

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO BÀO TỬ CỦA *Bacillus amyloliquefaciens* P4QN 11 NHẪM SỬ DỤNG TRONG CHĂN NUÔI

Nguyễn Hải Vân¹, Phạm Tuấn Anh¹, Hà Thị Quý¹, Hồ Phú Hà^{1,*}

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là đánh giá ảnh hưởng của điều kiện và môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo bào tử của *Bacillus amyloliquefaciens* P4QN11. Chúng sau khi hoạt hoá trong môi trường Luria Bertani (LB) được chuyển sang môi trường lên men tạo bào tử Sporulation Bacillus Medium M3 (SBM) có hiệu chỉnh hàm lượng chất dinh dưỡng và chất khoáng. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy gồm pH và thời gian đến mật độ và hiệu suất tạo bào tử được đánh giá trong quá trình lên men. Nghiên cứu đã lựa chọn được điều kiện thích hợp cho việc tạo bào tử chủng *B. amyloliquefaciens* P4QN11 với hàm lượng dinh dưỡng và khoáng gấp đôi so với môi trường dinh dưỡng chuẩn, pH 5,2, thời gian tạo bào tử 48 giờ với mật độ bào tử đạt $1,94.10^{10}$ bào tử/mL, hiệu suất tạo bào tử đạt 80,29%. Maltodextrin được lựa chọn làm chất mang để sản xuất chế phẩm trong quá trình sấy phun. Chế phẩm bào tử thu nhận được có khả năng sống sót cao trong điều kiện đường tiêu hoá giả lập; giữ được các hoạt tính chức năng và ổn định khi bảo quản ở điều kiện thường. Nghiên cứu đã chứng minh được tiềm năng ứng dụng của *B. amyloliquefaciens* P4QN11 để sản xuất chế phẩm vi sinh phục vụ trong chăn nuôi.

Từ khoá: *Bacillus amyloliquefaciens*, bào tử, chăn nuôi, lên men.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong chăn nuôi, *Bacillus* được bổ sung vào thức ăn hoặc nước uống của vật nuôi để thay thế kháng sinh, cải thiện khả năng tiêu hoá, thúc đẩy tăng trưởng, tăng cường miễn dịch, cải thiện chất lượng thịt...[1]. Ngoài các tiêu chí trên, do vấn đề kháng kháng sinh và sự chuyển gen kháng kháng sinh giữa các vi khuẩn rất đáng lo ngại, nên chủng vi khuẩn có khả năng kháng thuốc được chứng minh là do thu nhận gen kháng kháng sinh thì không được sử dụng làm phụ gia cho thức ăn chăn nuôi [2]. Mật độ tế bào *Bacillus* là yếu tố chính quyết định các đặc tính chức năng của nó. Mật độ bào tử càng cao thì càng thích hợp cho chế biến công nghiệp. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về việc cải thiện số lượng bào tử của *Bacillus* bằng cách thay đổi các thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy, các chủng khác nhau yêu cầu các

thành phần môi trường nuôi cấy cụ thể của riêng chúng. Ví dụ, đối với *B. cereus*, sự hiện diện của glutamate trong môi trường thúc đẩy sự phát triển, nhưng hợp chất này lại ức chế sự phát triển của các loài *Bacillus* khác [3].

Bacillus amyloliquefaciens là vi khuẩn có khả năng sinh nội bào tử được nghiên cứu nhiều nhất cho đến nay. Quá trình hình thành bào tử *B. amyloliquefaciens* bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, pH, hoạt độ nước, nồng độ oxy, lượng axit amin và carbohydrate, hàm lượng dinh dưỡng, đặc biệt là các cation hoá trị một/hoá trị hai như Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} [4]. Trong nghiên cứu này, chủng *B. amyloliquefaciens* P4QN11 sử dụng được phân lập mới và nghiên cứu đặc tính probiotic định hướng ứng dụng trong chăn nuôi [5]. Đặc điểm ưu việt của chủng này là khả năng không nhận gen kháng kháng sinh của *E. coli* Ec457 (số liệu chưa công bố). Do vậy, việc nghiên cứu các điều kiện tạo bào tử của chủng này là rất cần thiết.

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích:
(1) Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện và môi

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội

*Email: ha.hophu@hust.edu.vn

trường nuôi cấy đến khả năng tạo bào tử của *B. amyloliquefaciens* P4QN11; (2) tạo chế phẩm có mật độ cao ($>10^{10}$ bào tử/g chế phẩm) và ổn định nhằm hướng tới sử dụng trong chăn nuôi.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng *B. amyloliquefaciens* P4QN11 có đặc tính probiotic (khả năng chịu pH thấp, chịu muối mật, sinh một số enzyme ngoại bào, kháng vi khuẩn gây bệnh, không kháng kháng sinh) được phân lập tại Phòng thí nghiệm Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội, từ mẫu phân lợn tại trang trại lợn Yên Tiên – Quảng Ninh, tọa độ lấy mẫu 21°19.41 B – 107°24.16 Đ. Chủng được bảo quản trong glycerol 10% ở nhiệt độ -20°C đến khi sử dụng.

Môi trường hoạt hoá: LB (Luria Bertani) lỏng (g/L) bao gồm: Cao nấm men 5,0; pepton 10,0; NaCl 10,0. Môi trường thạch LB bổ sung agar 20 g/L.

