

10. Nguyễn Tiến Toàn và Đỗ Văn Ninh (2013). Nghiên cứu ảnh hưởng của Lysine, Probiotics đến tốc độ sinh trưởng và chất lượng thịt gà ta. Tạp chí KHCVN Thủy sản, 4: 114-19.
11. Trần Anh Tuyên, Nguyễn Thị Quyên, Nguyễn Xuân Việt và Hoàng Thị Phương Thúy (2019). Sử dụng chế phẩm probiotics bổ sung trong thức ăn chăn nuôi gà thịt. Tạp chí KHCVN. Trường Đại học Hùng Vương, 16(3): 3-9.
12. Trần Thanh Vân, Nguyễn Đức Trường, Nguyễn Thị Thúy My, Lăng Thị Đẹp, Hoàng Thị Thương và Trần Văn Thành (2021). Ảnh hưởng bổ sung Algimun đến khả năng sản xuất thịt của gà Broiler Cobb 500. TNU J. Sci. Tech., 226(5): 118-25.

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN LÊN MEN LÊN MẬT SỐ *BACILLUS SUBTILIS* VÀ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* TRÊN BÃ CƠM DỪA

Lưu Thị Thúy Hải^{1*}, Lâm Mộng Thúy¹, Trần Thị Như Ý¹, Nguyễn Hoài Dương¹ và Lê Trúc Linh¹

Ngày nhận bài báo: 30/08/2021 - Ngày nhận bài phản biện: 28/09/2021

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 01/10/2021

TÓM TẮT

Bacillus subtilis và *Saccharomyces cerevisiae* là những vi sinh vật có lợi, thường được dùng như những probiotic để bổ sung cho người và động vật. Đồng thời, bã cơm dừa là nguồn phụ phẩm của ngành công nghiệp chế biến dừa và rất phổ biến ở khu vực Đồng Bằng Sông Cửu Long và có hàm lượng dinh dưỡng cao. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của điều kiện lên men lên mật số của vi khuẩn và nấm men trên cơ chất là bã cơm dừa được khảo sát để từ đó xây dựng quy trình sản xuất probiotic trên cơ chất này. Kết quả cho thấy, ở mức phối trộn với bã cơm dừa bằng hỗn hợp cám bắp và cám gạo 25%, bổ sung 2% rỉ mật đường, 3% peptone, 0,1/0,3% $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, pH 6,0, lên men 120h và ở điều kiện nhiệt độ lên men là 30°C, mật số vi khuẩn đạt trên 10^9 , nấm men trên 10^8 CFU/g và đáp ứng yêu cầu về mật số của một chế phẩm probiotic.

Từ khóa: Probiotic, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, bã cơm dừa.

ABSTRACT

Effects of fermentation conditions on the growth of *B. subtilis* và *S. cerevisiae* on Copra meal

B. subtilis and *S. cerevisiae* are beneficial microorganisms and are often used as probiotics to supplement humans and animals. Also, copra meal is a by-product of the coconut processing industry and is very popular in the Mekong Delta region. They also have high nutritional content. In this study, the effects of fermentation conditions on the growth of bacteria and yeast on the copra meal was investigated in order to develop a probiotic production process on this substrate. The results showed that, at the mixed level of copra meal by a mixture of corn bran and rice bran at 25%, adding 2% molasses, 3% peptone, 0.1/0.3% $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ with the fermentation conditions of pH 6.0, 120h incubated and 30°C, the number of bacteria was more than 10^9 CFU/g, and the number of yeast greater than 10^8 CFU/g. This satisfies requirement in microbial number of a probiotic product.

Keywords: Probiotic, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, copra meal.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Probiotics là một nhóm vi sinh vật không gây bệnh. Những vi sinh vật sống có lợi này, khi tiêu thụ một số lượng đầy đủ sẽ mang lại lợi ích cho người và các động vật sử dụng

chúng (Araya và ctv, 2002). Để phát huy được tác dụng của probiotic, vi khuẩn dùng làm probiotic phải sống, với mật số cao, số lượng tế bào phải đạt từ 10^6 - 10^7 CFU/g chế phẩm trở lên (Sah, 2000).

B. subtilis thuộc chi *Bacillus*, là nhóm trực khuẩn Gram dương, có khả năng sinh bào tử và được sử dụng trong rất nhiều loại chế phẩm probiotic (Khochamit và ctv, 2015).

¹ Trường Đại học Trà Vinh.

* Tác giả liên hệ: TS. Lưu Thị Thúy Hải, Khoa Nông nghiệp-Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh; Điện thoại: 0836762488; Email: lthai@tvu.edu.vn.

Chúng *B. subtilis* ATCC 6633 có rất nhiều lợi ích, chúng tạo ra các hợp chất kháng khuẩn và kháng nấm (Stein, 2005). Hoạt tính cao của các enzyme phân hủy các hợp chất polysaccharide khó phân hủy và các hợp chất khác cũng được tìm thấy ở chủng này như nannanase, protease, cellulase, β -glucanase, α -amylase, lipase và phytase (Chatterjee và ctv, 2015; Sicuia và ctv, 2015; Japlin và Poernomo, 2016; Mingmongkolchai và Panbangred, 2017; Karakurt và ctv, 2019). Chúng thường được sử dụng như một chủng ĐC dương về hoạt tính enzyme, khả năng ức chế những vi sinh vật gây bệnh, tiềm năng probiotic (El-Naggar, 2004; Sicuia và ctv, 2015; Elshaghabe và ctv, 2017). Do đó, chủng *B. subtilis* ATCC6633 được chọn để sản xuất chế phẩm probiotic trên cơ chất bã com dừa.

