



# TỐI ƯU HÓA THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG LÊN MEN RẼ TIỀN CHỨNG *Bacillus subtilis* LH1 BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUY HOẠCH THỰC NGHIỆM PHỤC VỤ SẢN XUẤT PROBIOTIC

## Optimization of low budget fermentation medium compositions *Bacillus subtilis* LH1 for probiotic production by using experimental design methods

Đoàn Thị Tuyết Lê\*, Phạm Vũ Bảo, Nguyễn Ngọc Tùng, Đỗ Minh Anh  
Khoa Kỹ thuật Hóa học và Môi trường; Trường Đại học Lạc Hồng, Đồng Nai, Việt Nam

**TÓM TẮT.** Chất lượng và giá thành chế phẩm probiotic phụ thuộc nhiều vào giống vi sinh vật, thành phần môi trường lên men (các nguồn cacbon, nitơ, muối khoáng...) cũng như các yếu tố khác ảnh hưởng đến quá trình lên men như nhiệt độ, pH, tốc độ lắc, hàm lượng oxy hòa tan. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm lựa chọn thành phần môi trường lên men rẻ tiền, đồng thời tối ưu hàm lượng các yếu tố có ảnh hưởng trong môi trường lên men chủng *Bacillus subtilis* LH1. Các yếu tố trong môi trường lên men bao gồm nguồn cacbon, nitơ, nguồn khoáng được chọn theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm, với hàm mục tiêu là sinh khối chủng *Bacillus subtilis* LH1. Kết quả cho thấy thành phần môi trường lên men tối ưu cho chủng *Bacillus subtilis* LH1 gồm ri đường 10 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15 g/l, nguồn khoáng: MgSO<sub>4</sub> 1 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.13 g/l, NaCl 7.5 g/l thu được sinh khối cao đạt mật độ tế bào 109 cfu/ml và giảm chi phí môi trường lên men ước tính rẻ hơn 7 lần so với môi trường MRS.

**TỪ KHÓA:** *Bacillus subtilis*, tối ưu hóa, probiotic, plackett-burman, phương pháp đáp ứng bề mặt

**ABSTRACT.** Quality and the cost of probiotic products are highly dependent on species and fermentation medium compositions (carbon, nitrogen and mineral sources, etc.) as well as other factors like temperature, pH, rotation speed, dissolved oxygen content. This study was performed to select the low cost components simultaneously with optimizing content of the most influential factors of fermentation medium for *Bacillus subtilis* LH1. The fermentation medium factors including carbon sources, nitrogen sources and mineral sources was selected by applying experimental designs: Plackett-Burman design and Box-Behnken design with biomass as target function. It resulted from the above that we suggest the optimum fermentation condition for *Bacillus subtilis* LH1 which molass 10 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15 g/l, mineral sources: MgSO<sub>4</sub> 1 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.13 g/l, NaCl 7.5 g/l with biomass achieved is about 109 cfu/ml and reducing the cost of fermentation media 7 times cheaper than MRS media.