Môi trường lên men Sporulation Bacillus Medium M3 (SBM) lỏng (g/L) bao gồm: Glucose 1,04; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,59; KH_2PO_4 6,0; cao thịt 5,0; cao nấm men 3,0; NaCl 0,01; $Ca(NO_3)_2$ 1M, $MnCl_2$ 10mM, $FeSO_4$ 1mM.

Chất mang: Sữa gầy (UDC, Úc), Maltodextrin (Việt Nam), bột sắn (Việt Nam) được sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Quy trình tạo chế phẩm *B. amyloliquefaciens* P4QN11

Chủng sau khi hoạt hoá được tiến hành nhân giống trong môi trường LB (37°C, 120 rpm). Giống sau khi nuôi 12 giờ được đo mật độ quang ở bước sóng 600 nm để cấy vào bình lên men, với lượng tiếp giống 3%, sao cho OD ban đầu đạt 0,1 (tương đương mật độ tế bào 10^7 CFU/ml). Sau đó bình lên men được đem đi nuôi ở tủ 37°C, 120 rpm trong 48 giờ. Kết thúc quá trình lên men, dịch được đem đi gia nhiệt 80°C trong 15 phút rồi đem đi ly tâm ở chế độ 8.000 rpm trong 10 phút ở 4°C thu phần sinh khối. Rửa và hoà tan phần sinh khối thu được bằng dung dịch NaCl 0,85% vô trùng; sau đó phối trộn với chất mang theo tỉ lệ 10% w/v. Thực hiện sấy phun dịch bào tử ở chế độ: Nhiệt độ đầu vào

130°C; nhiệt độ đầu ra 80°C; tốc độ bơm hút khí 100% ~ 38 m³/giờ; tốc độ kim phun 3 ml/phút bằng thiết bị sấy phun Buchi B290 (Thụy Sĩ) [6, 7]. Chế phẩm được bảo quản ở điều kiện thường để đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo bào tử của *B. amyloliquefaciens* P4QN11

Chủng sau khi hoạt hoá được tiến hành lên men như đã trình bày ở mục 2.2.1. Các điều kiện nuôi cấy lần lượt được khảo sát trong nghiên cứu gồm:

Môi trường lên men: M3, 2M3 (môi trường gấp 2 hàm lượng dinh dưỡng so với môi trường M3), 2,5M3 (môi trường gấp 2,5 hàm lượng dinh dưỡng so với môi trường M3), 3M3 (môi trường gấp 3 hàm lượng dinh dưỡng so với môi trường M3).

pH môi trường lên men: pH 5,2 và pH 7.

Hàm lượng KH_2PO_4 : 12 g/L, 6 g/L và 3 g/L.

Vi khuẩn được nuôi lactic ở 37°C, 120 rpm trong 48 giờ. Trong quá trình lên men độ đục huyền phù (OD 600 nm), hàm lượng đường sót [8] và khả năng hình thành bào tử [9] được theo dõi.

Mật độ tế bào được xác định bằng phương pháp pha loãng và đếm trên đĩa thạch. Để xác định mật độ bào tử, mẫu được gia nhiệt 80°C trong 15 phút để tiêu diệt tế bào sinh dưỡng. Hiệu suất tạo bào tử (%) được xác định bằng phương pháp đếm trên đĩa thạch và được tính theo công thức:

$$H = \frac{\text{Mật độ bào tử} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right)}{\text{Mật độ tế bào} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right)} \times 100\%$$

Điều kiện mà tại đó cho mật độ và hiệu suất tạo bào tử lớn nhất được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

2.2.3. Ảnh hưởng của chất mang đến tỉ lệ sống sót của bào tử trong quá trình sấy phun

Sau khi lên men, thu hồi và xử lý sinh khối như đã trình bày ở mục 2.2.1, các loại chất mang bao gồm sữa gầy, maltodextrin, hỗn hợp Maltodextrin + bột sắn tỉ lệ 1: 1 được bổ sung vào

dịch bào tử với tỉ lệ 10% (w/v) và đem đi sấy phun. Chế phẩm thu được đem đi xác định độ ẩm. Tỷ lệ sống sót sau sấy phun được tính bằng lượng bào tử sau sấy/lượng bào tử trước sấy (quy về CFU/g chất khô).

2.2.4. Phương pháp đánh giá chất lượng chế phẩm

Chế phẩm có mật độ bào tử lớn nhất được đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào (protease, amylase, cellulase) theo phương pháp của Latorre và cs (2016) dựa trên giá trị hoạt động

tương đối của enzyme REA (Relative Enzyme Activity) [10]. Chúng được gọi là có khả năng sinh enzyme tốt nếu REA >2,0 - 5,0 và sinh enzyme kém nếu giá trị REA <2,0 [10]. Khả năng sống sót trong điều kiện đường tiêu hoá giả lập của bào tử trong chế phẩm cũng được đánh giá [11]. Trong thời gian bảo quản, định kỳ lấy mẫu chế phẩm để xác định tỷ lệ sống sót bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch. Tỷ lệ sống sót được xác định theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống sót (\%)} = \frac{\log_{10} (\text{Mật độ vi khuẩn sau bảo quản } (\frac{\text{CFU}}{\text{g}}))}{\log_{10} (\text{Mật độ vi khuẩn ban đầu } (\frac{\text{CFU}}{\text{g}}))} \times 100\%$$

Các thí nghiệm được tiến hành ít nhất 3 lần để lấy giá trị trung bình.