Nấm men *S. cerevisiae* được sử dụng như nguồn sinh khối bổ sung thức ăn trong chăn nuôi, nhằm cung cấp nguồn dinh dưỡng như protein, các vitamin, các axit amin thiết yếu, giúp vật nuôi tăng tốc độ tăng trưởng và nâng cao sức khỏe cho đường ruột của động vật (Al-Manhel và Niamah, 2017; Suarez và Guevara, 2018). Thành tế bào nấm men chứa hàm lượng cao của Mannan Oligosaccharides (MOS) và β -D-glucan (Maru và ctv, 2015; Al-Manhel và Niamah, 2017). Các hợp chất quý này là những prebiotic để kích thích sự tăng trưởng của nhóm lợi khuẩn trong đường ruột, đồng thời giúp ức chế các hại khuẩn như *Escherichia coli* và *Salmonella*, kích thích hoạt động miễn dịch của cơ thể động vật (Konca và ctv, 2009; Xu và ctv, 2017).

Bã com dừa là một phụ phẩm phổ biến và được sử dụng làm thức ăn trong chăn nuôi. Chúng chứa hàm chất xơ cao, trong đó β -mannan (61%), galactomannan chiếm hàm lượng cao (Stein và ctv, 2015). Thủy phân các hợp chất β -mannan, galactomannan nhờ enzyme thủy phân được tiết ra bởi các vi sinh vật được sẽ tạo ra các prebiotic. Bã com dừa còn có hàm lượng protein tương đối cao, các axit amin và các chất chống oxi hóa (Sundu và ctv, 2006; Ghosh và ctv, 2014). Tuy nhiên, bã com dừa thô lại có giá trị thức ăn thấp do chúng

có hàm lượng chất xơ cao và thành phần dinh dưỡng không cân bằng. Đồng thời đặc điểm vật lý như có mật độ khối thấp và có khả năng giữ nước cao cũng làm hạn chế giá trị thức ăn của chúng (Sundu và ctv, 2009). Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng sử dụng enzyme giúp làm tăng giá trị thức ăn của bã com dừa (Sundu và ctv, 2005; Sundu và ctv, 2009). Vì vậy, bã com dừa là loại cơ chất có tiềm năng để sản xuất chế phẩm probiotic cung cấp trong chăn nuôi.

Giả thuyết rằng các enzyme được tiết ra bởi vi khuẩn và nấm men có thể giúp phân giải các hợp chất khó phân hủy trong bã com dừa và tạo nên dạng dinh dưỡng dễ được hấp thu bởi vật nuôi. Do đó, bước đầu khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae* trên bã com dừa được thực hiện để từ đó xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm probiotic trên cơ chất này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, địa điểm và thời gian

Bã com dừa được thu gom từ các cơ sở sản xuất các sản phẩm từ com dừa, được sấy khô và được bảo quản trong các túi polymer sạch. Chúng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ATCC 6633 và chủng nấm men Pháp *Saccharomyces cerevisiae* được mua ở dạng đông khô.

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 12 năm 2020 đến tháng 8 năm 2021, tại Trường Đại học Trà Vinh, tỉnh Trà Vinh.

2.2. Phương pháp

Điều kiện lên men: Hỗn hợp môi trường (50g) gồm (bã com dừa, cám, bắp trộn theo tỷ lệ), được trộn đều với độ ẩm 65%; pH 6,0 (ngoại trừ thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của pH lên quá trình lên men); Hỗn hợp được tiệt trùng 121°C, trong thời gian 15 phút. Sau đó, mỗi mẫu được ủ với: 1% (w/v) nấm men *Saccharomyces cerevisiae* mật số là 10^9 tế bào/g, vi khuẩn *Bacillus subtilis* 10^8 nha bào/ml, đếm mật số sau 120h (ngoại trừ thí nghiệm theo dõi thời gian lên men); Nhiệt độ lên men: 30°C (ngoại trừ thí nghiệm xác định nhiệt độ lên men tối ưu cho vi khuẩn và nấm men), thực hiện trong điều kiện vô trùng.

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ATCC 6633 được hoạt hóa và sử dụng ở dạng dịch nha bào: Cho chủng vi khuẩn mọc qua đêm trên ống thạch nghiêng môi trường số 1 (Antibiotic Agar No. 1, Merk) ở 37°C. Thu vi khuẩn đã phát triển trên mặt thạch bằng nước muối sinh lý, rồi chuyển sang một bề mặt thạch rộng hơn (như trong bình Roux) của môi trường số 1, trong môi trường này đã thêm vào dung dịch 0,001% (kl/tt) mangan sulfat ($MnSO_4$) để giúp thúc đẩy sự hình thành nha bào. Nhũ dịch vi sinh vật được trải cho phủ kín bề mặt môi trường bằng cách cho vào bề mặt thạch một vài viên bi thủy tinh vô khuẩn. Đem ủ ở 37°C trong 7 ngày. Dùng nước cất vô khuẩn rửa vi khuẩn đã mọc (chủ yếu là nha bào) đem hoà loãng tới nồng độ thích hợp, dung dịch khoảng 10^8 nha bào/g bảo quản 4°C trước khi sử dụng để bổ sung vào môi trường lên men.

