độ enzyme protease, khả năng kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol

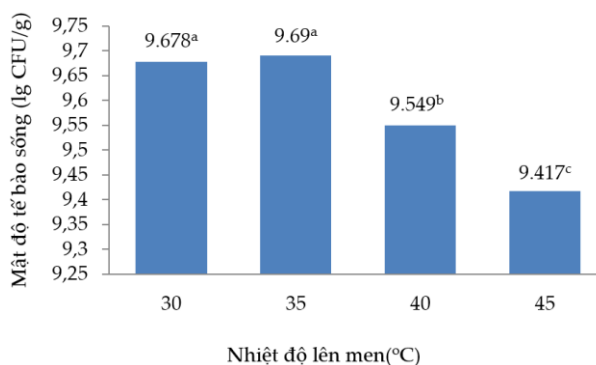
Chỉ tiêu	Nhiệt độ lên men PLT			
	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C
Hoạt độ protease (UI/mL PLT)	46,607 ^a	49,392 ^a	32,859 ^b	30,488 ^b
Khả năng kháng oxy hóa (%)	49,855 ^a	41,449 ^a	16,956 ^b	14,299 ^b
HL protein khử được (%)	71,736 ^a	72,578 ^a	66,052 ^b	64,736 ^b
Hàm lượng nito formol (g/L)	1,222 ^{ab}	1,325 ^a	1,096 ^{bc}	1,036 ^c

Số liệu có các chữ cái a, b, c biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình theo hàng với $p < 0,05$.

Khi lên men PLT với hai chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10, các giá trị về hoạt độ enzyme cũng như các sản phẩm thủy phân sau khi lên men giảm ở nhiệt độ lớn hơn 35 °C (Bảng 2). Hoạt độ protease trong các mẫu thí nghiệm lên men ở 35 °C (49,392 UI/mL PLT) cao hơn so với mẫu lên men ở 30 °C (46,607 UI/mL PLT) và có giá trị thấp nhất ở 45 °C (30,488 UI/mL PLT). Kết quả này phù hợp với Đỗ Thị Bích Thủy và cs (2006) [6] khi nghiên cứu nuôi cấy trực tiếp vi khuẩn *B. subtilis* để loại protein ra khỏi phần vỏ của PLT. Hàm lượng protein và nito formol có giá trị tương ứng với hoạt độ của enzyme. Đối với các mẫu lên men ở 30 °C và 35 °C, hàm lượng protein và nito formol đều đạt giá trị cao và giá trị cao nhất là ở 35 °C (72,578% và 1,325 g/L). Tuy nhiên, khả năng kháng oxy hóa cao nhất ở mẫu 30 °C (49,855%) và giảm dần khi tăng nhiệt độ (Bảng 2).

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men PLT đến mật độ tế bào sống của chế phẩm probiotic

PLT được lên men bằng các chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 theo tỷ lệ 1:2 với các mức nhiệt độ 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C. Mật độ tế bào sống trong dịch thủy phân sau khi lên men 48 giờ được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (Hình 2). Kết quả cho thấy sau 48 giờ lên men số lượng tế bào tăng đáng kể. Ở 30 °C và 35 °C số lượng tế bào sống đạt giá trị cao nhất (9,678 lg CFU/mL và 9,690 lg CFU/mL) và không có sự sai khác thống kê ($p < 0,05$).



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men PLT đến mật độ tế bào sống của chế phẩm probiotic
Số liệu có các chữ cái a, b, c biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình với $p < 0,05$

Từ kết quả khảo sát, chúng tôi chọn nhiệt độ lên men PLT bằng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 là 35 °C trong quy trình xử lý PLT. Kết quả này được chọn để bố trí thí nghiệm tiếp theo.

3.3 Ảnh hưởng của thời gian lên men PLT đến chất lượng của chế phẩm probiotic giàu caroten-protein

Để tiến hành nghiên cứu thời gian lên men PLT, chúng tôi lên men PLT bằng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 theo tỷ lệ 1:2 ở 35 °C với các mức thời gian là 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ.