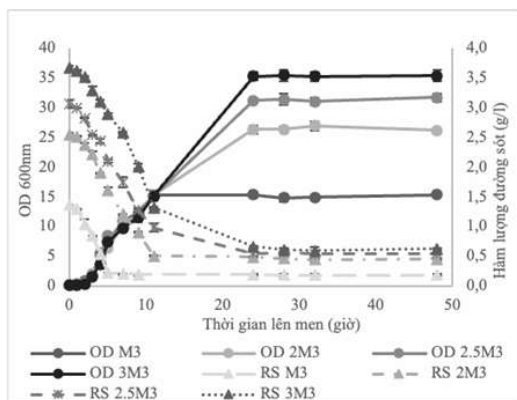
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS18, phân tích phương sai (ANOVA) để so sánh sự khác biệt giá trị trung bình.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy tới khả năng tạo bào tử của *B. amyloliquefaciens* P4QN11

3.1.1. Ảnh hưởng của môi trường



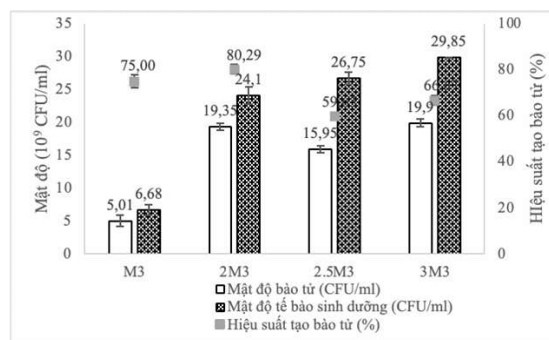
Hình 1. Độ đục và hàm lượng đường sót dịch lên men *B. amyloliquefaciens* P4QN11 ở các môi trường khác nhau theo thời gian

Trong điều kiện môi trường thiếu dinh dưỡng, *Bacillus* ngừng phát triển và một tế bào sinh dưỡng chỉ có khả năng sinh một nội bào tử. Với mục đích tạo chế phẩm bào tử với mật độ thấp

nhất là 10^{10} bào tử/g chế phẩm, nghiên cứu tiến hành lên men chủng *B. amyloliquefaciens* P4QN11 trên môi trường có hàm lượng dinh dưỡng khác nhau nhằm đánh giá ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tạo sinh khối của *Bacillus* sp.. Sinh khối tạo ra càng lớn, khả năng thu lượng lớn bào tử càng cao. Các kết quả về ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tạo bào tử của chủng *B. amyloliquefaciens* P4QN11 được thể hiện ở hình 1 và 2.

Kết quả ở hình 1 cho thấy, khi tăng nồng độ thành phần dinh dưỡng thì sinh khối của vi khuẩn tăng lên và thời gian tiêu thụ đường cũng tăng. Cụ thể, khi tăng hàm lượng lên gấp 2; 2,5; 3 lần thì sinh khối tương ứng tăng 1,77 lần, 2,1 lần, 2,4 lần. Môi trường lên men tạo bào tử trong nghiên cứu này sử dụng chủ yếu nguồn nitơ hữu cơ được chứng minh có tác dụng nâng cao hiệu suất của quá trình tạo bào tử [12]. Đồng thời, hàm lượng đường sót của dịch lên men trong các môi trường lên men khác nhau là khác nhau. Với môi trường M3, chủng dùng hết đường trong thời gian ngắn nhất là 5 giờ tính từ khi bắt đầu lên men. Trong khi đó, tại thời điểm 11 giờ thì môi trường 2M3 đã hết đường, môi trường 2,5M3 và 3M3 có hàm lượng đường sót tương ứng là 0,98 g/l và 1,31 g/l. Hàm lượng glucose dư thừa trong môi trường lên men sẽ ức chế quá trình tạo bào tử bằng cách kìm hãm quá trình phiên mã của gen *spo0A* [12]. Tại thời điểm 24 giờ, tất cả môi trường đều đã được dùng hết đường.

Khi xác định được chủng đã dùng hết đường trong môi trường, tiến hành nhuộm bào tử bằng phương pháp nhuộm kép để đánh giá quá trình hình thành bào tử ở các môi trường khác nhau, từ đó xác định thời điểm dùng lên men để thu bào tử. Ở thời điểm 24 giờ, ở môi trường M3 và 2M3 đã bắt đầu hình thành bào tử. Tuy nhiên, môi trường 2,5M3 và 3M3 phải đến 28 giờ mới xuất hiện bào tử. Ở thời điểm 32 giờ, trên kính trường của các môi trường khác nhau đều thấy lượng bào tử hình thành đã chiếm đa số. Đến 48 giờ ở tất cả môi trường bào tử đã hình thành hoàn toàn, trên kính trường không còn tế bào sinh dưỡng. Lúc này nghiên cứu kết thúc quá trình lên men, thu dịch lên men và thực hiện các bước tiếp theo để xác định mật độ cũng như hiệu suất tạo bào tử.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ môi trường đến mật độ và hiệu suất tạo bào tử sau 48 giờ lên men

