

Tuyển chọn vi khuẩn acetic chịu nhiệt ứng dụng trong lên men acid acetic

Huỳnh Xuân Phong¹, Nguyễn Mỹ Vi¹, Nguyễn Ngọc Thanh¹, Bùi Hoàng Đăng Long¹, Toshiharu Yakushi², Kazunobu Matsushita², Ngô Thị Phương Dung^{1*}

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Nông nghiệp, Đại học Yamaguchi, Yamaguchi, Nhật Bản

Ngày nhận bài 18/7/2017; ngày chuyển phân biên 21/7/2017; ngày nhận phân biên 22/8/2017; ngày chấp nhận đăng 28/8/2017

Tóm tắt:

Acid acetic là một acid hữu cơ quan trọng được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp, đặc biệt là công nghiệp chế biến thực phẩm. Nghiên cứu nhằm mục đích tuyển chọn và định danh các chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt và xác định các điều kiện lên men acid acetic. Kết quả khảo sát khả năng lên men trong môi trường YPGD bổ sung 4% (v/v) ethanol của 20 chủng vi khuẩn acetic ở 37°C đã tuyển chọn được 9 chủng vi khuẩn acetic với hàm lượng acid acetic sinh ra trong khoảng 1,72-2,04% (w/v). Chủng vi khuẩn acetic A18 có khả năng lên men mạnh nhất ở 39°C với hàm lượng acid acetic đạt 2,56% (w/v) và được tuyển chọn thử nghiệm các điều kiện lên men bao gồm hàm lượng ethanol bổ sung, pH và giống chủng ban đầu. Chín chủng vi khuẩn thuộc chi *Acetobacter*, bao gồm *A. pasteurianus*, *A. tropicalis*, *A. orientalis* và *A. sicerae*. Kết quả khảo sát điều kiện lên men acid acetic của chủng *A. sicerae* A18 ở 39°C cho thấy điều kiện lên men acid acetic thích hợp khi môi trường YPGD có ethanol được bổ sung ở nồng độ 4,32%, pH 4,0 và số lượng tế bào giống vi khuẩn là 10^5 tế bào/ml, hàm lượng acid acetic đạt 2,61% (w/v).

Từ khóa: *Acetobacter*, acid acetic, lên men acid acetic, vi khuẩn acetic chịu nhiệt.

Chỉ số phân loại: 2.8

Đặt vấn đề

Hiện nay, acid acetic là một trong những loại acid hữu cơ quan trọng được ứng dụng rộng rãi trong đời sống cũng như trong sản xuất công nghiệp, đặc biệt là công nghiệp thực phẩm và công nghiệp chế biến mủ cao su. Acid acetic có thể được chế biến từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau như mật ri, nước hoa quả chín, tinh bột, cồn... và được ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm như giấm, sorbose, dihydroxyacetone, gluconate, keto-D-gluconates... [1]. Ngoài ra, acid acetic còn được dùng trong sản xuất chất màu, chất thơm, dung môi hữu cơ, trong tổng hợp chất dẻo, tơ sợi... Việt Nam là một nước thuộc khu vực nhiệt đới nên rất dồi dào về các nguồn nguyên liệu có thể ứng dụng trong sản xuất acid acetic. Ở nước ta, acid acetic dùng để làm thực phẩm trong gia đình thường được lên men một cách tự nhiên không sử dụng vi khuẩn acetic thuần chủng và ở quy mô hộ gia đình. Vi khuẩn acetic thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm hiếu khí bắt buộc, với khả năng oxy hóa ethanol thành acid acetic cho phép chúng có thể sinh trưởng ở các môi trường có chứa ethanol [2]. Vi khuẩn acetic thuộc họ Acetobacteraceae và được phân loại thành 10 giống: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*,

Asaia, *Kozakia*, *Swaminathanian*, *Saccharibacter*, *Neoasaia* và *Granulibacter* [3-5]. Trong đó *Acetobacter* và *Gluconobacter* được sử dụng lên men acid acetic phổ biến nhất vì chúng có khả năng oxy hóa ethanol tạo acid acetic với nồng độ cao.

Bản chất của quá trình lên men acetic là sự chuyển hóa ethanol thành acid acetic được thực hiện bởi vi khuẩn acetic và có sinh nhiệt, do vậy trong quá trình sản xuất acid acetic bằng phương pháp lên men luôn phải thực hiện quá trình làm lạnh để duy trì nhiệt độ tối ưu. Công đoạn này sẽ tiêu tốn nhiều năng lượng, do vậy cần tuyển chọn chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt có khả năng sinh acid cao ở điều kiện nhiệt độ cao sẽ giảm được chi phí để làm mát hệ thống lên men. Ngoài ra, quá trình lên men ở nhiệt độ cao sẽ giúp cho quá trình lên men diễn ra nhanh hơn cũng như hạn chế khả năng nhiễm vi khuẩn không mong muốn. Hơn nữa, việc gia tăng nhiệt độ toàn cầu dẫn đến một số thách thức nghiêm trọng trong việc lên men với quy mô công nghiệp vì những hệ thống làm lạnh lớn tiêu tốn quá nhiều năng lượng để giữ ở nhiệt độ tối ưu. Nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men acid acetic trong khoảng 30°C và quá trình lên men này luôn được giữ ổn định để đảm bảo quá trình lên men tối ưu. Nhiệt độ gia tăng thêm chỉ khoảng 2-3°C cũng là nguyên nhân gây bất lợi không chỉ cho mức độ lên men mà còn ảnh hưởng

*Tác giả liên hệ: ntpdung@ctu.edu.vn

The selection of thermotolerant acetic acid bacteria and their applications for acetic acid fermentation

Xuan Phong Huynh¹, My Vi Nguyen¹,
Ngoc Thanh Nguyen¹, Hoang Dang Long Bui¹,
Toshiharu Yakushi², Kazunobu Matsushita²,
Thi Phuong Dung Ngo^{1*}