**KEYWORDS:** *Bacillus subtilis*; optimization; probiotic; plackett-burman; response surface methodology

### 1. MỞ ĐẦU

Probiotic là hỗn hợp các chủng vi sinh vật có lợi đáp ứng lợi khuẩn đường ruột, tăng sức đề kháng cũng như khả năng tiêu hóa cho vật chủ. Ưu điểm vượt trội của probiotic là không gây tác dụng phụ ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm, sức khỏe người sử dụng như chất hóa học và chất kháng sinh (Krishnaprakash, 2009; Senthong và cs, 2012). Chủng lợi khuẩn *Bacillus* an toàn cho người và động vật, có khả năng sinh enzyme phân giải chất hữu cơ mạnh, tạo bào tử và thích nghi nhanh với các điều kiện bất lợi của môi trường nên đã trở thành lựa chọn cho các nghiên cứu về chế phẩm sinh học hiện nay (Rengpipat et al, 2000; Jorge et al, 2014) trong đó có chủng *Bacillus subtilis*. Ngoài việc phân lập những chủng vi khuẩn có tiềm năng probiotic, thì môi trường lên men cũng quyết định đến hiệu suất thu hồi sinh khối dẫn đến việc sản xuất probiotic có hiệu quả hơn (Shahnavy, 2012). Thành phần môi trường lên men rẻ tiền sẽ giảm chi phí sản xuất. Ước tính chi phí cho 1 lít môi trường lên men rẻ tiền khoảng 62.000 VNĐ/lít, thấp hơn 7 lần so với môi trường lên men thường dùng là MRS (khoảng 430.000 VNĐ/lít sau khi quy đổi ra VNĐ), giúp hạ giá thành sản phẩm. Từ đó đã thúc đẩy sự phát triển của ngành công nghiệp công nghệ sinh học, nỗ lực cải tiến môi trường nuôi cấy, tối đa hóa năng suất nhằm đáp ứng được nhu cầu của thị trường và giảm giá thành sản phẩm. Theo đó, bước tối ưu hóa môi trường nuôi cấy là khâu hết sức quan trọng đang được quan tâm nghiên cứu. Phương

pháp tối ưu hóa truyền thống dựa trên việc tối ưu từng nhân tố (one-factor-at-a-time) là đơn giản, dễ thực hiện và những ảnh hưởng của các thành phần được trình bày trên đồ thị mà không cần phải phân tích thống kê. Tuy nhiên, kết quả mô hình thường xuyên thất bại trong việc xác định vị trí tại khu vực đáp ứng tối ưu vì những tác động chung của các yếu tố trên bề mặt đáp ứng không thấy được, điều này có ý nghĩa trong lên men quy mô lớn. Hiện nay, với việc sử dụng phương pháp toán học quy hoạch thực nghiệm, cho phép xác định được điều kiện tối ưu của đa yếu tố một cách chính xác và mức độ ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình thu nhận sinh khối vi khuẩn trong cùng một thời điểm. Hơn nữa, phương pháp này còn cho thấy vai trò tác động qua lại giữa các yếu tố trong cùng một thời gian nuôi cấy với số lần thí nghiệm ít, đánh giá được sai số trong mỗi lần thực nghiệm theo các tiêu chuẩn thống kê, xem xét ảnh hưởng của các yếu tố với mức độ tin cậy cần thiết, tiết kiệm được thời gian, chi phí mà vẫn đem lại hiệu quả mong muốn. Do đó, nghiên cứu đã sử dụng thiết kế Plackett-Burman là một cách hiệu quả để sàng lọc các thông số chính trong một số lượng lớn các yếu tố của quá trình tối ưu (Plackett and Burman, 1946).

### 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Received: July, 1st, 2018

Accepted: August, 18th, 2018

\*Corresponding Author

Email: tuyetledt@gmail.com

## 2.1 Vật liệu

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* LH1 (Trường Đại học Lạc Hồng, Đồng Nai) có khả năng chịu nhiệt, chịu được điều kiện khô hạn, chịu mặn và tạo bào tử (Đoàn Thị Tuyết Lê và cs, 2016).

## 2.2 Nội dung nghiên cứu

Khảo sát đơn yếu tố chọn được nguồn cacbon và nitơ thích hợp dựa vào kết quả OD610nm. Tiếp theo kết hợp nguồn cacbon và nitơ đã được chọn với 4 nguồn khoáng cố định để thực hiện sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng chính bằng Plackett-Burman, 3 yếu tố ảnh hưởng chính này tiếp tục tham gia vào thiết kế Box-Behnken để xác định nồng độ tối ưu. Từ đó xác định thành phần môi trường lên men tốt nhất cho chủng *B. subtilis* LH1.