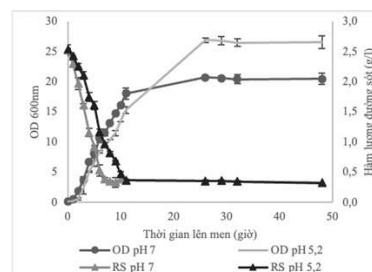
Kết quả mật độ và hiệu suất tạo bào tử của các môi trường được thể hiện ở hình 2. Khi tăng hàm lượng dinh dưỡng mật độ tế bào sinh dưỡng tăng lên đáng kể, do vậy mật độ bào tử cũng tăng. Tuy nhiên, hiệu suất tạo bào tử không tăng lên theo tỷ lệ tăng của hàm lượng chất dinh dưỡng. Khi tăng gấp đôi hàm lượng dinh dưỡng cả mật độ bào tử và tế bào sinh dưỡng đều tăng lên kể cả hiệu suất tạo bào tử cũng tăng từ 75% lên 80,29%. Kết quả thu được ở nghiên cứu này cao hơn so với các nghiên cứu trước [12]. Nhưng khi gấp 2,5 và 3 lần hàm lượng dinh dưỡng thì hiệu suất tạo bào tử giảm xuống còn 59,63% và 66,67%. Điều này có thể giải thích do khi dư thừa dinh dưỡng *Bacillus* có xu hướng hình thành nhiều tế bào sinh dưỡng hơn quá trình tạo bào tử. Khi môi trường lên men sử dụng nguồn dinh dưỡng khó tiêu hóa và hấp thụ,

hoặc thiếu dinh dưỡng sẽ dẫn đến sự hình thành nhiều bào tử hơn [12].

Như vậy, hàm lượng dinh dưỡng của môi trường ảnh hưởng đến hiệu suất chuyển hoá bào tử và mật độ bào tử thu được. Dựa trên các kết quả thu được, nghiên cứu lựa chọn môi trường 2M3 để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.2. Ảnh hưởng của pH môi trường

Thí nghiệm đã lên men *B. amyloliquefaciens* P4QN11 ở môi trường 2M3 có pH = 5,2 (pH của môi trường không hiệu chỉnh) và pH = 7 (môi trường có hiệu chỉnh) để đánh giá hiệu quả hình thành bào tử ở điều kiện pH môi trường khác nhau. Kết quả đo OD 600 nm và hàm lượng đường sót được thể hiện ở hình 3.

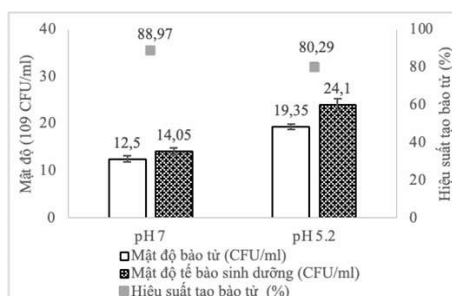


Hình 3. Độ đục và hàm lượng đường sót dịch lên men *B. amyloliquefaciens* P4QN11 ở các pH môi trường khác nhau theo thời gian

Kết quả ở hình 3 cho thấy, môi trường có pH 5,2 quá trình lên men tạo ra sinh khối gấp 1,3 lần so với pH 7. Đồng thời, tại pH 7 chúng có tốc độ tiêu thụ đường nhanh hơn (7 giờ) ở môi trường pH 5,2 (11 giờ). Ở thời điểm 24 giờ, tỉ lệ tế bào sinh dưỡng trong môi trường pH 5,2 cao hơn pH 7, chúng tỏ tại môi trường pH 7 có khả năng bào tử hình thành sớm hơn. Đến thời điểm 48 giờ, toàn bộ tế bào sinh dưỡng đã chuyển hết thành bào tử.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, mật độ tế bào sinh dưỡng và mật độ bào tử khi lên men trong môi trường với pH 5,2 cũng cao hơn khi lên men trong môi trường với pH 7. Cụ thể, mật độ tế bào sinh dưỡng và bào tử ở môi trường pH 7 là $1,41 \cdot 10^{10}$ và $1,25 \cdot 10^{10}$ CFU/mL, hiệu suất tạo bào tử đạt 88,97%. Trong khi đó, môi trường pH 5,2 cho mật độ tế bào sinh dưỡng ($1,94 \cdot 10^{10}$ CFU/mL) và bào tử ($2,41 \cdot 10^{10}$ CFU/mL) cao hơn, nhưng hiệu suất

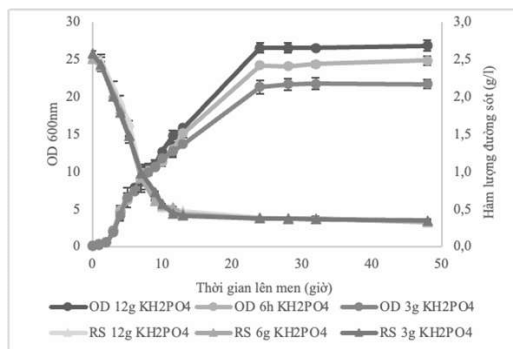
tạo bào tử thấp hơn (80,29%) so với môi trường pH 7 (Hình 4).



