

LỰA CHỌN ĐIỀU KIỆN LÊN MEN CHO SỰ SINH TRƯỞNG CHỦNG *BACILLUS SUBTILIS* BSVN15 ỨNG DỤNG SẢN XUẤT CHẾ PHẨM PROBIOTIC TRONG CHĂN NUÔI

Phuong Thị Hương, Vũ Văn Hạnh✉

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: vvhạnh2003@gmail.com

Ngày nhận bài: 15.6.2017

Ngày nhận đăng: 31.10.2017

TÓM TẮT

Một số chủng *Bacillus subtilis* được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất probiotic. Chúng có khả năng tạo nội bào tử, chịu được điều kiện pH acid của dạ dày. Probiotic sản xuất các enzyme hỗ trợ tiêu hóa thức ăn và ức chế các loại vi khuẩn gây bệnh. Do đó, probiotic góp phần làm giảm việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi. Nghiên cứu này nhằm lựa chọn điều kiện lên men cho sự sinh trưởng của *Bacillus subtilis* BSVN15 ứng dụng trong sản xuất probiotic cho chăn nuôi. Mật độ tế bào trong dịch nuôi cấy (CFU/mL) là thông số được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện lên men. Nghiên cứu được thực hiện trên môi trường cơ bản LB* (trong đó peptone được thay thế cho tryptone). Các thông số lựa chọn bao gồm thời gian lên men, tỷ lệ giống, nhiệt độ, pH, nguồn carbon và nồng độ nguồn carbon chính, nguồn nitrogen và nồng độ nguồn nitrogen chính, các ion kim loại trong các nguồn muối khoáng bổ sung. Năng suất sinh khối chủng *B. subtilis* BSVN15 đạt $6,3 \times 10^{11}$ CFU/ml trong điều kiện lên men được chọn là pH 7, nhiệt độ 37°C, lắc 200 rpm, sử dụng 1,5% (w/v) glucose là nguồn carbon chính, 1% (w/v) peptone là nguồn nitrogen chính, có bổ sung thêm muối khoáng chứa ion Ca^{2+} ở nồng độ 50 mM sau 24 giờ lên men với tỷ lệ tiếp giống 7% (v/v). Mật độ CFU/mL trong điều kiện lên men được lựa chọn cao hơn 26 lần so với lên men trong điều kiện bình thường ở nhiệt độ 30°C, lắc 200rpm, trên môi trường cơ bản LB*.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, điều kiện lên men, probiotic, vi khuẩn, sinh khối tế bào

MỞ ĐẦU

Probiotics là “các sinh vật sống mà khi được đưa vào cơ thể với lượng đủ sẽ tạo ra lợi ích về sức khỏe cho vật chủ (FAO/WHO, 2002), ngoài các tiêu chí không gây bệnh, chịu được pH thấp của dạ dày, khả năng bám dính và tăng sinh trên biểu mô thành ruột, khả năng đối kháng và làm giảm số lượng vi khuẩn có hại với vật chủ, khả năng tiết các enzyme thủy phân thức ăn, các vitamin hay các hợp chất thứ cấp có lợi khác cho vật chủ (Fuller, 1989). Việc lựa chọn các chủng probiotic còn phụ thuộc vào khả năng phát triển tốt trên cơ chất rắn, khả năng tồn tại và duy trì được số lượng cũng như chất lượng trong quá trình sản xuất, vận chuyển, bảo quản chế phẩm trong thời gian dài để giảm chi phí sản xuất (Collins *et al.*, 1998). Các chủng vi sinh vật sử dụng làm probiotic chủ yếu là các chủng vi khuẩn thuộc các chi *Lactobacillus* (Mookiah *et al.*, 2014), *Bifidobacterium* (Khaksar