¹Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University, Vietnam

²Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan

Received 18 July 2017; accepted 28 August 2017

Abstract:

Acetic acid is an important organic acid used in many industries, especially in food processing. The objectives of this study were to select the thermotolerant acetic acid bacteria having the high acid producing capacity and to study the fermentation conditions for acetic acid production at high temperature. In this study, nine thermotolerant acetic acid bacterial isolates were selected from 20 strains based on their high acetic acid production ranging from 1.72% to 2.04% (w/v) at 37°C. These strains were dominated by representatives from the *Acetobacter* genus including *A. pasteurianus*, *A. tropicalis*, *A. orientalis*, and *A. sicerae*. Strain A18 was determined as the most effectively fermentative bacterial strain at 39°C with the acetic acid production of 2.56% (w/v) and productivity of 62.19%. The favorable conditions for acetic acid fermentation by the selected target strain *Acetobacter sicerae* A18 were determined at the pH of 4.0, the ethanol concentration of 4.32% (v/v), and the starter density of 10⁵ cells/ml. The total acid content of 2.61% (w/v) was achieved after 6 days of fermentation at 39°C.

Keywords: *Acetic acid, acetic acid fermentation, acetobacter, thermotolerant acetic acid bacteria.*

Classification number: 2.8

đến hiệu quả lên men [6]. Do đó, việc nghiên cứu để tìm ra các chủng vi khuẩn có đặc tính chịu nhiệt và lên men tốt từ các nguồn nguyên liệu có triển vọng như ca cao lên men, men rượu, trái cây, giấm, rau quả,... để từ đó có định hướng ứng dụng vào sản xuất ở quy mô lớn đạt được năng suất và hiệu quả kinh tế là rất có ý nghĩa ở nước ta hiện nay và trong tương lai. Nghiên cứu nhằm tuyển chọn, định danh một số chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt triển vọng và thử nghiệm điều kiện lên men acid acetic ở nhiệt độ cao.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu và hóa chất

- Hai mươi chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt (phân lập từ giấm, men rượu và các sản phẩm lên men acid acetic) được tuyển chọn và lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học. Chủng đối chứng *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 (Đại học Yamaguchi, Nhật Bản).

- Các hóa chất khác: yeast extract, peptone, glycerol, D-glucose, agar, CaCO₃, ethanol, phenolphthalein, NaOH... được mua từ Merck (Đức) và HiMedia Laboratories (Ấn Độ).

- Môi trường YPGD (yeast extract 5 g/l, peptone 5 g/l, glycerol 5 g/l, D-glucose 5 g/l) và môi trường PM (5 g/l D-glucose, 20 g/l glycerol, 10 g/l yeast extract, 10 g/l peptone, 10% (v/v) dịch trích khoai tây) [7].

Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá khả năng lên men của vi khuẩn acetic ở 37°C: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Các chủng vi khuẩn acetic được nuôi tăng sinh trong ống nghiệm có chứa 5 ml môi trường YPGD bổ sung 10% dịch trích khoai tây trong 48 giờ, lắc 150 vòng/phút ở 30°C, số lượng tế bào giống vi khuẩn khoảng 10⁷ tế bào/ml (tb/ml). Môi trường lên men YPGD được khử trùng ở 121°C trong 20 phút và sau đó được bổ sung 4% (v/v) ethanol. Chủng 300 µl dịch tăng sinh vi khuẩn (tương ứng 1% (v/v) giống chủng) vào 30 ml dịch lên men trong ống falcon 50 ml. Ủ lắc 150 vòng/phút ở 37°C. Hàm lượng acid trong 7 ngày lên men được xác định bằng phương pháp chuẩn độ với NaOH 0,1 N. pH được xác định bằng pH kế (Sartorius, PB-20, Đức) và hàm lượng đường được xác định bằng phương pháp DNS [8].

Đánh giá khả năng lên men của vi khuẩn acetic ở 38°C và 39°C: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên sử dụng các chủng vi khuẩn acetic được tuyển chọn từ thử nghiệm khả năng lên men ở 37°C. Thử nghiệm được thực hiện ở 2 mức nhiệt độ (38°C và 39°C), lặp lại 3 lần với thể tích lên men 30 ml. Môi trường được chuẩn bị, các bước thực hiện và chỉ tiêu theo dõi tương tự như thử nghiệm ở 37°C với các chủng vi khuẩn được

tuyển chọn. Ủ lactic 150 vòng/phút ở 38 và 39°C.

Định danh các chủng vi khuẩn acetic được tuyển chọn: Các chủng vi khuẩn acetic tuyển chọn được tách chiết DNA và định danh với cặp mồi để khuếch đại trình tự vùng bảo tồn trên 16S rDNA của nhóm α -Proteobacteria: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1525R (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3') [7]. Sản phẩm PCR được giải trình tự sử dụng hệ thống giải trình tự ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA). Dựa trên trình tự 16S rDNA để phân tích và so sánh với trình tự các chủng vi khuẩn trên ngân hàng dữ liệu NCBI. Xây dựng cây phả hệ gene 16S rDNA dựa trên phương pháp neighbor-joining, chương trình MEGA 6 với chỉ số bootstrap 1.000 lần lặp lại [9].

Khảo sát điều kiện lên men của vi khuẩn acetic chịu nhiệt được tuyển chọn: Thí nghiệm gồm 3 nhân tố: Hàm lượng ethanol, số lượng tế bào giống vi khuẩn và pH ban đầu. Chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi tăng sinh trong 5 ml môi trường PM trong 48 giờ, lactic 150 vòng/phút ở 30°C, số lượng tế bào vi khuẩn đạt 10^8 tb/ml. Môi trường YPGD được điều chỉnh pH ở 3 mức (4, 5, 6), khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Ethanol được bổ sung ở các mức (4, 5 và 6% v/v) và được chủng giống để đạt các mức độ thử nghiệm (10^4 , 10^5 và 10^6 tb/ml). Lên men ở 39°C và theo dõi các chỉ tiêu trong 7 ngày. Các điều kiện thích hợp tiếp tục được thử nghiệm để xác nhận mô hình tối ưu ở quy mô 1 lít dịch lên men.