Hình 4. Ảnh hưởng của pH môi trường đến mật độ và hiệu suất tạo bào tử sau 48 giờ lên men

Các kết quả của nghiên cứu này có sự khác biệt so với các nghiên cứu trước đây. Theo Li và cs (2019), Ma và cs (2022), pH 7 là pH môi trường cho mật độ và hiệu suất tạo bào tử cao nhất của *B. amyloliquefaciens* [13, 14] trong khoảng pH khảo sát. Mật độ bào tử tối đa không bị ảnh hưởng mạnh mẽ bởi pH và nhiệt độ [15]. Với mong muốn thu mật độ bào tử cao nên nghiên cứu tiến hành lựa chọn môi trường pH 5,2 để đánh giá yếu tố ảnh hưởng tiếp theo.

3.1.3. Ảnh hưởng của KH_2PO_4

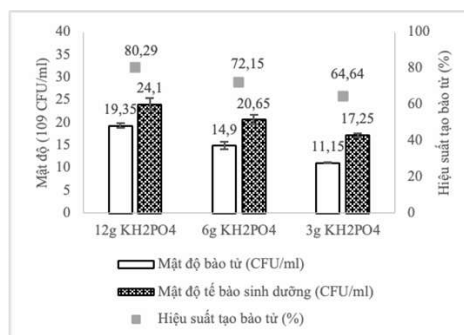


Hình 5. Độ đục và hàm lượng đường sót dịch lên men *B. amyloliquefaciens* P4QN11 ở các nồng độ KH_2PO_4 khác nhau theo thời gian

KH_2PO_4 cung cấp nguồn phospho và kali cho chúng trong quá trình lên men. Với mong muốn khảo sát ảnh hưởng của nồng độ khoáng đến hiệu suất tạo bào tử, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát điều chỉnh hàm lượng KH_2PO_4 trong quá trình lên men tạo bào tử của *B. amyloliquefaciens* P4QN11. Ảnh hưởng KH_2PO_4 đến sự tạo thành bào tử của *B. amyloliquefaciens* P4QN11 được thể hiện ở hình 5 và 6.

Kết quả ở hình 5 cho thấy, khi sử dụng KH_2PO_4 ở nồng độ 12 g/l thu được sinh khối lớn nhất và ngược lại tại nồng độ 3 g/l thu được sinh khối thấp nhất. Môi trường với nồng độ 12 g/l KH_2PO_4 hình thành bào tử sớm hơn (24 giờ), sau đó đến môi trường nồng độ 6 g/l KH_2PO_4 và 3 g/l KH_2PO_4 (28 giờ). Đồng thời, khi giảm nồng độ KH_2PO_4 thì lượng sinh khối và hiệu suất tạo bào tử cũng giảm. Nồng độ KH_2PO_4 cao nhất cho lượng sinh khối và hiệu suất tạo bào tử cao nhất (Hình 6).

Trên thực tế, trong quá trình lên men, khi sử dụng KH_2PO_4 với hàm lượng 6 g/l và 3 g/l thì dịch lên men bị nhớt. Chất nhớt này chính là axit poly- γ -glutamic (γ -PGA) đã hạn chế khả năng tiếp xúc với oxi của vi khuẩn, do đó ảnh hưởng đến sự phát triển sinh dưỡng của tế bào vi khuẩn [16]. Ion K^+ ảnh hưởng đến sự hình thành γ -PGA trong quá trình lên men, khi bổ sung K^+ sẽ làm giảm độ nhớt của môi trường [17]. Do đó, khi giảm hàm lượng K^+ ở trong khoảng nhất định sẽ khiến γ -PGA sản sinh ra nhiều hơn ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của tế bào sinh dưỡng.



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 đến mật độ và hiệu suất tạo bào tử sau 48 giờ lên men

Các kết quả thu được của nghiên cứu này cao hơn so với một số số liệu đã được công bố trước đây. Môi trường lên men lỏng "J" bổ sung hỗn hợp muối 0,315 g/l, với điều kiện lên men là 28°C, 120 rpm, thời gian lên men 66 giờ cho mật độ bào tử *B. amyloliquefaciens* Bs006 đạt 1.05×10^{10} bào tử/ml, với hiệu suất tạo bào tử là 88,7% [18]. Theo Li và cs (2019), ở điều kiện tối ưu: Tuổi chủng 12 giờ, pH ban đầu 7, nuôi cấy trong 48 giờ với 240 rpm ở 37°C *Bacillus* spp. cho năng suất bào tử đạt $1,41 \times 10^{10}$ CFU/ml, tỷ lệ hình thành bào tử trên 90% [13].

Như vậy, nghiên cứu đã lựa chọn được các thông số của quá trình lên men như sau: Môi trường lên men 2M3, pH = 5,2; KH₂PO₄ 12 g/l; nuôi ở nhiệt độ 37°C; lắc 120 rpm trong 48 giờ thu được mật độ bào tử $1,94 \times 10^{10}$ CFU/ml với hiệu suất tạo bào tử là 80,29%.