et al., 2012) và *Bacillus* (Abdelqader *et al.*, 2013). Khả năng sinh bào tử là ưu thế vượt trội của các loài *Bacillus*, bào tử chịu nhiệt trong quá trình sấy khô của probiotic, mặc dù biện pháp đông khô ở nhiệt độ -20°C trong điều kiện chân không có thể áp dụng với hầu hết các loài vi khuẩn nhưng phương pháp này khiến cho chi phí sản xuất probiotic bị đẩy lên cao (Chávez, Ledebøer, 2007). Ngoài ra các loài *Bacillus*, đặc biệt là *B. subtilis* còn có khả năng tiết ra nhiều loại enzyme tiêu hóa giúp cải thiện khả năng hấp thụ thức ăn của vật chủ cũng như khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh cho vật chủ (Westers *et al.*, 2004; Stein, 2005). Việc lựa chọn các yếu tố về điều kiện lên men bao gồm thành phần môi trường, nhiệt độ, pH, thời gian, tỷ lệ giống trong phòng thí nghiệm trước khi áp dụng vào sản xuất trên quy mô công nghiệp nhằm tiết kiệm chi phí, mang lại sản phẩm probiotic chất lượng tốt, có lợi cho cả người sản xuất và tiêu dùng (Bajagai *et al.*, 2016).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vi sinh vật

Chủng probiotic *B. subtilis* BSVN15 đã được xác định trình tự gen 16S và được lưu trữ tại Phòng Các chất chức năng sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chủng được giữ trong glycerol 30% (v/v) ở -80°C. Trước khi sử dụng, chủng được hoạt hóa trên môi trường LB* rắn và giữ ở 4°C.

Môi trường nghiên cứu

Các môi trường cơ bản (Atlas, 2010): LB (Luria-Bertani), LB* (LB với peptone thay cho tryptone), PCB (Plate count broth), PCB* (PCB với peptone thay cho tryptone), NB (Nutrient broth), KB (King's B), PDB (Potato dextrose broth). Các môi trường nghiên cứu được điều chỉnh pH bằng hai dung dịch NaOH 1M và HCl 1M, được vô trùng ở 121°C, 1atm, 15 phút.

Các nguồn carbon: lactose, glucose, sucrose, maltose, maltodextrin, tinh bột.

Các nguồn nitrogen: casein, cao thịt, cao nấm men, pepton, tryptone, ure, NH₄Cl, NaNO₃.

Các muối khoáng: CaCl₂.2H₂O, KCl, FeCl₂.6H₂O, BaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O, Na₂HPO₄.12H₂O.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn

Mật độ vi khuẩn CFU/mL dịch nuôi trong các bình khảo sát là căn cứ dùng để lựa chọn các thông số lên men trong mỗi thí nghiệm và được xác định theo phương pháp của USP (The United States Pharmacopeial Convention) trên môi trường rắn LB* (USP, 2015).

Chọn môi trường cơ bản

Các môi trường dùng để khảo sát là các môi trường không chọn lọc và giàu dinh dưỡng thường được sử dụng trong các nghiên cứu về vi khuẩn: LB, LB*, PCB, PCB*, PDB, KB và NB.

Điều kiện khảo sát: pH 7, tỷ lệ giống 10% (v/v), 30°C, 200 rpm, 24 giờ.

Lựa chọn các thông số lên men

Ảnh hưởng của các thông số lên men tới sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn *B. subtilis* BSVN15 được nghiên cứu độc lập với nhau bằng cách thay đổi yếu tố khảo sát trong môi trường cơ bản. Kết quả lựa chọn phù hợp của thí nghiệm trước sẽ được áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Các thông số lựa chọn bao gồm:

Tỷ lệ giống: 3÷15% (v/v).

Thời gian lên men: 1÷4 ngày.

Nhiệt độ: 25÷45°C.

Giá trị pH: 4,5÷8,5.

Nguồn nitrogen chính

Các nguồn nitrogen ở nồng độ 0,5% (w/v) được bổ sung để thay thế cho nguồn nitrogen trong môi trường cơ bản.

Nồng độ nguồn nitrogen chính: 0,5÷3% (w/v).

Nguồn carbon chính

Các nguồn carbon ở nồng độ 1% (w/v) được bổ sung để thay thế cho nguồn carbon trong môi trường cơ bản.

Nồng độ nguồn carbon chính: 0,5÷3% (w/v).

Ion kim loại: Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Fe²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ (nồng độ 50 mM).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chọn môi trường nghiên cứu cơ bản

Bảng 1 cho thấy môi trường cơ bản LB* là môi trường thích hợp nhất cho sự tăng trưởng của chủng *B. subtilis* BSVN15 với mật độ đạt tới 23,57x10⁹ CFU/mL, gấp 3,4 lần khi sử dụng môi trường LB. Đây cũng là môi trường cơ bản được ưa thích trong các nghiên cứu lựa chọn điều kiện nuôi cấy *Bacillus* (Han *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2014). Khi thay thế peptone bằng tryptone trong hai môi trường LB và PCA, giá trị CFU/mL thu được đều lớn hơn ở mức ý nghĩa 0,05 (Bảng 1). Việc thay thế peptone bằng tryptone giúp giảm chi phí sản xuất do giá thành của tryptone cao hơn so với peptone.