Ảnh hưởng của thời gian lên men PLT đến hoạt độ enzyme protease, khả năng kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol

Kết quả xác định hoạt độ enzyme protease sinh ra trong môi trường PLT đạt được cao nhất ở 24 giờ (52,029 UI/mL PLT) và hoạt độ enzyme protease cũng đạt giá trị cao ở 48 giờ (51,525 UI/mL PLT) và không có sự sai khác thống kê ($p < 0,05$). Tuy nhiên, hoạt độ enzyme protease giảm ở mức thời gian 72 giờ (42,459 UI/mL PLT). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với Đỗ Thị Bích Thủy (2008) khi nghiên cứu ảnh hưởng của sự thay thế hàm lượng protein bởi phế liệu tôm trong môi trường nuôi cấy lên men sinh tổng hợp protease ngoại bào từ *B. Subtilis*. Sự giảm hoạt độ protease trong môi trường nuôi cấy có thể được giải thích bởi nhiều lý do khác nhau: khi kéo dài thời gian nuôi cấy, do ảnh hưởng của môi trường như pH thay đổi, thành phần môi trường thay đổi do sự hình thành các hợp chất mới của quá trình trao đổi chất của vi khuẩn, hàm lượng các chất dinh dưỡng giảm... làm cho tế bào vi khuẩn suy thoái, enzyme bị bất hoạt. Hơn nữa, đối với protease còn xảy ra hiện tượng enzyme tự thủy phân làm cho hoạt độ giảm [7]. Các chỉ tiêu kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol đều giảm qua từng mức thời gian. Cụ thể, ở mức 24 giờ khả năng kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol đạt giá trị cao nhất (44,686%, 71,368% và 1,353g/L) và có giá trị thấp nhất ở mức 72 giờ (21,545%, 66,263% và 1,171 g/L) (Bảng 3). Kết quả này phù hợp với cống bố trước đây của Đỗ Thị Bích Thủy và cs (2006) [6] khi xác định thời điểm kết thúc quá trình loại bỏ protein từ PLT bằng vi khuẩn *B. Subtilis*.

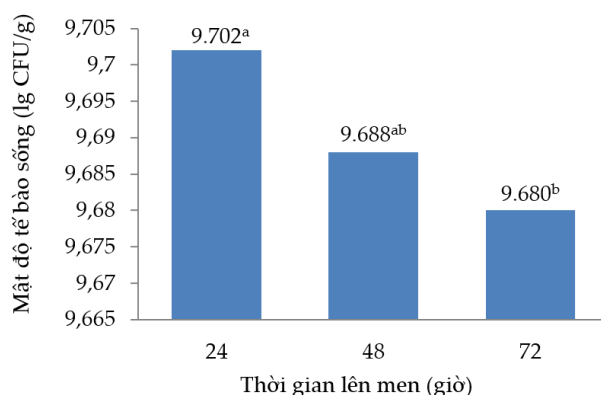
Ảnh hưởng của thời gian lên men PLT đến mật độ tế bào sống của chế phẩm probiotic

PLT được lên men bằng chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 theo tỷ lệ thích hợp (1:2). Sau các thời gian (24 giờ, 48 giờ và 72 giờ) nuôi cấy ở 35 °C, mật độ tế bào sống trong dịch PLT được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Kết quả cho thấy các chủng *B. subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 phát triển tốt trong môi trường PLT. Mật độ tế bào sống đạt giá trị cao nhất ở 24 giờ (9,702 lg CFU/mL) (Hình 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian lên men PLT đến hoạt độ enzyme protease, khả năng kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol

Chỉ tiêu	Thời gian lên men PLT		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ
Hoạt độ protease (UI/mL PLT)	52,029 ^a	51,525 ^a	42,459 ^a
Khả năng kháng oxy hóa (%)	44,686 ^a	43,478 ^a	21,545 ^b
HL protein khử được (%)	71,368 ^a	68,526 ^b	66,263 ^b
Hàm lượng nito formol (g/L)	1,353 ^a	1,269 ^{ab}	1,171 ^b

Số liệu có các chữ cái a, b, c biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình theo hàng với $p < 0,05$.