Phương pháp phân tích thống kê: Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình Statgraphics Centurion XV ver 15.1.02 (Statpoint Technologies, Inc., USA).

Kết quả

Khả năng lên men của vi khuẩn acetic chịu nhiệt ở 37°C

Kết quả lên men trong môi trường YPGD có bổ sung 4% (v/v) ethanol trong 7 ngày ở nhiệt độ 37°C của 20 chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt và chủng vi khuẩn *A. pasteurianus* SKU1108 được thể hiện ở bảng 1. Kết quả lên men cho thấy vào ngày thứ 4, hàm lượng acid acetic tăng lên đến khoảng 1,30-1,94% (w/v) và sau đó giảm nhẹ, hàm lượng acid đạt giá trị cao nhất vào ngày lên men thứ 7 (1,36-2,04% w/v).

Ở ngày lên men thứ 7, hàm lượng acid acetic sinh ra từ các chủng trong khoảng 1,32-2,04% (w/v) và hiệu suất lên men trong khoảng 32,07-49,56%. Trong đó, 9 chủng A1, A3, A8, A18, A23, A47, A49, A50 và A52 có hàm lượng acid acetic sinh ra khá cao và khác biệt không ý nghĩa với độ tin cậy 95%, hàm lượng acid trong khoảng 1,72-2,04% (w/v) và hiệu suất lên men trong khoảng 41,78-49,56%.

Bảng 1. Hàm lượng acid của 21 chủng vi khuẩn acetic trong 7 ngày lên men ở 37°C.

Chủng	Hàm lượng acid (% w/v) theo ngày lên men ở 37°C							Hiệu suất (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
A1	1,08 ^a	1,04 ^f	1,24 ^f	1,40 ^{bc}	1,24 ^{bcd}	1,16 ^{bcd}	1,76 ^{abc}	42,75
A3	1,04 ^a	1,00 ^f	1,44 ^{def}	1,80 ^{abc}	1,52 ^a	1,48 ^a	2,04 ^a	49,56
A8	1,08 ^a	1,12 ^{ef}	1,48 ^{def}	1,80 ^{abc}	1,36 ^{abc}	1,36 ^{ab}	1,84 ^{ab}	44,70
A11	1,12 ^a	1,08 ^{ef}	1,24 ^f	1,30 ^c	1,04 ^{abc}	1,04 ^{de}	1,48 ^{cde}	35,95
A13	1,16 ^a	1,12 ^{ef}	1,32 ^{ef}	1,40 ^{bc}	1,12 ^{abc}	1,04 ^{de}	1,36 ^{de}	33,04
A16	1,20 ^a	0,96 ^f	1,36 ^{ef}	1,68 ^{abc}	1,24 ^{bcd}	1,16 ^{bcd}	1,56 ^{bcd}	37,90
A18	1,12 ^a	1,08 ^{ef}	1,36 ^{ef}	1,60 ^{abc}	1,44 ^{ab}	1,20 ^{bcd}	1,76 ^{abc}	42,75
A19	1,20 ^a	1,08 ^{ef}	1,24 ^f	1,30 ^c	1,08 ^{abc}	1,08 ^{cde}	1,48 ^{cde}	35,95
A22	1,16 ^a	0,92 ^f	1,24 ^f	1,48 ^{bc}	1,28 ^{bcd}	1,00 ^e	1,60 ^{bcd}	38,87
A23	1,76 ^{ab}	1,64 ^{abcd}	1,76 ^{abc}	1,80 ^{abc}	1,28 ^{bcd}	1,20 ^{bcd}	1,72 ^{abc}	41,78
A24	1,68 ^{abc}	1,68 ^{abc}	1,76 ^{abc}	1,76 ^{abc}	1,32 ^{abcd}	1,28 ^{abcd}	1,60 ^{bcd}	38,87
A28	1,80 ^a	1,88 ^a	1,88 ^a	1,84 ^{ab}	1,36 ^{abc}	1,40 ^{ab}	1,60 ^{bcd}	38,87
A29	1,44 ^a	1,72 ^{abc}	1,80 ^{ab}	1,80 ^{abc}	1,28 ^{bcd}	1,16 ^{bcd}	1,52 ^{bcd}	36,92
A31	1,60 ^{bcd}	1,52 ^{bcd}	1,52 ^{bcd}	1,64 ^{abc}	1,32 ^{abcd}	1,32 ^{abcd}	1,56 ^{bcd}	37,90
A46	1,16 ^a	1,36 ^{de}	1,40 ^{def}	1,56 ^{bc}	1,24 ^{bcd}	1,16 ^{bcd}	1,56 ^{bcd}	37,90
A47	1,20 ^a	1,76 ^{ab}	1,76 ^{abc}	1,80 ^{abc}	1,52 ^a	1,28 ^{bcd}	2,04 ^a	49,56
A49	1,80 ^a	1,56 ^{bcd}	1,68 ^{abcd}	1,68 ^{abc}	1,36 ^{abc}	1,20 ^{bcd}	1,80 ^{abc}	43,73
A50	1,56 ^{cd}	1,44 ^{cd}	1,60 ^{bcd}	1,64 ^{abc}	1,32 ^{abcd}	1,32 ^{abcd}	1,80 ^{abc}	43,73
A52	1,60 ^{bcd}	1,44 ^{cd}	1,76 ^{abc}	1,94 ^a	1,32 ^{abcd}	1,28 ^{abcd}	1,76 ^{abc}	42,75
A55	1,52 ^{cd}	1,56 ^{bcd}	1,52 ^{bcd}	1,52 ^{bc}	1,28 ^{bcd}	1,16 ^{bcd}	1,68 ^{bcd}	40,81
BC	1,16 ^a	1,08 ^{ef}	1,28 ^f	1,36 ^c	0,96 ^{abc}	1,04 ^{de}	1,36 ^{de}	32,07
CV (%)	2,78	4,82	7,33	5,91	4,87	3,87	5,29	

¹Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% (p-value < 0,05).