Mật số *S. cerevisia* được xác định trước khi bố trí và sau khi thu mẫu được thực hiện bằng phương pháp pha loãng và đếm trên đĩa petri chứa môi trường Sabouraud Dextrose Agar (Merk) ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 48h. Ghi nhận hình dạng và kích thước khuẩn lạc các chủng nấm men trên đĩa. Làm tiêu bản các chủng nấm men quan sát dưới kính hiển vi để xác định hình dạng, kích thước của tế bào. Xác định thêm một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa của nấm men: Khả năng phân giải đường glucose, khả năng phân giải urea, khả năng phân giải gelatin để khẳng định thêm tính chính xác từ việc quan sát hình thái.

Mật số *B. subtilis* được xác định trước khi bố trí và sau khi thu mẫu được thực hiện bằng phương pháp pha loãng và đếm trên đĩa petri chứa môi trường số 1 ở 37°C trong thời gian 48h. Ghi nhận hình dạng và kích thước khuẩn lạc các chủng vi khuẩn trên đĩa. Làm tiêu bản các chủng vi khuẩn quan sát dưới kính hiển vi để xác định hình dạng, kích thước của tế bào. Đồng thời, xác định một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn: Thử nghiệm indol (-), VP (+), nitrate (+), catalase (+) để khẳng định thêm tính chính xác từ việc quan sát hình thái.

2.3. Ảnh hưởng của điều kiện lên men đến mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae*

* *Hỗn hợp cám bắp và cám gạo*: Cám bắp và cám gạo là 2 loại nguyên liệu có nguồn gốc tự nhiên thường được sử dụng nhiều trong nuôi cấy vi sinh vật. Trong cám và bắp có đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho vi sinh vật phát triển. Mặt khác, khi tạo môi trường, chúng thường có tính chất vật lý rất thích hợp để vừa đảm bảo khối kết dính cần thiết, vừa đảm bảo lượng không khí lưu chuyển trong khối nguyên liệu (Nguyễn Đức Lượng, 2002). Vì vậy, trong TN này, hỗn hợp cám bắp và cám gạo được sử dụng phối trộn với bã com dừa để nhân mật số của vi khuẩn và nấm men. Hỗn hợp cám bắp được và cám gạo tỷ lệ (1:1) được phối trộn với bã com dừa ở các hàm lượng khác nhau: 0, 10, 15, 20, 25 và 30%. Sau đó tìm ra nghiệm thức tối ưu (NTTU) từ TN này để bố trí TN thứ 2, kí hiệu là NTTU1. Thí nghiệm gồm 1 nhân tố, 6 NT, mỗi NT lặp lại 3 lần, mỗi lần là 1 bình lên men. Chỉ tiêu theo dõi: Mật số của vi khuẩn và nấm men sau 120h lên men.

* *Ri mật đường*. NTTU1 được bổ sung ri đường ở các hàm lượng khác nhau: 0, 2, 4, 6, 8 và 10%. Tương tự TN 2.2.1, NTTU2 được tìm ra từ TN này sẽ được sử dụng để bố trí TN tiếp theo. Thí nghiệm này gồm 1 nhân tố, 6 NT, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần là một bình lên men. Chỉ tiêu theo dõi: Mật số của vi khuẩn và nấm men sau 120h lên men.

* *Nito-pepton và $(NH_4)_3PO_4$* . NTTU2 được bổ sung kết hợp 2 nguồn nitơ hữu cơ và nitơ vô cơ ở các hàm lượng khác nhau. Peptone: 1, 2, 3, 4% và $(NH_4)_3PO_4$: 0,1; 0,3; 0,5; 0,7% của $(NH_4)_3PO_4$. NTĐC: không bổ sung nguồn nitơ. NT tối ưu từ TN này được sử dụng để bố trí TN tiếp theo, kí hiệu NTTU3. Thí nghiệm này gồm 1 nhân tố, 17 NT (gồm 1 NTĐC), mỗi NT lặp lại 3 lần, mỗi lần là một bình lên men. Chỉ tiêu theo dõi: Mật số của vi khuẩn và nấm men sau 120h lên men.

* *Thời gian lên men*. NTTU3 được sử dụng như môi trường có thành phần lên men tối ưu để thực hiện các TN khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men tối ưu để nhân mật số

của *B. subtilis* và *S. cerevisiae*. Thời gian lên men khảo sát bao gồm 24, 72, 120 và 168h. Thí nghiệm này gồm 1 nhân tố, 4 NT, mỗi NT lặp lại 3 lần, mỗi lần là một bình lên men. Chỉ tiêu theo dõi mật số của vi khuẩn và nấm men sau các khoảng thời gian lên men như được mô tả ở trên.