## 2.3 Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1 Khảo sát đơn yếu tố chọn lọc nguồn cacbon và nitơ

Khảo sát 5 nguồn cacbon và 5 nguồn nitơ trong thành phần môi trường lên men chứa các nguồn khoáng  $\text{CaCl}_2$  0.2(g/l),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2(g/l),  $\text{MgSO}_4$  1(g/l). Khảo sát 5 nguồn cacbon với nồng độ 10(g/l) gồm: glucose, ri đường, lactose, tinh bột sắn, tinh bột bắp, yếu tố cố định gồm nguồn nitơ là pepton 10(g/l) và các nguồn khoáng ban đầu; nuôi ở nhiệt độ 37 °C, pH 7.2, sau 24 giờ ghi nhận kết quả OD tại bước sóng 610nm. Khảo sát 5 nguồn nitơ với nồng độ 10 (g/l) gồm: cao nấm men, tryptone, đậu nành, peptone,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; yếu tố cố định gồm: nguồn cacbon X (từ kết quả khảo sát nguồn cacbon) 10(g/l) và các nguồn khoáng ban đầu; nuôi ở nhiệt độ 37 °C, pH 7.2, sau 24 giờ ghi nhận kết quả OD tại bước sóng 610nm (Chen P.T và cs, 2007; Trần Vũ Đình Nguyên, 2013; Trần Quốc Tuấn và cs, 2014).

### 2.3.2 Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng chính bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm theo thiết kế Plackett-Burman

Sử dụng thiết kế Plackett-Burman là một cách hiệu quả để sàng lọc các thông số chính trong một số lượng lớn các yếu tố của quá trình tối ưu (Plackett and Burman, 1946). Nguồn cacbon và nguồn nitơ đã được sàng lọc trong thí nghiệm trước được thêm vào môi trường lên men để tối ưu hóa. Thiết kế Plackett-Burman cho phép đánh giá các yếu tố có mức ảnh hưởng cao đến thu nhận sinh khối, mỗi yếu tố đã được kiểm tra ở hai cấp độ: mức thấp (-1) và mức cao (+1). Các yếu tố được chọn cho nghiên cứu này là cacbon X, nitơ Y,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , NaCl,  $\text{CaCl}_2$  được liệt kê trong Bảng 1.

**Bảng 1.** Các biến trong ma trận Plackett-Burman

Yếu tố	Đơn vị	Mức	
		Thấp (-1)	Cao (+1)
Cacbon X	g/l	-	-
Nitơ Y	g/l	-	-
$\text{MgSO}_4$	g/l	0.25	1.5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	g/l	1.25	3
NaCl	g/l	2.5	7.5
$\text{CaCl}_2$	g/l	0.05	0.4

**Bảng 2.** Mã hóa ký hiệu các yếu tố sử dụng

Yếu tố	Đơn vị	Ký hiệu	Mức		
			-1	0	+1
A	g/l	X1			
B	g/l	X2			
C	g/l	X3			

Từ kết quả ở Bảng 1, chọn và mã hóa 3 yếu tố A, B và C có ảnh hưởng lớn nhất lên sinh khối chủng *B. subtilis* LH1,

ký hiệu lần lượt là X1, X2, X3 đưa vào sử dụng trong thiết kế Box-Behnken để xác định hàm lượng tối ưu với các mức khảo sát thấp (-1), cơ sở (0), cao (+1) (Trần Quốc Tuấn và cs., 2014) như trình bày ở Bảng 2.

### 2.3.3 Tối ưu hóa bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm theo thiết kế Box-Behnken

Phương pháp quy hoạch thực nghiệm là một kỹ thuật mô hình thực nghiệm được sử dụng để đánh giá mối quan hệ giữa một tập hợp của các yếu tố thử nghiệm kiểm soát. Dựa trên kết quả kiểm tra biến, mô hình kiểm tra các biến thử nghiệm cần thiết cho hiệu quả thu sinh khối tối ưu bằng cách sử dụng thiết kế Box-Behnken và phương pháp bề mặt đáp ứng (Nguyễn Cảnh, 2004; Plackett and Burman, 1946). Trong nghiên cứu này, xác định giá trị tối ưu của ba yếu tố chính từ kết quả sàng lọc thu được và được nghiên cứu ở 3 mức (-1, 0 và +1) như Bảng 2, với 17 thí nghiệm trong đó có 5 thí nghiệm ở tâm. Hàm đáp ứng được chọn là sinh khối chủng *Bacillus subtilis* LH1 (OD 610nm), mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc hai:  $Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{11}X_{12} + B_{22}X_{22} + B_{33}X_{32}$ . Trong đó,  $B_1, B_2, B_3$  là các hệ số bậc 1;  $B_{11}, B_{22}$  và  $B_{33}$  là hệ số bậc 2;  $B_{12}, B_{23}$  và  $B_{13}$  là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố;  $X_1, X_2, X_3, X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_{12}, X_{23}$  và  $X_{13}$  là các biến độc lập.