3.2. Ảnh hưởng của chất mang đến tỉ lệ sống sót của bào tử trong quá trình sấy phun

Sau quá trình lên men, dịch lên men được xử lý nhiệt, ly tâm và bào tử thu được trải qua quá

trình rửa như đã trình bày ở mục 2.2.1. Bào tử thu hồi được được hoà tan lại trong nước muối sinh lý 0,85% và tiến hành trộn với các chất mang khác nhau để đánh giá hiệu quả bảo vệ của các chất mang. Cụ thể, dịch bào tử sấy phun với các loại chất mang là sữa gầy, Maltodextrin, Maltodextrin + bột sắn với tỉ lệ 10% (w/v). Các kết quả về ảnh hưởng của chất mang đến tỷ lệ sống sót của bào tử trong quá trình sấy phun được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất mang đến hiệu quả sấy phun chế phẩm

Chất mang	Mật độ bào tử trước sấy (CFU/g)	Số lượng bào tử sau sấy (CFU/g)	Độ ẩm chế phẩm (%)	Tỉ lệ sống sót của bào tử (%)
Sữa gầy	$1,53.10^{13}$	$1,43.10^{12}$	5,13	93,44
Maltodextrin	$6,20.10^{13}$	$2,05.10^{13}$	6,92	98,20
Maltodextrin + bột sắn	$1,56.10^{13}$	$1,42.10^{12}$	5,26	91,52

Chú thích: Các số liệu trên đã quy về số g chất khô

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, tỉ lệ sống sót của bào tử khi sấy phun từ 91,52 - 98,2%. Trong đó, tỉ lệ sống sót cao nhất (98,2%) khi sử dụng chất mang là maltodextrin và thấp nhất (91,52%) với mẫu sử dụng kết hợp maltodextrin và bột sắn. Do đó, chế phẩm sử dụng chất mang maltodextrin được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo. Chất mang được lựa chọn giúp vi sinh vật chịu được điều kiện khắc nghiệt của quá trình sấy phun. Protein trong sữa gầy giúp ổn định màng tế bào trong khi đó maltodextrin là nhóm carbohydrate có nhiệt độ chuyển tiếp tinh thể cao, làm tăng khả năng sống sót đến 20% so với sucrose [7]. Ngoài ra, chất mang còn giúp thúc đẩy sự phát triển và tồn tại của lợi khuẩn trong đường tiêu hoá... Khi sấy phun *B. amyloliquefaciens* LFB112 với chất mang là maltodextrin cho mật độ bào tử đạt 10^{11} CFU/g và cải thiện đáng kể chỉ tiêu tăng trưởng và miễn dịch trên gà [19]. Các chế phẩm thu được đều có dạng bột mịn, màu trắng đục ngả nâu và có các đặc tính vật lý giống với các chế phẩm trên thị trường.

3.3. Đánh giá đặc tính và độ ổn định của chế phẩm probiotic dạng bào tử

Nhằm kiểm tra các đặc tính chức năng của chủng nghiên cứu có được giữ lại sau khi sản xuất chế phẩm hay không, khả năng sinh enzyme và khả năng sống sót trong điều kiện đường ruột giả

lập của chế phẩm sử dụng chất mang maltodextrin được đánh giá lại.

3.3.1. Khả năng sinh enzyme của chế phẩm

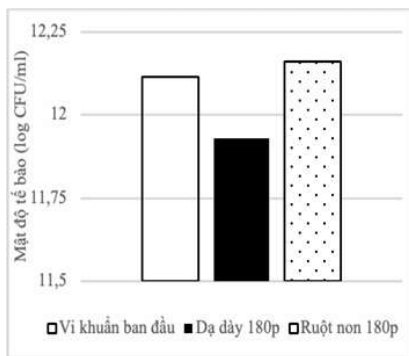
Các enzyme ngoại bào đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giúp động vật dễ hấp thu chất dinh dưỡng và tăng trọng tốt. Do đó, khả năng sinh enzyme là một tiêu chí quan trọng đối với chế phẩm probiotic. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, chế phẩm có khả năng sinh cả ba enzyme hỗ trợ tiêu hoá. Dựa theo giá trị REA, chúng có khả năng sinh enzyme protease và enzyme cellulase ở mức tốt và sinh enzyme amylase ở mức kém. Nghiên cứu của Nguyen và cs (2022) đã đánh giá khả năng sinh enzyme tiêu hoá của tế bào sinh dưỡng chủng *B. amyloliquefaciens* P4QN11 trước đó, giá trị REA đối với khả năng sinh enzyme amylase, protease và cellulase lần lượt là 1,5; 1,7; 1,7 [5]. Qua đó cho thấy, chế phẩm bào tử *B. amyloliquefaciens* P4QN11 đã nảy mầm thành tế bào sinh dưỡng và vẫn giữ được các hoạt tính chứng năng (sinh enzyme tiêu hoá) của chúng.