Bảng 1. Kết quả lựa chọn môi trường cơ bản, tỷ lệ giống, thời gian, nhiệt độ, pH tới sự tăng trưởng chủng *B. subtilis* BSVN15.

Môi trường cơ bản (trong điều kiện: 30°C, pH 7, 200 rpm, 10% giống, nuôi cấy sau 24 giờ)							
Môi trường	LB ⁺	LB	PCA ⁺	PCA	NB	King B	PDB
10 ⁹ CFU/mL	23,57 ± 3,14 ^d	6,93 ± 1,69 ^b	9,20 ± 2,44 ^{bc}	6,47 ± 0,50 ^b	10,43 ± 1,40 ^c	2,48 ± 0,22 ^a	8,23 ± 0,49 ^{bc}
Tỷ lệ giống (trong điều kiện: môi trường LB ⁺ , 30°C, pH 7, 200 rpm, nuôi cấy sau 24 giờ)							
% (v/v)	3	5	7	9	11	13	15
10 ⁹ CFU/mL	7,10 ± 0,78 ^{ab}	11,43 ± 1,84 ^{bc}	13,43 ± 1,72 ^c	10,67 ± 1,42 ^{bc}	10,13 ± 5,98 ^{bc}	4,47 ± 0,68 ^a	4,30 ± 1,47 ^a
Thời gian lên men (trong điều kiện: môi trường LB ⁺ , 7% giống, 30°C, pH 7, 200r pm)							
Ngày	1	2	3	4			
10 ⁹ CFU/mL	18,37 ± 6,68 ^a	15,23 ± 4,13 ^a	12,97 ± 1,96 ^a	12,10 ± 0,85 ^a			
Nhiệt độ (trong điều kiện: môi trường LB ⁺ , 7% giống, pH 7, 200 rpm, nuôi cấy sau 24 giờ)							
°C	25	28	31	34	37	41	45
10 ⁹ CFU/mL	3,47 ± 0,55 ^a	6,73 ± 1,10 ^{ab}	10,47 ± 1,34 ^{ab}	15,80 ± 1,20 ^b	83,10 ± 10,9 ^d	30,67 ± 7,02 ^c	3,77 ± 1,10 ^a
pH (trong điều kiện: môi trường LB ⁺ , 7% giống, 37°C, 200 rpm, nuôi cấy sau 24 giờ)							
pH	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8
10 ⁹ CFU/mL	6,13 ± 0,32 ^a	7,70 ± 0,36 ^a	16,10 ± 3,44 ^{bc}	20,40 ± 4,11 ^c	87,37 ± 2,10 ^e	25,43 ± 3,37 ^d	14,13 ± 2,58 ^b

Ghi chú: Sử dụng peptone thay cho tryptone; các chữ số khác nhau biểu hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa 0,05.

Lựa chọn tỷ lệ tiếp giống

Bảng 1 cho thấy, tỷ lệ tiếp giống 7%, tương đương với 7,1x10⁸ CFU/mL, cho mật độ tế bào chủng *B. subtilis* BSVN15 cao nhất là 13,43x10⁹CFU/mL. Nếu tăng tỷ lệ giống lên trên 13% thì mật độ CFU/mL sau 24 giờ giảm đáng kể. Nguyên nhân có thể do khi mật độ giống ban đầu quá cao thì các chất dinh dưỡng trong môi trường nhanh chóng bị cạn kiệt trước khi vi sinh vật đạt được tốc độ tăng sinh tối đa. Các tỷ lệ tiếp giống 5%, 9% và 11% cho thấy không có sự sai khác ở mức ý nghĩa 0,05 về giá trị CFU/ml.