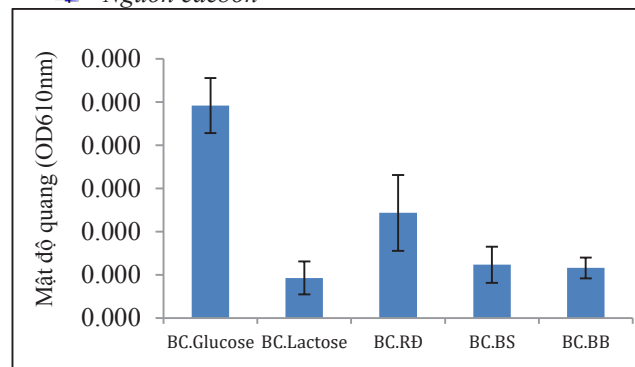
## 2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện 3 lần lặp lại để tính giá trị trung bình, xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 97-2003, phần mềm Design Expert® 7.0" Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ lên môi trường thu sinh khối chủng *Bacillus subtilis* LH1

▣ Nguồn cacbon

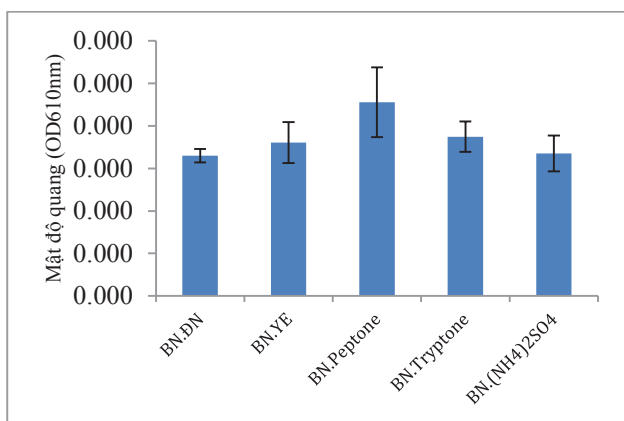


**Hình 1.** Kết quả khảo sát OD nguồn cacbon chủng *Bacillus subtilis* LH1

Trong các nguồn cacbon khảo sát như thể hiện trong Hình 1 nhận thấy, glucose có ảnh hưởng lớn nhất đến hiệu quả thu sinh khối chủng *Bacillus subtilis* LH1, đạt giá trị OD=0.246. Các nguồn cacbon khác nhau như lactose, ri đường, bột sắn, bột bắp có đều có giá trị thấp hơn glucose. Tuy nhiên với mục tiêu là xây dựng môi trường lên men rẻ tiền hướng tới quy mô sản xuất công nghiệp, đề tài đã chủ động chọn nguồn cacbon là ri đường vì giá thành ri đường (12.000 VNĐ/kg - công ty Cổ phần Hóa Phát Đồng Nai) thấp hơn rất nhiều so với glucose (khoảng 1,7 triệu VNĐ - công ty Sigma-Aldrich), đồng thời thí nghiệm trên góp phần chứng minh cho hiệu quả năng suất của ri đường trong việc thu sinh khối chủng *Bacillus subtilis* LH1 rất khả quan nếu so sánh với các nguồn cacbon rẻ tiền khác. Kết quả nghiên cứu này phù hợp

với nghiên cứu của Chen và cộng sự (2007), Trần Vũ Đình Nguyễn (2013) cũng như Trần Quốc Tuấn và cộng sự (2014).