* **Nhiệt độ.** NTTU3 được sử dụng như môi trường có thành phần lên men tối ưu để thực hiện các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên men tối ưu để nhân mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae*. Các mức nhiệt độ được khảo sát là 25, 30, 35 và 40°C. Thí nghiệm này gồm 1 nhân tố, 4 NT, mỗi NT lặp lại 3 lần, mỗi lần là một bình lên men. Chỉ tiêu theo dõi mật số của vi khuẩn và nấm men sau 120h lên men.

* **Độ pH.** NTTU3 được sử dụng như môi trường có thành phần lên men tối ưu để thực hiện các TN khảo sát ảnh hưởng của thời gian, nhiệt độ và pH lên men tối ưu để nhân mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae*. Các mức pH khác nhau được khảo sát 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0. Thí nghiệm này gồm 1 nhân tố, 6 NT, mỗi NT lặp lại 3 lần, mỗi lần là một bình lên men. Chỉ tiêu theo dõi mật số của vi khuẩn và nấm men sau 120h lên men.

2.4. Xử lý số liệu

Dữ liệu được phân tích bằng phương pháp phân tích thống kê ANOVA 1 nhân tố thông qua phần mềm SPSS vs. 22. Trong trường hợp dữ liệu không đồng nhất, chuyển dạng dữ liệu hoặc kiểm định Welch'test sẽ được sử dụng. Kết quả phân tích được biểu thị trên dạng Mean±SE.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của hỗn hợp cám bắp và cám gạo lên mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae*

Việc phối trộn với bã com dừa bằng hỗn hợp cám bắp và cám gạo ở các tỷ lệ khác nhau cho thấy ảnh hưởng của chúng lên mật số của vi khuẩn *B. subtilis* và nấm men *S. cerevisiae* (Bảng 1). Tỷ lệ phối trộn với bã com dừa bằng hỗn hợp cám bắp và cám gạo càng cao thì mật số của vi khuẩn và nấm men càng tăng, và đạt mật số cao nhất ở mức phối trộn là 25 và 30%.

Mật số vi khuẩn và nấm men ở tất cả các NT có cám bắp và cám gạo thì đều cao hơn ở mức có ý nghĩa thống kê so với mật số của chúng ở NT 100% BCD. Điều này có thể giải thích rằng, do cám bắp và cám gạo đều chứa hàm lượng chất dinh dưỡng cao như đường khử, tinh bột, protein, chất béo, các axit amin và vitamin (Sharma và ctv, 2004; Afangide và ctv, 2018), vì vậy đây là nguồn dinh dưỡng cung cấp cho vi sinh vật phát triển.

Bảng 1. Ảnh hưởng của hỗn hợp cám (CFU/g)

Nghiệm thức	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
100%BCD	1,37×10 ⁵ ±6,67×10 ^{3a}	1,33×10 ⁴ ±8,81×10 ^{2a}
90%BCD+10%C	1,60×10 ⁶ ±1,15×10 ^{5b}	1,57×10 ⁵ ±8,81×10 ^{3b}
85%BCD+15%C	1,73×10 ⁶ ±8,81×10 ^{4b}	5,97×10 ⁵ ±9,52×10 ^{4c}
80%BCD+20%C	2,37×10 ⁷ ±8,81×10 ^{5c}	2,27×10 ⁶ ±8,81×10 ^{4d}
75%BCD+25%C	7,23×10 ⁷ ±1,04×10 ^{7d}	6,90×10 ⁶ ±8,14×10 ^{5e}
70%BCD+30%C	6,87×10 ⁷ ±9,70×10 ^{6d}	7,07×10 ⁶ ±6,96×10 ^{5e}
F _(5,12)	698,46	627,34
Sig.	P<0,001	P<0,001

Ghi chú: Các giá trị Mean trong cùng cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê (P>0,05) qua phép thử Tukey HSD; Mean: giá trị trung bình; SE: sai số chuẩn; BCD: bã com dừa; C: hỗn hợp cám bắp và cám gạo.

Mặc dù mật số vi khuẩn và nấm men ở các NT phối trộn với bã com dừa bằng hỗn hợp cám gạo và bắp ở mức 25 và 30% không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, ở mức phối trộn là 25%, mật số của vi khuẩn là cao nhất, và việc bổ sung ít hỗn hợp cám hơn sẽ giúp tiết kiệm được chi phí sản xuất. Do đó, trong TN này NT tối ưu được chọn là 75%BCD+25%C.