Bảng 2. Khả năng sinh enzyme (REA) của chế phẩm

Amylase	Protease	Cellulase
$1,84 \pm 0,15$	$2,22 \pm 0,34$	$2,01 \pm 0,09$

3.3.2. Khả năng sống sót trong điều kiện đường ruột giả lập của chế phẩm

Khả năng sống sót và nảy mầm trong điều kiện đường ruột của chế phẩm bào tử *B. amyloliquefaciens* P4QN11 được thể hiện ở hình 7. pH thấp của dạ dày cùng khả năng kháng khuẩn của pepsin được coi là hàng rào bảo vệ đường tiêu hoá với các vi khuẩn gây bệnh. Trong điều kiện dạ dày giả lập, khả năng sống sót giảm dần theo thời gian, mật độ ban đầu của là 12,11 log CFU/ml, sau 180 phút mật độ giảm còn 11,93 log CFU/ml, tỉ lệ sống sót đạt 98,48%. Điều này đã chứng tỏ bào tử trong chế phẩm rất ít bị tác động bởi pepsin. Môi trường ruột non chứa pancreatine và muối mật là các yếu tố ức chế sinh trưởng của vi sinh vật. Khi chuyển sang điều kiện ruột non mô phỏng, sau 180 phút lượng tế bào tăng lên, thậm chí còn cao hơn mật độ ban đầu, mật độ đạt 12,16 log CFU/ml. Kết quả này cho thấy, không những bào tử có khả năng chịu pancreatine và muối mật mà còn có khả năng nảy mầm và sinh trưởng trong môi trường ruột non.



Hình 7. Khả năng sống sót trong điều kiện đường ruột giả lập của chế phẩm

Kết quả thu được phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Sự tồn tại của bào tử *B. amyloliquefaciens* VJ-1 trong điều kiện pH dạ dày tăng từ 8,46 - 8,93 log CFU/ml. Khi chuyển sang điều kiện muối mật, lượng tế bào giảm nhẹ từ 8,42 - 7,69 log CFU/ml [20]. Trong một nghiên cứu khác, không có sự thay đổi đáng kể nào được ghi nhận của bào tử *B. clausii* UBBC07 khi đi qua dạ dày (0 giờ: 7,47 log CFU/ml; 2 giờ: 7,14 log CFU/ml) và tăng đáng kể trong điều kiện ruột non (1 giờ: 8,35 log CFU/ml; 2 giờ: 8,77 log CFU/ml; 3 giờ: 9,02 log CFU/ml) [21].

3.3.3. Khả năng sống sót của chế phẩm trong thời gian bảo quản

Bảo quản là một khía cạnh quan trọng của chế phẩm probiotic trước khi chúng được sử dụng, bởi điều kiện bảo quản ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng hoạt động của chế phẩm. Các yếu tố như nhiệt độ, hoạt độ nước, hàm lượng oxy... đều quan trọng trong quá trình bảo quản [1]. Chế phẩm *B. amyloliquefaciens* P4QN11 được bảo quản ở điều kiện thường và được kiểm tra khả năng sống sót của bào tử sau các mốc thời gian được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Khả năng sống sót trong thời gian bảo quản của chế phẩm

Thời gian bảo quản	Mật độ vi sinh vật (log CFU/g)	Tỉ lệ sống sót (%)
Sau sấy	13,35	100
1 tháng	13,34	99,94
2 tháng	13,31	99,70
3 tháng	13,24	99,17