Lựa chọn thời gian lên men

Thời gian lên men là một trong những thông số được các nhà sản xuất quan tâm hàng đầu vì nó liên quan trực tiếp tới quá trình vận hành máy móc, thiết bị và nhân công. Trong hầu hết các nghiên cứu lựa chọn thời gian sinh trưởng thích hợp, các chủng *B. subtilis* đều được lên men trong khoảng thời gian từ 20-24h (Sreekumar, Krishman, 2010; Han *et al.*, 2014; Nguyen, Nguyen, 2014) để đảm bảo cho sinh khối thu được với tỷ lệ cao là các tế bào sinh dưỡng trẻ, khỏe. Bảng 1 cho thấy mật độ tế bào đạt cao nhất sau 24h lên men là 18,37x10⁹ CFU/mL và giảm dần khi kéo dài thời gian lên men tới 4 ngày nhưng không có sự sai khác ở mức ý nghĩa 0,05. Chủng *B.*

subtilis BSVN15 có khả năng sinh bào tử để trở về trạng thái tiềm sinh nên khi kéo dài thời gian nuôi cấy, môi trường dinh dưỡng bị cạn kiệt thì chủng vẫn giữ được một mức ổn định nhất định về mật độ tế bào, đây cũng là một trong những ưu thế lớn của các chủng *B.subtilis* trong ứng dụng sản xuất probiotic.

Lựa chọn nhiệt độ lên men

Mật độ tế bào chủng *B. subtilis* BSVN15 đạt giá trị cao nhất là 83,1x10⁹ CFU/mL ở 37°C, cao hơn lần lượt 2,7 lần và 5,3 lần so với mật độ tế bào ở 41°C và 34°C (Bảng 1). Chủng *B. subtilis* BSVN15 sinh trưởng tốt ở khoảng nhiệt độ từ 34-41°C phù hợp với thân nhiệt của đa số vật nuôi cũng là một lợi thế khi chọn làm chế phẩm probiotic.

Lựa chọn giá trị pH

Chủng *B. subtilis* BSVN15 sinh trưởng tốt ở giá trị pH trung tính tới kiềm nhẹ và tốt nhất ở pH 7 với mật độ là 87,37x10⁹CFU/mL (Bảng 1). Kết quả này cũng phù hợp với khoảng giá trị pH thích hợp cho sự sinh trưởng của các chủng *B. subtilis* trong các nghiên cứu trước như: chủng *B. subtilis* Natto thích hợp sinh trưởng ở pH 7,5 (Nguyen, Nguyen, 2014), chủng *B. subtilis* SK09 thích hợp với pH 6,72 (Sreekumar, Krishman, 2010).

Lựa chọn nguồn nitrogen và hàm lượng nguồn nitrogen

Peptone là nguồn nitrogen thích hợp nhất cho sự tăng trưởng của chủng *B. subtilis* BSVN15 trong các nguồn nitrogen sử dụng để khảo sát với mật độ tế bào là $3,55 \times 10^{11}$ CFU/mL, sau đó đến cao nấm men là $2,56 \times 10^{11}$ CFU/mL, cao hơn lần lượt 2,1 và 1,5 lần so với đối chứng (Bảng 2). Các nguồn nitrogen vô cơ NH_4^+ , NO_3^- hay urea có thể được sử dụng để bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy nhưng không thể thay thế hoàn toàn cho nguồn nitrogen hữu cơ.

Lượng peptone thích hợp cho sự tăng trưởng chủng BSVN15 là 1-2% với mật độ đạt $4,99 \times 10^{11}$ - $4,52 \times 10^{11}$ CFU/mL (Bảng 2). Nguồn nitrogen đóng vai trò cung cấp cơ chất để vi khuẩn tổng hợp nên các hợp chất chứa nitrogen cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Mỗi loài vi khuẩn khác nhau sẽ thích hợp với tỉ lệ C/N trong môi trường sống nhất định (Yu *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2010). Do đó nguồn nitrogen bổ sung vào môi trường cần phải cân đối với nguồn carbon mà vi khuẩn đang sử dụng.

Bảng 2. Kết quả lựa chọn nguồn và nồng độ nitrogen, nguồn và nồng độ carbon tới sự tăng trưởng chủng *B. subtilis* BSVN15.