3.2. Ảnh hưởng của ri mật đường lên mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae*

Ri đường là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất và tinh sạch đường, ri đường chứa hàm lượng dinh dưỡng cao, được sử dụng như nguồn cung cấp cacbon để sử dụng cho vi sinh vật phát triển (Clarke, 2003). Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 2 cho thấy bổ sung hàm lượng ri đường ở mức 2% cho kết quả tốt nhất (mật số vi khuẩn đạt 6,77×10⁸ CFU/g và nấm men đạt 7,53×10⁷), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mật số của chúng ở tất cả các nghiệm thức còn lại, bao gồm cả

nghiệm thức không bổ sung mật rỉ đường. Khi hàm lượng bổ sung càng cao thì mật số của vi khuẩn và nấm men đều giảm. Điều này có thể liên quan đến tác dụng ức chế sinh trưởng của thành phần đường trong mật rỉ, ảnh hưởng gây giảm tốc độ thủy phân của đường hoặc ảnh hưởng của đường lên áp suất thẩm thấu của tế bào ở nồng độ cao (Shasaltaneh và ctv, 2013). Vì vậy ở TN này, NT tốt nhất được chọn ra là NT có bổ sung rỉ đường ở mức 2%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của rỉ mật đường (CFU/g)

NT	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
0%	7,40×10 ⁷ ±9,29×10 ^{6a}	6,96×10 ⁶ ±7,51×10 ^{5a}
2%	6,77×10 ⁸ ±8,37×10 ^{7b}	7,53×10 ⁷ ±6,49×10 ^{6b}
4%	5,60×10 ⁷ ±2,65×10 ^{6a}	1,47×10 ⁷ ±8,82×10 ^{5c}
6%	1,37×10 ⁷ ±8,82×10 ^{5c}	1,23×10 ⁷ ±8,82×10 ^{5c}
8%	1,23×10 ⁶ ±8,82×10 ^{4d}	6,67×10 ⁵ ±8,82×10 ^{4d}
10%	9,67×10 ⁴ ±8,82×10 ^{3c}	9,67×10 ⁴ ±8,82×10 ^{3c}
<i>F</i> _(5, 12)	1109,14	611,38
<i>Sig.</i>	<i>P</i> <0,001	<i>P</i> <0,001

3.3. Ảnh hưởng của Nito-pepton và (NH₄)₃PO₄ lên mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae*

Cacbon và nitơ là hai nguồn dinh dưỡng chính cho sự phát triển của vi sinh vật (Lin và ctv, 2019). Vi sinh vật có thể sử dụng cả nguồn nitơ hữu cơ và nitơ vô cơ (Clarke, 2013). Kết quả của nghiên cứu đã chỉ ra rằng khi bổ sung nguồn nitơ hữu cơ (pepton) càng cao thì giúp gia tăng mật số của cả vi khuẩn và nấm men, ngược lại khi hàm lượng nitơ vô cơ (NH₄)₃PO₄ bổ sung càng cao thì mật số vi khuẩn và nấm men đều giảm (Bảng 3). Mật số vi khuẩn và nấm men đạt cao nhất 10⁹ và 10⁸ CFU/g, tương ứng ở các nghiệm thức bổ sung 3% và 4% pepton kết hợp với 0,1% và 0,3% (NH₄)₃PO₄, mật số vi khuẩn và nấm men giữa các nghiệm thức này không khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhau, nhưng đều cao hơn ở mức có ý nghĩa thống kê so với mật số của chúng ở tất cả các nghiệm thức còn lại. Ở các nghiệm thức có hàm lượng bổ sung (NH₄)₃PO₄ cao hơn 0,3% thì mật số vi khuẩn và nấm men giảm mạnh, có thể là do (NH₄)₃PO₄ ở hàm lượng cao đã có độc tính lên vi sinh vật và ức chế lại sự phát triển của vi khuẩn và nấm men (Geng và ctv, 2017). Pepton sử dụng ở hàm lượng cao

thì mật số vi sinh vật tăng lên, tuy nhiên do pepton là nguồn nitơ hữu cơ có giá trị thương mại cao, vì vậy đối với thí nghiệm này nghiệm thức tối ưu được chúng tôi lựa chọn là nghiệm thức chứa 3% pepton+0,1 hoặc 0,3% (NH₄)₃PO₄. Trong các thí nghiệm tiếp theo, (NH₄)₃PO₄ ở mức 0,1% được sử dụng.