Khả năng lên men của vi khuẩn acetic chịu nhiệt ở 38 và 39°C

Hàm lượng acid acetic sau lên men trong môi trường YPGD có bổ sung 4% (v/v) ethanol ở nhiệt độ 38°C và 39°C được trình bày ở bảng 2 và bảng 3. Kết quả cho thấy, hàm lượng acid đạt cực đại vào ngày thứ 6 ở 38°C và ngày thứ 3 ở 39°C. Do đó, 2 mốc thời gian lên men này được chọn để thống kê hàm lượng acid sinh ra của các chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt ở 2 mức nhiệt độ thử nghiệm. Hàm lượng acid đạt khoảng 1,24-2,08% (w/v) và hiệu suất trong khoảng 30,12-51,50% khi lên men ở 38°C. Hàm lượng acid đạt trong khoảng 1,20-2,04% (w/v) khi kết thúc lên men vào ngày thứ 7. Kết quả lên men ở 39°C cho hàm lượng acid đạt cao nhất vào ngày thứ 3, hàm lượng acid và hiệu suất tương ứng là 1,52-2,56% (w/v) và 36,92-62,19%. Khi kết thúc lên men vào ngày thứ 7, hàm lượng acid trong khoảng 1,50-2,28% (w/v).

Bảng 2. Hàm lượng acid của 10 chủng vi khuẩn acetic trong 7 ngày lên men ở 38°C.

Chủng	Hàm lượng acid (% w/v) theo ngày lên men ở 38°C							Hiệu suất (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
A1	1,08 ^c	1,20 ^{cd}	1,28 ^{abc}	1,48 ^{ab}	1,60 ^{ab}	1,84 ^{abc}	1,92 ^{ab}	44,70
A3	1,44 ^b	1,40 ^{bc}	1,28 ^{abc}	1,36 ^{ab}	1,52 ^{ab}	1,64 ^c	1,88 ^{ab}	39,84
A8	1,08 ^a	1,24 ^{cd}	1,40 ^{ab}	1,56 ^a	1,60 ^{ab}	1,80 ^{bc}	2,00 ^a	43,73
A18	1,68 ^a	1,60 ^{ab}	1,48 ^a	1,56 ^a	1,52 ^{ab}	1,80 ^{bc}	1,88 ^{ab}	43,73
A23	1,72 ^a	1,68 ^a	1,56 ^a	1,72 ^a	1,68 ^{ab}	2,04 ^{ab}	1,96 ^a	49,56
A47	1,04 ^c	1,08 ^d	1,04 ^c	1,12 ^b	1,44 ^b	1,80 ^{bc}	1,76 ^b	43,73
A49	1,84 ^a	1,68 ^a	1,44 ^a	1,56 ^a	1,80 ^a	2,08 ^{ab}	2,04 ^a	50,53
A50	1,80 ^a	1,64 ^a	1,44 ^a	1,60 ^a	1,68 ^{ab}	1,88 ^{abc}	1,96 ^a	45,67
A52	1,72 ^a	1,60 ^{ab}	1,44 ^a	1,72 ^a	1,68 ^{ab}	2,12 ^a	1,92 ^a	51,50
BC	1,36 ^b	1,24 ^{cd}	1,12 ^{bc}	1,36 ^{ab}	1,36 ^b	1,24 ^d	1,20 ^c	30,12
CV (%)	2,58	6,93	6,14	7,37	2,81	5,78	6,59	

¹Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% (p-value < 0,05).

Bảng 3. Hàm lượng acid của 10 chủng vi khuẩn acetic trong 7 ngày lên men ở 39°C.

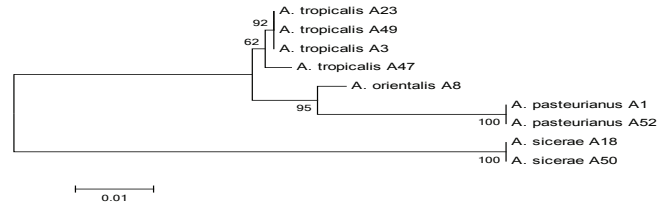
Chủng	Hàm lượng acid (% w/v) theo ngày lên men ở 39°C							Hiệu suất (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
A1	0,92 ^{bc1}	1,08 ^{abc}	2,52 ^a	2,44 ^{ab}	2,56 ^a	2,48 ^a	2,28 ^a	61,22
A3	0,80 ^c	0,88 ^{bcd}	2,08 ^{abcd}	2,56 ^a	2,36 ^a	2,28 ^{abc}	2,20 ^a	50,53
A8	0,88 ^{bc}	1,20 ^a	2,40 ^{ab}	2,08 ^{bcd}	2,16 ^{ab}	2,16 ^{abc}	2,04 ^{abc}	58,30
A18	1,00 ^{abc}	0,76 ^d	2,56 ^a	2,20 ^{abc}	2,40 ^a	2,28 ^{abc}	2,12 ^{ab}	62,19
A23	1,20 ^a	1,12 ^{ab}	2,12 ^{abcd}	1,88 ^{cde}	1,64 ^c	1,72 ^d	1,68 ^{bc}	51,50
A47	0,84 ^c	0,84 ^{cd}	1,52 ^d	1,72 ^{de}	2,40 ^a	2,32 ^{ab}	2,20 ^a	36,92
A49	1,08 ^{ab}	1,08 ^{abc}	1,76 ^{bcd}	1,52 ^{de}	1,68 ^c	1,88 ^{cd}	2,08 ^{ab}	42,75
A50	1,08 ^{ab}	1,00 ^{abcd}	1,68 ^{cd}	1,80 ^{cde}	1,92 ^{bc}	2,04 ^{bcd}	2,12 ^{ab}	40,81
A52	1,20 ^a	1,16 ^a	1,76 ^{bcd}	1,72 ^{de}	1,76 ^{bc}	1,68 ^d	1,50 ^c	42,75
ĐC	0,80 ^c	1,04 ^{abc}	2,28 ^{abc}	2,48 ^{ab}	2,36 ^a	2,48 ^a	2,28 ^a	55,39
CV(%)	5,21	7,05	3,04	1,90	3,12	6,31	4,70	