Nguồn nitrogen (trong điều kiện: 5g/L NaCl, 7% giống, pH 7, 37°C, 200 rpm, nuôi cấy sau 24 giờ)								
0,5% (w/v)	NH4+	Ure	NO3-	Cao thịt	Peptone	Cao nấm men	Tryptone	ĐC1
10^9 CFU/mL	$0,28 \pm 0,03^a$	$0,74 \pm 0,07^a$	$0,37 \pm 0,2^a$	$44,33 \pm 5,51^b$	$354,67 \pm 15,01^f$	$256,33 \pm 12,9^e$	$79 \pm 23,71^c$	$173,67 \pm 23,71^d$
Nồng độ peptone (trong điều kiện: 5g/L NaCl, 7% giống, pH 7, 37°C, 200 rpm, nuôi cấy sau 24 giờ)								
% (w/v)	0,5	1	1,5	2	2,5	3		
10^{11} CFU/mL	$1,10 \pm 0,27^a$	$4,99 \pm 0,61^b$	$4,90 \pm 0,33^b$	$4,52 \pm 0,76^b$	$1,90 \pm 0,56^a$	$1,55 \pm 0,31^a$		
Nguồn carbon (trong điều kiện: 5g/L NaCl, 10g/L pepton, 7% giống, pH 7, 37°C, 200 rpm, nuôi cấy sau 24 giờ)								
1% (w/v)	Lactose	Glucose	Starch	Sucrose	Maltose	Maltodextrin	ĐC2	
10^9 CFU/mL	$55,20 \pm 3,75^d$	$57,70 \pm 4,75^d$	$21,63 \pm 1,64^c$	$8,03 \pm 0,75^b$	$2,53 \pm 0,61^a$	$3,17 \pm 0,742^a$	$10,47 \pm 1,42^b$	
Nồng độ glucose (trong điều kiện: 5g/L NaCl, 10g/L pepton, 7% giống, pH 7, 37°C, nuôi cấy sau 24 giờ)								
% (w/v)	0,5	1	1,5	2	2,5	3		
10^{11} CFU/mL	$1,33 \pm 0,15^a$	$4,06 \pm 0,16^c$	$6,06 \pm 0,31^d$	$4,22 \pm 0,84^c$	$2,43 \pm 0,51^b$	$1,43 \pm 0,15^a$		

Note: Các chữ số khác nhau biểu hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa 0,05, ĐC1 là môi trường LB*, ĐC2 là môi trường chứa 1% peptone.

Lựa chọn nguồn carbon và hàm lượng nguồn carbon

Glucose và lactose là nguồn carbon thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của chủng *B. subtilis* BSVN15 với mật độ CFU/mL lần lượt là $5,77 \times 10^{11}$ và $5,52 \times 10^{11}$ cao gấp khoảng 5 lần so với đối chứng (Bảng 2). Sự chênh lệch mật độ vi khuẩn giữa 2 nguồn carbon này không khác nhau ở mức ý nghĩa 0,05 nhưng giá thành của glucose thấp hơn so với lactose nên glucose được chọn là nguồn carbon chính sử dụng vào lên men sinh trưởng chủng BSVN15. Kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu lựa chọn nguồn carbon thích hợp cho các chủng *B. subtilis* trước đó (Mageshwaran *et al.*, 2014; Nguyen, Nguyen, 2014; Zhong *et al.*, 2014).

trong môi trường chứa 1,5% glucose, khi tăng nồng độ glucose lên 2% thì giá trị này giảm đi. Khi nguồn carbon trong môi trường dư thừa, sự tiêu hao carbon cao trong khi năng suất sinh khối thấp dẫn tới hiệu quả sử dụng năng lượng thấp (Daune *et al.*, 2001).

Lựa chọn nguồn ion kim loại

Môi trường được bổ sung các ion Ca^{2+} , Mg^{2+} và K^+ đều thu được mật độ chủng *B. subtilis* BSVN15 cao hơn so với mẫu đối chứng lần lượt là 3 lần, 2 lần và 1,4 lần trong khi các ion Fe^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} trong các muối vô cơ lại kìm hãm quá trình sinh trưởng của chủng (Bảng 3). Ngoài khả năng kích thích tăng trưởng, các ion Ca^{2+} và Mg^{2+} còn liên quan tới khả năng chịu điều kiện bất lợi của *Bacillus*. Trong môi trường với những thành phần hóa học xác định, tỷ lệ tạo bào tử từ tế bào sinh dưỡng phụ thuộc vào việc bổ

sung Ca^{2+} do ion này là thành phần chủ yếu của lõi bào tử (chiếm 10% khối lượng bào tử) (O'Hara, Hageman 1990; Slieman, Nicholson, 2001). Ngoài ra, Ca^{2+} tương tác với các enzyme chịu trách nhiệm cho việc tạo ra kết nối giữa các protein bề mặt với thành tế bào vi khuẩn, do đó ảnh hưởng tới khả năng bám dính của vi khuẩn (Thomas, Rice, 2014). Ion Mg^{2+} tham gia quá trình tổng hợp peptidoglycan (thành phần quan trọng của cấu trúc