Kết quả cho thấy, qua khoảng thời gian bảo quản, mật độ bào tử thay đổi không đáng kể, tỉ lệ sống sót đạt 99,17% sau 3 tháng bảo quản. Như vậy, chế phẩm bào tử *B. amyloliquefaciens* P4QN11 hoàn toàn phù hợp bảo quản ở điều kiện thường.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã lựa chọn được điều kiện tạo bào tử và hiệu suất thu hồi bào tử cao nhất đối với vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* P4QN11. Chúng *B. amyloliquefaciens* P4QN11 lên men trong môi trường 2M3, pH = 5,2, KH₂PO₄ 12 g/l, ở nhiệt độ 37°C, 120 rpm trong 48 giờ cho mật độ bào tử $1,94 \times 10^{10}$ CFU/ml với hiệu suất tạo bào tử là 80,29%. Chế phẩm bào tử sấy phun với chất mang là maltodextrin có khả năng sống sót cao trong điều kiện tiêu hoá giả lập (100%) và giữ được các hoạt tính chức năng. Trong điều kiện bảo quản ở điều kiện thường, chế phẩm có khả năng duy trì tỷ lệ sống sót lên đến 99,17% sau 3 tháng bảo quản. Các kết quả nghiên cứu chứng minh tiềm năng ứng dụng của chủng *B. amyloliquefaciens* P4QN11 trong chăn nuôi, góp phần vào sự phát triển bền vững của ngành nông nghiệp Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Khoa học và Công nghệ (đề tài mã số ĐTĐL.CN-71/19).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wang G., Chen Y., Xia Y., Song X., Ai L. J. F. (2022). Characteristics of probiotic preparations and their applications. *Foods*, 11 (16), 2472.
2. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10 (6), 2740.
3. Buhr T. L., McPherson D. C. & Gutting B. W. (2008). Analysis of broth-cultured *Bacillus atrophaeus* and *Bacillus cereus* spores. *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1604 -1613.
4. Bressuire-Isoard C., Broussolle V. & Carlin F. (2018) Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 42 (5), 614 – 626.
5. Nguyen H. V., Nguyen L. A., Nguyen T. M. D., Vu T. H. N., Phi Q. T., Nguyen H. A. & Ho P. H. (2022). Evaluation of antibiotic sensitivity of potential probiotic *Bacillus* strains isolated from chicken and pig feces. *Vietnam Journal of Science and Technology*. 60 (6), 948 - 957.
6. Huang S., Vignolles, M. L., Chen X. D., Le Loir Y., Jan G., Schuck P. & Jeantet R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in food Science & Technology*, 63, 1 - 17.
7. Meehae U. (2023). Spray-dried powder of *Bacillus amyloliquefaciens* strain C2-1 for control of rice diseases. *Journal of Science and Agricultural Technology*, 4 (1), 14 - 19.
8. Miller G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
9. Schaeffer A. B. & Fulton M. (1990). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77, 194 - 194.
10. Latorre J. D., Hernandez-Velasco X., Wolfenden R. E., Vicente J. L., Wolfenden A. D., Menconi A., Bielke L. R., Hargis B. M. & Tellez G. (2016). Evaluation and selection of *Bacillus* species based on enzyme production, antimicrobial activity, and biofilm synthesis as direct-fed microbial candidates for poultry. *Frontiers in veterinary science*, 3, 95.
11. Chu-Ky S., Bui K. T., Tien-Long Nguyen T. L. & Ho P. H. (2014). Acid adaptation to improve viability and X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus fermentum* HA6 exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 565 – 570.
12. Tian Z., Hou L., Hu M., Gao Y., Li D., Fan B., Wang F. & Li S. (2022). Optimization of Sporulation Conditions for *Bacillus subtilis* BSNK-5. *Processes*. 10(6), 1133.
13. Li Y., Xu Y., Li W., Yang Y., Wang L., Yu J., Wang C. & Li X. (2019). Study on Optimizing Nutrition and Fermentation Conditions for Compound *Bacillus* spp.. *American Journal of Molecular Biology*, 9(2), 75-84.
14. Ma T., Yang C., Cai F., Cui L. & Wang Y. (2022). Optimizing fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens* 3-5 and determining disease suppression and growth in cucumber (*Cucumis sativus*). *Biological Control*, 176, 105070.
15. Gauvry E., Mathot A. G., Couvert O., Leguérinel I. & Coroller L. (2021). Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108915.
16. Cristiano-Fajardo S. A., Flores C., Flores N., Tinoco-Valencia R., Serrano-Carreón L. & Galindo E. (2019). Glucose limitation and glucose uptake rate determines metabolite production and sporulation in high cell density continuous cultures of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Biotechnology*, 299, 57 - 65.
17. Zeng W., Liang Z., Li Z., Bian Y., Li Z., Tang Z. & Chen G. (2016). Regulation of poly-γ-

- glutamic acid production in *Bacillus subtilis* GXA-28 by potassium. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 83 - 89.
18. Díaz-García A., García-Riaño J. & Zapata-Narvaez, J. (2015). Improvement of sporulation conditions of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* in liquid fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6 (04), 302 - 310.
19. Ahmat M., Cheng J., Abbas Z., Cheng Q., Fan Z., Ahmad B., Hou M., Osman G., Guo H., Wang J. & Zhang R. (2021). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* LFB112 on growth performance, carcass traits, immune, and serum biochemical response in broiler chickens. *Antibiotics*, 10 (11), 1427.
20. Kadaikunnan S., Rejiniemon T. S., Khaled J. M., Alharbi N. S. & Mothana, R. (2015). In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14 (1), 1 - 11.
21. Ahire J. J., Kashikar M. S & Madempudi R. S. (2020). Survival and germination of *Bacillus clausii* UBBC07 spores in in vitro human gastrointestinal tract simulation model and evaluation of clausin production. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1010.

EFFECT OF NUTRITION AND FERMENTATION CONDITIONS ON SPORULATION OF *Bacillus amyloliquefaciens* P4QN11 FOR LIVESTOCK PRODUCTION

Nguyen Hai Van¹, Pham Tuan Anh¹, Ha Thi Quy¹, Ho Phu Ha¹

¹*School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi Univeristy of Science and Technology*

Summary

In recent years, *Bacillus* sp. species are widely used as a preparation in livestock production due to their spore-forming ability. To reduce the cost of preparation, high spore density is one of the decisive factors after fermentation. The purpose of this study was to evaluate the influence of nutrition and fermentation conditions on the sporulation of *Bacillus amyloliquefaciens* P4QN11. After being activated in Luria Bertani (LB), the strain was fermented in Sporulation Bacillus Medium M3 (SBM) with the modification of nutrient and mineral content. The effects of fermentation conditions including pH and time on spore density and sporulation rate were evaluated during fermentation. The suitable conditions for spore formation of *B. amyloliquefaciens* P4QN11 were: medium with twice the nutrient and mineral content compared to standard medium, pH 5.2 and fermentation time 48h. The spore yield reached $1.94 \cdot 10^{10}$ spores/mL and sporulation rate was 80.29%. Maltodextrin was selected as a carrier of preparation during spray drying process. The obtained preparation had high viability in simulated digestive conditions; retained functional activities and stable at room temperature storage. Research has demonstrated the potential application of *B. amyloliquefaciens* P4QN11 to produce preparation for livestock production.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, endospore, livestock production, fermentation.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Giang

Ngày nhận bài: 5/5/2023

Ngày thông qua phản biện: 28/5/2023

Ngày duyệt đăng: 13/9/2023