¹Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% (p-value < 0,05).

Định danh các chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt

Chín chủng vi khuẩn acetic với khả năng sinh acid cao ở 37°C là A1, A3, A8, A18, A23, A47, A49, A50 và A52 được giải trình tự DNA và so sánh mức độ tương đồng với trình tự của các chủng vi khuẩn acetic trong ngân hàng gene trên NCBI cho thấy, tất cả các chủng đều thuộc chi *Acetobacter*. Trong đó, 2 chủng A1 và A52 là *A. pasteurianus*, 4 chủng A3, A23, A47 và A49 được xác định là *A. tropicalis*, 2 chủng A18 và A50 là *A. sicerae* và chủng A8 là *A. orientalis* với mức độ tương đồng so sánh BLAST trên cơ sở dữ liệu đạt 98-100%.

Trình tự DNA các chủng phân lập được sử dụng để vẽ cây phân loại gene 16S rDNA dựa trên multiple alignment, chương trình MEGA 6 (theo thông số neighbor - joining) với độ tin cậy của nhánh phả hệ có chỉ số bootstrap 1.000 (hình 1). Cây phân loại được xây dựng phù hợp với kết quả định danh của 9 chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt. Do các chủng này đều thuộc chi *Acetobacter* nên mối quan hệ di truyền của chúng khá gần nhau, trong đó 3 chủng cùng loài A3, A23 và A49 thuộc *A. tropicalis* có chỉ số bootstrap lên đến 92%, tuy nhiên 3 chủng này có khác về mặt trình tự so với chủng *A. tropicalis* A47. Chủng A18 và A50 thuộc *A. sicerae* mức độ tin cậy về mối quan hệ gần gũi đến 100%. Kết quả tương tự đối với 2 chủng *A. pasteurianus* A1 và A52, chủng *A. orientalis* A8 có quan hệ gần gũi với *A. pasteurianus* hơn so với *A. tropicalis* và *A. sicerae*.

**Hình 1. Cây phân loại di truyền của 9 chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt.**

Điều kiện lên men acid acetic của vi khuẩn acetic chịu nhiệt được tuyển chọn

Chủng *A. sicerae* A18 được tuyển chọn và thử nghiệm các điều kiện lên men ở 39°C do có khả năng sinh ra acid acetic cao hơn ở thời gian lên men ngắn hơn so với các chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt được thử nghiệm. Ảnh hưởng của hàm lượng ethanol bổ sung, pH và số lượng tế bào giống vi khuẩn đến khả năng sinh acid acetic của chủng *A. sicerae* A18 được theo dõi trong 7 ngày lên men và kết quả được trình bày ở bảng 4. Kết quả cho thấy, ở nghiệm thức 10 vào ngày thứ 6 (pH 4,0, 5% ethanol và 10⁴ tb/ml) sinh ra hàm lượng acid acetic cao nhất là 2,70% (w/v), không khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức 3 và 12 cũng cho hàm lượng acid acetic cao (2,64% w/v) cùng với các nghiệm thức 11, 1 và 2 có hàm lượng acid acetic lần lượt là 2,52%; 2,46% và 2,46% (w/v).

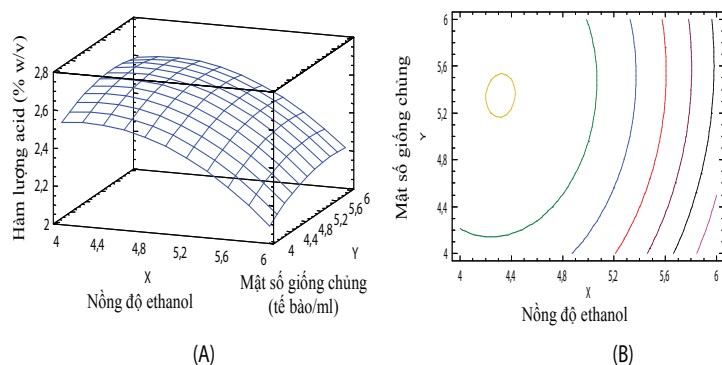
Bảng 4. Hàm lượng acid acetic của chủng A18 trong 7 ngày lên men ở 39°C.