Bảng 3. Ảnh hưởng của Pepton và (NH₄)₃PO₄

Pepton (%)	(NH ₄) ₃ PO ₄ (%)	<i>B. subtilis</i> (CFU/g)	<i>S. cerevisiae</i> (CFU/g)
0	0	6,50×10 ⁷ ±5,51×10 ^{6a}	6,40×10 ⁶ ±2,64×10 ^{5a}
	0,1	7,33×10 ⁷ ±8,82×10 ^{5a}	7,37×10 ⁶ ±2,33×10 ^{5a}
	0,3	7,57×10 ⁷ ±8,82×10 ^{5a}	7,03×10 ⁶ ±8,82×10 ^{4a}
1	0,5	6,60×10 ⁶ ±1,00×10 ^{5a}	6,23×10 ⁵ ±1,45×10 ^{4b}
	0,7	6,17×10 ⁶ ±1,20×10 ^{5a}	5,50×10 ⁶ ±1,73×10 ^{4b}
	0,1	7,27×10 ⁸ ±1,45×10 ^{7b}	7,63×10 ⁷ ±8,82×10 ^{5c}
2	0,3	7,60×10 ⁸ ±1,15×10 ^{7b}	7,53×10 ⁷ ±8,82×10 ^{5c}
	0,5	6,23×10 ⁸ ±1,45×10 ^{7c}	6,97×10 ⁵ ±8,82×10 ^{3b}
	0,7	5,73×10 ⁸ ±1,45×10 ^{7c}	6,23×10 ⁵ ±1,85×10 ^{4b}
3	0,1	8,37×10 ⁹ ±1,86×10 ^{8d}	8,43×10 ⁸ ±1,76×10 ^{7d}
	0,3	8,13×10 ⁹ ±8,81×10 ^{7d}	8,33×10 ⁸ ±1,76×10 ^{7d}
	0,5	7,57×10 ⁷ ±1,20×10 ^{6a}	7,57×10 ⁶ ±1,20×10 ^{5a}
4	0,7	7,00×10 ⁷ ±1,15×10 ^{6a}	6,87×10 ⁶ ±8,82×10 ^{4a}
	0,1	8,43×10 ⁹ ±2,33×10 ^{8d}	8,30×10 ⁸ ±1,73×10 ^{7d}
	0,3	8,17×10 ⁹ ±8,82×10 ^{7d}	8,27×10 ⁸ ±1,20×10 ^{7d}
4	0,5	7,17×10 ⁷ ±1,67×10 ^{6a}	7,53×10 ⁶ ±1,20×10 ^{5a}
	0,7	5,77×10 ⁷ ±8,82×10 ^{5a}	6,83×10 ⁶ ±1,76×10 ^{5a}
<i>F</i>		<i>F</i> _{Welch(16, 12, 4)} =1830,53	<i>F</i> _{Welch(16, 12, 5)} =1552,18
<i>Sig.</i>		<i>P</i> <0,001	<i>P</i> <0,001

3.4. Ảnh hưởng của thời gian lên mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae*

Thời gian lên men ảnh hưởng lớn lên sự thay đổi mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae* được chỉ ra trong bảng 4. Mật số của vi khuẩn và nấm men ở NT lên men 120h đạt cao nhất (vi khuẩn đạt 7,33×10⁹ CFU/g và của nấm men là 7,83×10⁸ CFU/g) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mật độ của chúng ở tất cả các nghiệm thức còn lại.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian lên men (CFU/g)

Thời gian	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
24h	4,72×10 ⁷ ±2,04×10 ^{7a}	7,47×10 ⁶ ±6,39×10 ^{5a}
72h	8,03×10 ⁷ ±5,90×10 ^{6a}	7,53×10 ⁷ ±5,23×10 ^{6b}
120h	7,33×10 ⁹ ±8,10×10 ^{8b}	7,83×10 ⁸ ±7,12×10 ^{7c}
168h	6,67×10 ⁷ ±9,65×10 ^{6a}	7,03×10 ⁶ ±9,53×10 ^{5a}
<i>F</i>	<i>F</i> _{Welch(3, 4)} =21,04	<i>F</i> _(5, 8) =507,05
<i>Sig.</i>	<i>P</i> =0,007	<i>P</i> <0,001

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae*

Nhiệt độ môi trường lên men ảnh hưởng lên sự thay đổi mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae* được chỉ ra trong bảng 5. Nhiệt độ thích hợp để nhân mật số của cả vi khuẩn và nấm men là 30°C. Phân tích thông kê cũng cho thấy, mật số của chúng ở nghiệm thức 30°C cao hơn ở mức có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại, ngoại trừ mật số của vi khuẩn lên men ở 30°C và 35°C không có sự khác biệt có ý nghĩa. Có thể thấy rằng cả *B. subtilis* và *S. cerevisiae* đều có thể sinh trưởng được trong một biên độ nhiệt rộng, nhưng tùy thuộc vào từng loài, từng chủng cụ thể thì chúng sẽ có các mức nhiệt độ sinh trưởng tối ưu khác nhau, điều này cũng được chỉ ra trong nhiều nghiên cứu (Salvadó và ctv, 2011; Sidorova và ctv, 2020). Trong nghiên cứu này, mức nhiệt độ 30°C sẽ được lựa chọn như mức nhiệt độ tối ưu để thực hiện lên men cho cả hai chủng vi khuẩn và nấm men của thí nghiệm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ (CFU/g)

Nhiệt độ	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
25 (°C)	7,77×10 ⁸ ±9,02×10 ⁷ ^a	7,77×10 ⁷ ±8,19×10 ⁶ ^a
30 (°C)	7,50×10 ⁹ ±8,89×10 ⁸ ^b	7,07×10 ⁸ ±1,04×10 ⁸ ^b
35 (°C)	7,83×10 ⁹ ±8,01×10 ⁸ ^b	7,70×10 ⁷ ±8,72×10 ⁶ ^a
40 (°C)	6,77×10 ⁷ ±5,24×10 ⁶ ^c	6,67×10 ⁶ ±8,41×10 ⁵ ^a
<i>F</i> _(3, 8)	425,39	39,32
<i>Sig.</i>	<i>P</i> <0,001	<i>P</i> <0,001

3.6. Ảnh hưởng của pH lên mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae*

Ảnh hưởng của pH lên mật số của *B. subtilis* và *S. cerevisiae* được trình bày ở bảng 6 cho thấy, ở giá trị pH lớn hơn 6,0 thì mật số của cả vi khuẩn và nấm men đều giảm. Ở pH 6,0, mật số vi khuẩn đạt cao nhất là 8,37×10⁹ CFU/g và nấm men 8,07×10⁸ CFU/g. Mật số của vi sinh vật ở pH 6,0 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 6). Điều này là hoàn toàn phù hợp, bởi nấm men là nhóm sinh vật ưa axit vì vậy pH tối ưu cho sự phát triển là 4-6 (Narendranath và Power, 2005), tương tự *Bacillus subtilis* cũng có khả năng phát triển tốt trên một khoảng giá trị pH rộng, mỗi chủng sẽ có giá trị pH tối ưu khác nhau (Sidorova và ctv, 2020).