**Hình 3.** Ảnh hưởng của thời gian lên men PLT đến mật độ tế bào sống của chế phẩm probiotic
Số liệu có các chữ cái a, b, c biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình với $p < 0,05$

Các kết quả về hoạt độ enzyme protease, mật độ tế bào sống, khả năng kháng oxy hóa, hàm lượng protein và nito formol theo thời gian (Bảng 3, Hình 3) cho thấy có sự tương đồng về thời gian giữa các chỉ tiêu. Như vậy, chúng tôi đã xác định được thời gian thích hợp để lên men hỗn hợp PLT là 24 giờ.

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 PLT bằng *B.subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 như sau: tỷ lệ phối trộn của chủng *B.subtilis* C10 và *L. fermentum* TC10 để lên men PLT là 1:2; nhiệt độ lên men PLT là 35 °C; thời gian lên men PLT là 24 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (1997), *Vi sinh vật học*, Nxb Giáo dục, Hà Nội.
2. Trần Thị Luyến (1998), *Công nghệ chế biến sản phẩm lên men*, Nxb Nông nghiệp, tr. 120–123.
3. Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng, Lê Thị Lan Chi (2006), *Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men*, NXB Khoa học và Kỹ Thuật, Hà Nội.

4. Phạm Thị Đan Phượng và Trần Thị Luyến (2013), Chiết rút chế phẩm đậm giàu carotenoid từ đầu tôm thẻ chân trắng, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản*, Tập 1, tr. 125 – 131.
5. Phạm Thị Đan Phượng, Trang Sĩ Trung, Nguyễn Thị Như Thường (2015), Tách chiết và thu nhận chế phẩm carotene-protein từ phế liệu tôm và ứng dụng, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 4.
6. Đỗ Thị Bích Thủy, Trần Thị Luyến (2006). Nghiên cứu nuôi cấy trực tiếp vi khuẩn *Bacillus subtilis* để loại bỏ protein ra khỏi phần vỏ phế liệu tôm, *Tạp chí Khoa học – Công nghệ thủy sản*, Tập 2, tr. 47–51.
7. Đỗ Thị Bích Thủy (2008), Nghiên cứu ảnh hưởng của sự thay thế phế liệu tôm trong môi trường sản xuất chế phẩm protease từ *Bacillus subtilis*, *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn*, Tập 59, tr. 42–43.
8. Đỗ Thị Bích Thủy (2014), Định danh và khảo sát một số tính chất có tiềm năng probiotic của vi khuẩn lactic phân lập từ tôm chua Huế, *Tạp chí Nông nghiệp & phát triển nông thôn*, Tập 4, tr. 97–104
9. Nguyễn Minh Trí, Lương Thị Xuyên, Nguyễn Thị Thanh Hải, Đỗ Thị Ánh Hoà (2009), Ép tách protein từ đầu tôm thẻ (*Penaeus vannamei*) trong sản xuất chitin và bổ sung vào chượp trong sản xuất nước mắm, *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, Số đặc biệt, tr. 141–146.
10. AOAC-981.10 (1995), Crude protein in meat, In Official Method of Analysis of AOAC International, 16th end, Ed by Patricia C, *AOAC International. Arlington. Virginia, Chapter 39*, Tập 2, tr 7–8.
11. Blois MS (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, Tập 181, tr. 1199–1200
12. Chakrabarti, R. (2002), Caroten-protein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process, *Food Biotechnol*, Tập 16, tr. 81–90.
13. FAO/WHO (2001), Joint expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Córdoba, Argentina, 1–4 October.
14. Garcia, A., Henríquez, P., Retamal, C., Pineda, S., (2009), Probiotic properties of *Lactobacillus* spp isolated from gastric biopsies of *Helicobacter pylori* infected and non-infected individuals, *Rev Med Chil*, Tập 137 (3), tr. 369–376.
15. García, A., Sáez, K., Delgado, C., González, C. L., (2012), Low co-existence rates of *Lactobacillus* spp. and *Helicobacter pylori* detected in gastric biopsies from patients with gastrointestinal symptoms, *Rev Esp Enferm Dig*, Tập 104 (9), tr. 473–478.
16. Gotteland, M., Brunser, O., Cruchet, S., (2006), Systematic review: Are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*?, *US National library of Medicine National Institutes of Health*, Tập 23 (8), tr. 1077–1086.
17. Holanda, H. D., & Netto, F. M., (2006), Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus Kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis, *Journal of Food Science*, Tập 71, tr. 298–303.
18. Hong, H. A., Duc, L. H., Simon, M. C., (2005), The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, Tập 29, tr. 813–835.
19. Luis A. Cira, Sergio Huerta, George M. Hall, Keiko Shirai (2001), Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp waste for Chitin recovery, pp.2-7.
20. Manhar, A. K., Bashir, Y., Saikia, D., Nath, D., Gupta, K., Konwar, B. K., Kumar, R., Namsa, N. D., Mandal, M., (2016), Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus Subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi): An in-vitro study with regards to application as an animal feed additive, *Microbiological Research*, Tập 186–187, tr. 62–70
21. 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*, Tập 39(2), tr. 353–361.