Nghiệm thức	Hàm lượng acid (% w/v) theo ngày lên men ở 39°C							Hiệu suất (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
4%-pH4-10 ⁴ (1)	2,10	2,16	2,10	2,10	2,04	2,46 ^{ab1}	1,98	59,76
4%-pH4-10 ⁴ (2)	2,16	2,10	2,04	2,04	2,10	2,46 ^{ab}	1,62	59,76
4%-pH4-10 ⁴ (3)	2,22	2,28	2,22	2,22	2,34	2,64 ^a	2,10	64,13
4%-pH5-10 ⁴ (4)	0,9	0,96	0,78	0,96	0,96	1,62 ^{gh}	0,78	39,35
4%-pH5-10 ⁴ (5)	1,08	1,08	1,20	0,96	1,32	1,74 ^{gh}	1,20	42,27
4%-pH5-10 ⁴ (6)	1,02	0,96	0,96	1,02	1,20	1,68 ^{gh}	1,14	40,81
4%-pH6-10 ⁴ (7)	0,96	1,14	1,56	1,50	1,32	1,74 ^{gh}	1,62	42,27
4%-pH6-10 ⁴ (8)	1,14	1,26	1,80	1,38	1,50	1,80 ^{fg}	1,44	43,73
4%-pH6-10 ⁴ (9)	1,44	1,68	1,92	1,86	1,74	1,80 ^{fg}	1,56	43,73
5%-pH4-10 ⁴ (10)	2,04	1,92	1,92	1,74	1,86	2,70 ^a	1,80	65,59
5%-pH4-10 ⁴ (11)	2,34	2,10	2,10	2,10	1,74	2,52 ^a	1,32	61,22
5%-pH4-10 ⁴ (12)	1,98	1,98	2,04	1,86	1,74	2,64 ^a	1,44	64,13
5%-pH5-10 ⁴ (13)	1,02	0,96	1,02	0,78	0,90	1,50 ^{hi}	1,02	36,44
5%-pH5-10 ⁴ (14)	1,08	1,02	0,96	0,78	0,90	1,62 ^{gh}	1,38	39,35
5%-pH5-10 ⁴ (15)	1,14	1,02	0,78	0,78	0,84	1,50 ^{hi}	0,96	36,44
5%-pH6-10 ⁴ (16)	0,96	1,14	1,50	1,62	1,50	1,68 ^{gh}	1,50	40,81
5%-pH6-10 ⁴ (17)	0,78	0,96	1,02	1,32	1,32	2,10 ^{cd}	1,62	51,01
5%-pH6-10 ⁴ (18)	1,02	1,32	1,56	1,68	1,74	1,86 ^{efg}	1,80	45,18
6%-pH4-10 ⁴ (19)	1,08	1,02	1,14	1,44	1,98	1,98 ^{def}	1,74	48,10
6%-pH4-10 ⁴ (20)	0,96	0,90	0,78	0,84	1,14	2,22 ^{bc}	1,74	53,93
6%-pH4-10 ⁴ (21)	0,84	0,90	1,20	1,44	1,56	2,22 ^{bc}	1,56	53,93
6%-pH5-10 ⁴ (22)	1,08	1,02	0,84	0,96	0,84	1,32 ^j	0,96	32,07
6%-pH5-10 ⁴ (23)	0,72	0,84	0,72	0,78	0,96	1,38 ^{ij}	0,78	33,52
6%-pH5-10 ⁴ (24)	1,02	1,02	0,84	0,96	0,90	1,38 ^{ij}	1,02	33,52
6%-pH6-10 ⁴ (25)	0,96	1,02	1,14	1,38	1,44	1,74 ^{gh}	1,14	42,27
6%-pH6-10 ⁴ (26)	1,02	1,20	1,08	0,9	1,08	1,74 ^{gh}	1,32	42,27
6%-pH6-10 ⁴ (27)	1,26	1,08	1,14	1,38	1,14	1,68 ^{gh}	1,38	40,81
CV (%)						2,34		

¹Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% (p-value < 0,05).

Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy, nghiệm thức 10 (pH 4,0, 5% ethanol và 10^4 tb/ml) cho hàm lượng acid acetic cao nhất 2,70% (w/v) nhưng để đạt được kết quả tốt hơn thì các thông số hàm lượng ethanol bổ sung, pH và số lượng tế bào giống vi khuẩn tối ưu cần được tìm ra thông qua phân tích hồi quy dựa trên số liệu thu thập được để xác định được các nghiệm thức tối ưu với độ tin cậy 95%. Dựa vào 3 nhân tố trên, đồ thị mặt đáp ứng (surface plotting) và đồ thị đường mức (contour) được xác định dựa vào phương trình hồi quy thay thế giá trị pH bằng 4, hàm lượng ethanol bổ sung = X (4-6% v/v) và mật số giống chủng = Y (4-6 tương đương 10^4 - 10^6 tế bào/ml).

Phương trình hồi quy nhiều biến: Hàm lượng acid acetic = $17,5081 + 0,4025 \times \text{ethanol} + 0,140833 \times \text{giống chủng} - 7,0375 \times \text{pH} - 0,146667 \times \text{ethanol} \times \text{ethanol} + 0,1075 \times \text{ethanol} \times \text{giống chủng} + 0,1925 \times \text{ethanol} \times \text{pH} - 0,0566667 \times \text{giống chủng} \times \text{giống chủng} + 0,0975 \times \text{giống chủng} \times \text{pH} + 0,583333 \times \text{pH} \times \text{pH} - 0,0225 \times \text{ethanol} \times \text{giống chủng} \times \text{pH}$.



Hình 2. Đồ thị mặt đáp ứng (A) và đường mức (B) thể hiện mối tương quan giữa nồng độ ethanol và số lượng tế bào giống vi khuẩn đến quá trình tạo acid acetic.

Dựa vào phương trình trên, thay thế pH là 4,0. Giải phương trình hồi quy bằng cách lấy đạo hàm lần lượt theo X (hàm lượng ethanol) và Y (số lượng tế bào giống vi khuẩn), được kết quả: X = 4,32 và Y = 5,35. Thay thế X = 4,32 và Y = 5,35 vào phương trình thu được hàm lượng acid acetic là 2,64% (w/v). Đồ thị mặt đáp ứng và đường mức từ phương trình hồi quy được thể hiện ở hình 2. Từ đồ thị có được, điều kiện tối ưu cho lên men acid acetic được xác định với chủng *A. sicerae* A18 ở 39°C là bổ sung ethanol với nồng độ 4,32% (v/v), pH 4,0 và số lượng tế bào giống vi khuẩn là 10^5 tb/ml. Kết quả lên men với chủng *A. sicerae* A18 trong 1 lít môi trường YPGD với các thông số từ thử nghiệm tối ưu hóa cho hàm lượng acid acetic đạt 2,61% (w/v) sau 6 ngày lên men ở 39°C. Sau lên men, giá trị pH của thành phẩm là 3,13 và hiệu suất lên men đạt được là 63,4%.