Bảng 6. Ảnh hưởng của pH (CFU/g)

pH	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
5,5	8,27×10 ⁸ ±6,49×10 ⁷ ^a	7,90×10 ⁷ ±8,33×10 ⁶ ^a
6,0	8,37×10 ⁹ ±6,77×10 ⁸ ^b	8,07×10 ⁸ ±6,43×10 ⁷ ^b
6,5	1,33×10 ⁷ ±8,82×10 ⁵ ^c	6,23×10 ⁷ ±4,88×10 ⁷ ^a
7,0	1,87×10 ⁶ ±6,67×10 ⁴ ^d	1,93×10 ⁵ ±8,82×10 ³ ^a
7,5	1,43×10 ⁵ ±3,33×10 ³ ^e	1,70×10 ⁴ ±1,00×10 ³ ^a
8,0	1,00×10 ⁵ ±5,77×10 ³ ^f	1,03×10 ⁴ ±8,82×10 ² ^a
<i>F</i>	<i>F</i> _(5, 12) =5951,54	<i>F</i> _{Welch (5, 5,2)} =90,88
<i>Sig.</i>	<i>P</i> <0,001	<i>P</i> <0,001

Theo đánh giá cảm quan của nhóm nghiên cứu thì sản phẩm lên men cuối cùng kết hợp các điều kiện tối ưu như: mức độ phối trộn hỗn hợp cám bắp và cám gạo với bã com dừa ở mức 25%, bổ sung 2% ri mật đường, 3% peptone, 0,1% (NH₄)₃PO₄, pH 6,0, lên men 120h và ở điều kiện nhiệt độ lên men là 30°C có mùi thơm dễ chịu, sản phẩm sấy khô giòn mịn, đạt mật số theo tiêu chuẩn của một chế phẩm probiotic (Sah, 2000). Điều này cho thấy, có thể rằng các thành phần polysaccharitide khó phân hủy của bã com dừa đã được vi sinh vật phân giải một phần, đồng thời sản phẩm có mùi thơm, vì vậy có thể sẽ phù hợp để làm thức ăn trong chăn nuôi.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện lên men lên mật số của *Bacillus subtilis* và *Saccharomyces cerevisiae* cho thấy mức phối trộn hỗn hợp cám bắp và cám gạo (1:1) với bã com dừa ở 25% cho kết quả tốt nhất và phù hợp với chi phí sản xuất để nhân mật số của vi khuẩn và nấm men (đạt 7,23×10⁷ và 6,90×10⁶, tương ứng).

Nguồn cacbon và nitơ bổ sung cho thấy chúng giúp mật số của vi khuẩn tăng lên, hàm lượng tối ưu được chỉ ra là 2% ri mật đường, 3% Pepton và 0,1/0,3% (NH₄)₃PO₄. Đồng thời, mật số của vi khuẩn đạt cao nhất ở pH lên men là 6,0, nhiệt độ lên men 30°C và thời gian lên men là 120h.

Nhìn chung, kết hợp tất cả các điều kiện tối ưu về chất dinh dưỡng, thời gian, pH lên men và nhiệt độ môi trường phù hợp để nhân mật số của các vi sinh vật có lợi *B. subtilis* và *Saccharomyces cerevisiae*, cụ thể là mật số vi