22. Rao M. S. and Stevens W. F. (2005), Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp bio-waste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan, *Journal of Chemical Technology and Bio-technology*, Tập 80, tr. 1080–1087.
23. Rao M. S., Tuyen M. H., Stevens W. F. and Chandkrachang S. (2001), Deproteinization by mechanical, enzymatic and *Lactobacillus* treatment of shrimp waste for production of chitin, *Chitin and Chitosan: Chitin and Chitosan in Life Science*, Yamaguchi Press, Japan, tr. 301–304.
24. Sanders, M. E., Morelli, L. and Tompkins, T. A., (2003), Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, Tập 2.
25. Stropfova, V., Marcinakova, M., Gancarcikova, S., Jonecova, Z., scirankova, L., Guba, P., Koscova, J., Boldizarova, K., Laukova, A., (2005), New probiotic strain *Lactobacillus fermentum* AD1 and its effect in Japanese quail, *Vet. Med. – Czech*, Tập 50(9), tr. 415–420.
26. Trung, T. S., Phuong, P. T. D. (2012), Bioactive compounds from by-products of shrimp processing industry in Vietnam, *Journal of Food and Drug Analysis*, Tập 20(1), tr. 194–197.

EFFECT OF SOME TECHNOLOGICAL PARAMETERS ON PRODUCTION OF CAROTENE-PROTEIN-RICH PROBIOTIC PREPARATIONS FROM SHRIMP BY-PRODUCT BY *Bacillus subtilis* C10 AND *Lactobacillus fermentum* TC10

Do Thi Bich Thuy*, Le Thi Thanh

HU – University of Agriculture and Forestry, 102 Phung Hung, Hue, Vietnam

Abstract. In this study, some optimal technological parameters were identified for the hydrolysis and fermentation of shrimp by-product by *B. subtilis* C10 and *L. fermentum* TC10. They are as follows: the ratio between *B. subtilis* C10 and *L. fermentum* TC10 inoculated in the shrimp by-product was 1:2; this mixture was incubated at 35 °C for 24 hours. The results of this study could be applied to producing carotene-protein-rich probiotic preparations.

Keywords: *B. subtilis*, fermentation, *L. fermentum*, probiotic, shrimp by-product