Thảo luận

Khi lên men ở 37°C, hàm lượng acid ở ngày lên men thứ 7 đạt khá cao và giá trị này khác biệt có ý nghĩa thống kê (bảng 1). Kết quả cho thấy ở nhiệt độ này thì chủng đối chứng (ĐC) là *A. pausterianus* SKU1108 phát triển tương đối yếu hơn so với 20 chủng còn lại. Hàm lượng acid tăng vào ngày thứ 4, giảm vào ngày thứ 5, 6 và sau đó tiếp tục tăng đến giá trị cao nhất vào ngày thứ 7. Lý do là các chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt thích nghi nhanh ở nhiệt độ 37°C nên chỉ đến ngày lên men thứ 4 thì chúng đã phát triển mạnh và sinh hàm lượng acid acetic cao. Sau khi lên men, hàm lượng acid acetic sinh ra đã làm giảm pH của môi trường lên men, trong đó môi trường lên men của chủng A18 có pH thấp nhất là 4,20 và của chủng đối chứng là cao nhất 4,64. Chín chủng vi khuẩn acetic được tuyển chọn từ kết quả lên men ở 37°C bao gồm A1, A3, A8, A18, A23, A47, A47, A50 và A52 có hàm lượng acid acetic đạt trong khoảng 1,72-2,04% (w/v). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Kanchanarach, et al. [7] trên *A. pasteurianus* MSU10, IFO3191 và SKU1108 trong môi trường YPGD có bổ sung 4-6% (v/v) ethanol, các chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt phát triển ở nhiệt độ 37°C và hàm lượng acid sinh ra trong khoảng 2-3% (w/v).

Điều đáng chú ý là kết quả lên men ở nhiệt độ 39°C cho thấy hầu hết các chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt đều sinh ra hàm lượng acid cao hơn ở 38°C (bảng 2 và bảng 3), điều này có thể được hiểu rằng với nhiệt độ cao hơn thì vi khuẩn acetic chịu nhiệt sinh trưởng nhanh hơn, làm cho tốc độ lên men diễn ra mạnh hơn nên thời gian lên men có thể được rút ngắn. Tương tự, hàm lượng acid khi lên men ở nhiệt độ 38°C (bảng 2) của các chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt này đều tăng so với khi lên men ở 37°C (bảng 1). Theo nghiên cứu của Sossou, et al. [10], quá trình tổng hợp acid có liên quan đến sự tăng sinh khối của vi khuẩn acetic để bắt đầu chuyển hóa ethanol thành acid khi gia tăng nhiệt độ lên men. Theo Madigan, et al. [11], tại thời điểm pha chậm (pha lag), vi sinh vật cần thời gian để thích ứng nên hoạt động lên men của chúng chưa mạnh, do đó hàm lượng acid sinh ra không cao. Chuyển sang pha tăng trưởng (pha log), lúc này vi khuẩn đủ năng lượng và được sử dụng để tổng hợp acid. Tuy nhiên, thời gian để tạo được lượng acid cao nhất ở 38°C cũng không quá dài (ngày thứ 6). Trong khi đó, ở 39°C thì các chủng A1, A3, A8, A18, A23, A47, A49, A50, A52 và *A. pausterianus* thích nghi rất nhanh với mức nhiệt độ lên men này và ở ngày thứ 3, chúng đã sinh nhiều acid hơn so với ngày đầu tiên và duy trì hàm lượng cao trong quá trình lên men. Kết quả cho thấy, chủng A18 sinh ra lượng acid cao nhất (2,56% w/v) vào ngày thứ 3 với hiệu suất 62,19% (bảng 3). Với chủng *A. tropicalis* DK4, hàm lượng acid là tương đồng nhưng với thời gian ngắn hơn so với Phong, et al. [12], hàm lượng acid đạt 2,52% (w/v) vào ngày thứ 7 trong môi trường YPGD bổ sung 4% (v/v) ethanol ở 39°C.

Kết quả định danh cho thấy, các chủng vi khuẩn acetic được

tuyển chọn thuộc chi *Acetobacter*, bao gồm *A. pasteurianus* (A1 và A5), *A. tropicalis* (A3, A23, A47 và A49), *A. sicerae* (A18 và A50) và *A. orientalis* (A8). Các loài vi khuẩn acetic này được tìm thấy phổ biến trong quá trình lên men acid acetic và nhiều nghiên cứu cho thấy đây là các chủng có khả năng chịu nhiệt trong quá trình lên men. Matsushita [1] đã tuyển chọn được các chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt như *A. tropicalis* SKU1100 và *A. pasteurianus* SKU1108 có khả năng lên men acid acetic ở 42°C và Ndoye, et al. [13] đã chọn lọc được 2 chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt là *A. tropicalis* CWBI-B418 và *A. pasteurianus* CWBI-B419 phân lập từ trái cây có khả năng lên men tốt ở 38°C.