khuẩn đạt trên 10^9 CFU/g và nấm men đạt trên 10^8 CFU/g đáp ứng yêu cầu về mật số vi sinh vật của một chế phẩm probiotic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Afangide C.S., Orukotan A.A. and Ado S.A. (2018). Proximate composition of corn bran as a potential substrate for the production of Xylanase using *Aspergillus niger*. J. Adv. Microbiol., 12: 1-4.
2. Al-Manhel A.J. and Niamah A.K. (2017). Mannan extract from *Saccharomyces cerevisiae* used as prebiotic in bio-yogurt production from buffalo milk. Int. Food Res. J., 24: 2259-64.
3. Araya M., Morelli L., Reid G., Sanders M.E. and Stanton C. (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, access on 11/9/2021: <http://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>.
4. Chatterjee J., Giri S., Maity S., Sinha A., Ranjan A. and Gupta S. (2015). Production and characterization of thermostable alkaline protease of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) from optimized solid-state fermentation. Biotechnology and applied biochemistry, 62: 709-718.
5. Clarke K.G. (2013). Microbiology. In Bioprocess Engineering. 1st Ed. Woodhead Publishing Limited. UK&USA, Pp: 7-24.
6. Clarke M.A. (2003). Syrups. In Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 2nd Ed. Academic Press. USA: 5711-17.
7. El-Naggar M.Y. (2004). Comparative study of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium*. Biotechnology, 3: 173-80.
8. Elshagabee F.M., Rokana N., Gulhane R.D., Sharma C. and Panwar H. (2017). *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. Frontiers in Microbiol., 8: 1-15
9. Geng Y., Baumann F., Song C., Zhang M., Shi Y., Kühn P., Scholten T. and He J.S. (2017). Increasing temperature reduces the coupling between available nitrogen and phosphorus in soils of Chinese grasslands. Sci. Reports, 7: 1-9.
10. Ghosh P.K., Bhattacharjee P., Mitra S. and Poddar-Sarkar M. (2014). Physicochemical and phytochemical analyses of copra and oil of *Cocos nucifera* L. Int. J. Food Sci., 2014: 1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/310852>.
11. Japlin C. and Poernomo T. (2016). Activity of Mannanase produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Conference: Pharmaceutical Technology Seminar in Surabaya Indonesia.
12. Karakurt Y., Guvercin D., Onder S., Celik C., Tosun R., Baran B. and Yasar S. (2019). Chemical, enzymatic, and antioxidant enrichments of full-fat soybean and sunflower meal by *Bacillus subtilis* (ATCC*6633TM) fermentation using a solid-state bioreactor. Turkish J. Vet. Anim. Sci., 43: 82-93.
13. Khochamit N., Siripornadulsil S., Sukon P. and Siripornadulsil W. (2015). Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. Microbiol. Res., 170: 36-50.
14. Konca Y., Kirkpinar F. and Mert S. (2009). Effects of mannan-oligosaccharides and live yeast in diets on the carcass, cut yields, meat composition and colour of finishing turkeys. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 22: 550-56.
15. Lin L., Xu F., Ge X. and Li Y. (2019). Biological treatment of organic materials for energy and nutrients production - Anaerobic digestion and composting. Adv. in Bioenergy, 4: 121-181. doi: 10.1016/bs.aibe.2019.04.002.
16. Nguyễn Đức Lượng (2002). Công nghệ vi sinh vật, NXB Đại học Quốc gia, TP. Hồ Chí Minh.
17. Maru V., Hewale S., Mantri H. and Ranade V. (2015). Partial purification and characterization of mannan oligosaccharides from cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Current Microbiol. App. Sci., 4: 705-11.
18. Mingmongkolchai S. and Panbangred W. (2017). In vitro evaluation of candidate *Bacillus* spp. for animal feed. J. General App. Microbiol., 63: 147-56.
19. Narendranath N.V. and Power R. (2005). Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. Appl. Env. Microbiol., 71: 2239-43.
20. Shah N.P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. J. Dai. Sci., 83: 894-07.
21. Salvadó Z., Arroyo-López F.N., Guillamón J.M., Salazar G., Querol A. and Barrio E. (2011). Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. App. Env. Microbiol., 77: 2292-02.
22. Sharma H.R., Chauhan G.S. and Agrawal K. (2004). Physico-chemical characteristics of rice bran processed by dry heating and extrusion cooking. Int. J. Food Properties, 7: 603-14.
23. Shasaltaneh M.D., Moosavi-Nejad Z., Gharavi S. and Fooladi J. (2013). Cane molasses as a source of precursors in the bioproduction of tryptophan by *Bacillus subtilis*. Ira. J. Microbiol., 5: 285.
24. Siciua O.A., Grosu I., Constantinescu F., Voaides C. and Cornea C.P. (2015). Enzymatic and genetic variability in *Bacillus* spp. strains with plant beneficial qualities. Agrolife Sci. J., 4: 124-31.
25. Sidorova T.M., Asaturova A.M., Homyak A.I., Zhevnova N.A., Shternshis M.V. and Tomashevich N.S. (2020). Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strains. Saudi J. Biol. Sci., 27: 1879-85.
26. Stein H.H., Casas G.A., Abelilla J.J., Liu Y. and Sulabo R.C. (2015). Nutritional value of high fiber co-products from the copra, palm kernel, and rice industries in diets fed to pigs. J. Anim. Sci. Biotechnol., 6: 1-9.
27. Stein T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol. Microbiol., 56: 845-57.
28. Suarez C. and Guevara C.A. (2018). Probiotic use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in animal feed. Res. J. Zoo., 1: 1-6.
29. Sundu B., Kumar A. and Dingle J. (2006). Response of broiler chicks fed increasing levels of copra meal and enzymes. Int. J. Poult. Sci., 5: 13-18.
30. Sundu B., Kumar A. and Dingle J.G. (2005). Growth pattern of broilers fed a physically or enzymatically treated copra meal diet. Australian Poult. Sci. Symposium, 17: 291-94.
31. Sundu B., Kumar A. and Dingle J. (2009). Feeding value of copra meal for broilers. World's Poult. Sci. J., 65: 481-92.
32. Xu X., Qiao Y., Peng Q., Gao L. and Shi B. (2017). Inhibitory effects of YCW and MOS from *Saccharomyces cerevisiae* on *Escherichia coli* and *Salmonella pullorum* adhesion to Caco-2 cells. Frontiers in Biol., 12: 370-75.