thành tế bào *Bacillus*, quyết định sự vững chắc của thành tế bào) giúp tế bào vi khuẩn *Bacillus* có khả năng chống chịu tốt hơn với những bất lợi trong môi trường (Thomas, Rice, 2014). Bào tử là dạng tồn tại của vi khuẩn *Bacillus* trong các chế phẩm probiotic. Do đó, cần tiến hành nghiên cứu thêm để kết hợp các ion này theo tỷ lệ nhất định nhằm thu được lượng sinh khối lớn và tỷ lệ chuyển bào tử tối đa trong quá trình sản xuất.

Bảng 3. Kết quả lựa chọn nguồn ion kim loại tới sự tăng trưởng chủng *B. subtilis* BSVN15.

Nguồn ion kim loại trong muối khoáng (trong điều kiện: 5g/L NaCl, 10g/L pepton, 15g/L glucose, 7% giống, pH 7, 37°C, 200 rpm, 24 giờ nuôi cấy)									
50 mM	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Fe^{2+}	Ba^{2+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Mn^{2+}	ĐC3
10^{11}	$6,33 \pm$	$4,16 \pm$	$3,02 \pm$	$3 \times 10^{-5} \pm$	$2 \times 10^{-3} \pm$	$2 \times 10^{-5} \pm$	$3 \times 10^{-6} \pm$	$9 \times 10^{-3} \pm$	$2,08 \pm$
CFU/mL	$0,28^e$	$0,65^d$	$0,45^c$	2×10^{-6a}	2×10^{-4a}	5×10^{-7a}	1×10^{-6a}	1×10^{-3a}	$0,27^b$

Ghi chú: Các chữ số khác nhau biểu hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa 0,05, ĐC3 là môi trường chứa 1% peptone và 1,5% glucose.

KẾT LUẬN

Trong điều kiện lên men được lựa chọn pH 7, 37°C, sử dụng 7% giống, với nguồn carbon chính là glucose (1,5%), nguồn nitrogen chính là peptone (1%), bổ sung 50 mM ion Ca^{2+} thì sau 24 giờ lên men chủng vi khuẩn probiotic *B. subtilis* BSVN15 đạt được mật độ $6,33 \times 10^{11}$ CFU/ml. Trong các yếu tố lựa chọn, nhiệt độ và thành phần dinh dưỡng mang tính quyết định tới tốc độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn *B. subtilis* BSVN15.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ từ đề tài “Nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa đa enzyme và probiotic để ứng dụng trong chế biến thức ăn chăn nuôi từ bã thải chế biến tinh bột” của Sở khoa học công nghệ - Hà Nội, mã số: 01C-06/01-2015-2. Tác giả xin cảm ơn CN. Ngô Thị Huyền Trang, ThS. Dương Thu Hương, TS. Nguyễn Thị Nguyệt và CN. Nguyễn Danh Hưng đã phụ giúp trong việc chuẩn bị thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdelqader A, Irshaid R, Al-Fataftah A (2013) Effects of dietary probiotic inclusion on performance, eggshell quality, cecal microflora composition and tibial traits of laying hens in the late phase of production. *Trop Anim Health Prod* 45(4): 1017-1024.

Atlas RM (2010) Handbook of microbiological media. CRC press.

Bajagai Y, Klieve A, Dart P, Bryden W (2016) Probiotics in animal nutrition. Production, impact and regulation, H. Makkar. Rome, *FAO Animal Production and Health Paper*: 179.

Carvalho A, Oliveira F, Mariano R, Gouveia E, Souto-Maior A (2010) Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. *Braz Arch Biol Technol* 53(3): 643-652.

Chávez B, Ledebor A (2007) Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technol* 25(7-8): 1193-1201.

Collins J, Thornton G, Sullivan G (1998) Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J* 8(5-6): 487-490.

Dauner M, Storni T, Sauer U (2001) *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *J Bacteriol* 183(24): 7308-7317.

FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London: WHO, Canada: FAO.

Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66(5): 365-378.