Kết quả các chỉ tiêu theo dõi ở bảng 4 cho thấy, quá trình hấp thụ đường được cung cấp từ môi trường YPGD cho sự tăng sinh khối của vi khuẩn và giá trị pH cuối thay đổi rất phù hợp đối với sự lên men, từ đó cho thấy ở các mức độ đặt ra của từng nhân tố thì chủng *A. sicerae* A18 có thể phát triển và lên men khá tốt. Từ đồ thị ở hình 2 đã xác định được điều kiện tối ưu cho lên men acid acetic với hàm lượng ethanol bổ sung là 4,32% (v/v), số lượng tế bào giống vi khuẩn là 5,24 (tương đương 10^5 tb/ml), pH 4,0 và hàm lượng acid đạt 2,64% (w/v). Với hàm lượng ethanol bổ sung là 4,32% (v/v), kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Gullo, et al. [14] và Beheshti, et al. [15] về khả năng phát triển tốt của các chủng vi khuẩn acetic ở môi trường có bổ sung 5% (v/v) ethanol với hiệu suất chuyển hóa ethanol thành acid acetic là cao nhất.

Kết quả hàm lượng acid của thí nghiệm sản xuất thử nghiệm với 1 lít dịch lên men (2,61% w/v) thấp hơn không đáng kể so với kết quả lý thuyết tính được theo phương trình hồi quy (2,64% w/v) và trong khoảng có giá trị hàm lượng acid cao (2,46-2,70% w/v) của các nghiệm thức từ kết quả thực nghiệm (bảng 4). Điều này cho thấy, khi lên men với thể tích lớn hơn (1 lít) vẫn có thể đạt được giá trị hàm lượng acid theo mô hình tối ưu hóa. Kết quả cho thấy tiềm năng ứng dụng trong sản xuất acid ở điều kiện nhiệt độ tăng cao mà không cần chi phí để duy trì nhiệt độ tối ưu cho quá trình lên men trong các hệ thống lên men ở quy mô sản xuất.

Kết luận

Nghiên cứu đã tuyển chọn được 9 chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt lên men ở 37°C với hàm lượng acid acetic đạt được trong khoảng 1,72-2,04% (w/v). Tuyển chọn được chủng A18 với hàm lượng acid đạt 2,56% (w/v) và hiệu suất lên men 62,19% chỉ sau 3 ngày lên men ở 39°C. Chín chủng vi khuẩn acetic chịu nhiệt được xác định thuộc chi *Acetobacter*, bao gồm *A. pasteurianus*, *A. tropicallis*, *A. sicerae* và *A. orientalis*. Điều kiện lên men acid acetic của chủng *A. sicerae* A18 ở 39°C được xác định với nồng độ ethanol ban đầu 4,32%, pH 4,0 và số lượng tế bào giống vi khuẩn là 10^5 tb/ml, hàm lượng acid acetic đạt 2,61% (w/v).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài Nghị định thư của Bộ Khoa học và Công nghệ (09/2014/HĐ-NĐT) và một phần hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu khoa học trong Chương trình Công nghệ sinh học tiên tiến Trường Đại học Cần Thơ (2016) và Chương trình CCP (New Core to Core Program, 2014-2019).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Matsushita (2009), "Thermotolerant acetic acid bacteria: Its physiological features and application for high temperature oxidative fermentation", *Proceedings of The Satellite Seminar of Asian Core Program*, p.17.
- [2] Phẩm Lương Đức (1998), *Công nghệ vi sinh vật*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
- [3] I. Cleenwerck, K. Vandemeulebroecke, D. Janssens, and J. Swings (2002), "Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**(5), pp.1551-1558.
- [4] Y. Jojima, Y. Mihara, S. Suzuki, K. Yokozeki, S. Yamanaka, and R. Fudou (2004), "*Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**(6), pp.2263-2267.
- [5] D.E. Greenberg, S.F. Porcella, F. Stock, A. Wong, P.S. Conville, P.R. Murray, S.M. Holland, and A.M. Zelazny (2006), "*Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**(11), pp.2609-2616.
- [6] A. Saeki, G. Theeragool, K. Matsushita, H. Toyama, N. Lotong and O. Adachi (1997), "Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for Vinegar Fermentation at higher temperatures", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **61**(1), pp.138-145.
- [7] W. Kanchanarach, G. Theeragool, T. Yakushi, H. Toyama, A. Adachi, and K. Matsushita (2010), "Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and quinoprotein alcohol dehydrogenases", *Applied Microbial and Biotechnology*, **85**(3), pp.741-751.
- [8] C. Bennett (1971), "Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol", *The American Journal of Medical Technology*, **37**(6), p.217.
- [9] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013), "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729.
- [10] S.K. Sossou, Y. Ameyapoh, S.D. Karou, C. de Souza (2009), "Study of pineapple peels processing into vinegar by biotechnology", *Pakistan Journal Biological Sciences*, **12**(11), pp.859-865.
- [11] Madigan, T. Michael, M. John Martinko, A. David Stahl, P. David Clark (2012). *Brock Biology of Microorganisms (13th Edition)*, Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings, San Francisco, California.
- [12] Phong Huynh Xuan, Chanhom Loinheuang, Gunjana Theeragool, Kazunobu Matsushita, Toshiharu Yakushi (2012), "Geographical distribution of thermo-tolerant acetic acid bacteria", *Summary Book of Asian Core Program*, pp.77-80, International Exchange Core Program in Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.
- [13] B. Ndoye, S. Lebecque, R. Dubois-Dauphin, L. Tounkara, A.T. Guirou, C. Kere, B. Diarawa, and P. Thonart (2006), "Thermoresistant properties of acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar", *Enzyme and Microbial Technology*, **39**(4), pp.916-923.
- [14] M. Gullo, C. Caggia, L.D. Vero and P. Giudici (2006), "Characterization of acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar", *International Journal of Food Microbiology*, **106**(2), pp.209-212.
- [15] M.K. Beheshti, and R. Shafiee (2009), "Isolation and identification of an *Acetobacter* strain from Iranian white-red cherry with high acetic acid productivity as a potential strain for cherry vinegar production in food and agriculture biotechnology", *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, **3**(6), pp.281-283.