Han D, San N, Angun P, Onarman U, Demirci A, Tekinay T (2014) Response surface optimization of the cultivation conditions and medium composition a novel probiotic strain *Bacillus pumilus* STF26. *Int Food Res J* 21(4): 1355-1361.

Khaksar V, Golian A, Kermanshahi H (2012) Immune response and ileal microflora in broilers fed wheat-based diet with or without enzyme Endofeed W and supplementation of thyme essential oil or probiotic PrimaLac. *Afr J Biotechnol* 11(81): 14716.

- Mageshwaran V, Inmann F, Holmes L (2014) Growth kinetics of *Bacillus subtilis* in lignocellulosic carbon sources. *Int J Microbiol Res* 6(2): 570-574.
- Monteiro S, Clemente J, Carrondo M, Cunha A (2014) Enhanced spore production of *Bacillus subtilis* grown in a chemically defined medium. *Adv Microbiol* 4(08): 444.
- Mookiah S, Sieo C, Ramasamy K, Abdullah N, Ho Y (2014) Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *J Sci Food Agric* 94(2): 341-348.
- Nguyen T, Nguyen T (2014) Optimization of the Fermentation medium to receive the highest biomass yield by *Bacillus subtilis* Natto and the initial test of nattokinase Yield. *IOSR Journal of Engineering* 4(12): 35-40.
- O'Hara M, Hageman J (1990) Energy and calcium ion dependence of proteolysis during sporulation of *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol* 172(8): 4161-4170.
- Slieman T, Nicholson W (2001) Role of dipicolinic acid in survival of *Bacillus subtilis* spores exposed to artificial and solar UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 67(3): 1274-1279.
- Sreekumar G, Krishnan S, (2010) Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. *Afr J Biotechnol* 9(47): 8078-8084.
- Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56(4): 845-857.
- Thomas III K, Rice C (2014) Revised model of calcium and magnesium binding to the bacterial cell wall. *Biometals* 27(6): 1361-1370.
- USP (2015) Microbiological examination of nonsterile products. Microbial enumeration tests Retrieved 24 March, from <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c61.pdf>.
- Westers L, Westers H, Quax W (2004) *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *BBA Mol Cell Res* 1694(1): 299-310.
- Yu X, Hallett S, Sheppard J, Watson A (1998) Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20(6): 333-338.
- Zhong J, Zhang X, Ren Y, Yang J, Tan H, Zhou J (2014) Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jjean-peptide production in fed batch fermentation using central composite design. *Electron J Biotechnol* 17(3): 132-136.

SELECTION OF THE FERMENTATION CONDITIONS FOR THE GROWTH OF *BACILLUS SUBTILIS* BSVN15 USED IN PRODUCTION OF PROBIOTIC FOR LIVESTOCK

Phuong Thi Huong, Vu Van Hanh

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Some strains of *Bacillus subtilis* are widely used in the probiotic production for various areas, especially utilized in feed production. *B. subtilis* group that have the ability to produce internal spores. They are very resistant to acid pH in animal stomach. *B. subtilis* group that produce various enzymes regarding digestion of food and inhibit pathogens. Thus, which contribute to reducing the use of antibiotics. In this study, the growth conditions of *Bacillus subtilis* BSVN15 strain was selected to apply for probiotic production for feeds. For convenience, the biomass results were presented as CFU/ml (colony forming units per ml) of *Bacillus subtilis* BSVN15 strain from various fermentation liquid culture conditions. The study was conducted in LB* (Luria-Bertani)* broth medium (in the LB medium peptone was replaced by tryptone). Various selected parameters including fermentation time (hrs), inoculum size (% v/v), temperature of fermentation, pH value of culture, various carbon sources and various concentrations of carbon, some nitrogen sources and some nitrogen concentrations, some supplemental metal ion sources. Selected fermentation conditions included pH 7 of liquid culture, 37°C of incubation, 7% (v/v) of inoculation size, glucose concentration of 1.5% (w/v) as the main carbon source, peptone concentration of 1% (w/v), Ca²⁺ of 50 mM, 24 hours of culture time, as a biomass of *Bacillus subtilis* BSVN15 strain reached 6.3 x 10¹¹ CFU/mL. In the best selected fermentation condition, the biomass (CFU / mL) was produced about 26 times higher than that of normal fermentation at the same temperature of 30°C, shaking incubator 200 rpm, in basical Luria-Bertani broth.

Keywords: *Bacillus subtilis*, fermentation condition, microorganism, probiotic, cell biomass