📊 Nguồn nitơ



**Hình 2.** Kết quả khảo sát OD nguồn nitơ chủng *Bacillus subtilis* LH1

Từ kết quả ảnh hưởng các nguồn nitơ như Hình 2 nhận thấy peptone có ảnh hưởng lớn nhất đến hiệu quả thu sinh khối chủng *Bacillus subtilis* LH1, đạt giá trị OD=0.228. Các nguồn nitơ khác có sự chênh lệch về mức độ ảnh hưởng nhỏ, và với mục đích ưu tiên chọn nguồn nguyên liệu rẻ tiền và chất lượng ổn định, đề tài ưu tiên chọn (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> để tiến hành các bước tiếp theo. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của S.D. Todorov, L.M.T. Dicks (2006) cũng như kết quả nghiên cứu của Laxmi và cs (2011).

### 3.2 Kết quả sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng bằng Plackett-Burman

**Bảng 3.** Mức độ ảnh hưởng của các yếu tố lên sinh khối chủng *B. subtilis* LH1 theo thiết kế Plackett-Burman

Yếu tố	Đơn vị	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
		Thấp (-1)	Cao (+1)	Ảnh hưởng	Prob>F
Rỉ đường	g/l	1.25	10	1.05 <sup>b</sup>	0.3520
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/l	5	15	11.06 <sup>a</sup>	0.0209
MgSO <sub>4</sub>	g/l	0.25	1.5	1.54 <sup>b</sup>	0.2692
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g/l	1.25	3	2.85 <sup>b</sup>	0.1523
NaCl	g/l	2.5	7.5	2.33 <sup>b</sup>	0.1871
CaCl <sub>2</sub>	g/l	0.05	0.4	0.13 <sup>b</sup>	0.7376

<sup>a</sup>Có độ tin cậy alpha = 0.05; <sup>b</sup>Không có ý nghĩa ở độ tin cậy alpha = 0.05

Từ kết quả ở Bảng 3 cho thấy 3 yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất đến hiệu suất thu sinh khối chủng *B. subtilis* LH1 là (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và NaCl, các yếu tố này được chọn đưa vào Box-Behnken để xác định hàm lượng tối ưu.

### 3.3 Tối ưu hóa giá trị các yếu tố ảnh hưởng đến lên men thu sinh khối chủng *B. subtilis* LH1

Các thí nghiệm lên men thu nhận sinh khối chủng *B. subtilis* LH1 được thực hiện trên ba yếu tố ở ba mức gồm 17 công thức trong đó 5 lần lặp lại của các điểm trung tâm được thể hiện trong Bảng 3 với các giá trị hàm đáp ứng.

Từ kết quả phân tích xác định mức tối ưu của các yếu tố khảo sát cho sinh khối ở thí nghiệm 6. Kết quả phân tích ANOVA theo phần mềm Design Expert® 7.0" được trình bày trong Bảng 5 cho thấy, mô hình có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy p < 0,05, hệ số hồi quy R<sup>2</sup> = 0.8611 > 0.75 chứng tỏ mô hình tương thích với thực nghiệm.

**Bảng 4.** Kết quả thực nghiệm và mô hình theo thiết kế Box-Behnken chủng *B. subtilis* LH1

Thí nghiệm	Các biến			OD 610nm	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Thực nghiệm	Mô hình
1	10	3	2.5	0.176	0.156
2	15	3	5	0.161	0.181
3	15	1.25	5	0.165	0.171
4	5	1.25	5	0.114	0.143
5	5	2.13	7.5	0.084	0.141
6	15	2.13	7.5	0.189	0.193
7	5	2.13	2.5	0.199	0.147
8	10	1.25	2.5	0.179	0.150
9	10	3	7.5	0.163	0.170
10	15	2.13	2.5	0.139	0.159
11	10	1.25	7.5	0.170	0.164
12	5	3	5	0.079	0.145
13	10	2.13	5	0.161	0.160
14	10	2.13	5	0.170	0.160
15	10	2.13	5	0.213	0.160
16	10	2.13	5	0.186	0.160
17	10	2.13	5	0.169	0.160

**Bảng 5.** Kết quả phân tích ANOVA

Source	Tổng bình phương	Bậc tự do	Sai số chuẩn	Ảnh hưởng	F-Value	Prob>F
Model	0.019	9	0.009	0.18	4.82	0.025
X <sub>1</sub>	0.003	1	0.007	0.022	9.21	0.019
X <sub>2</sub>	0.0003	1	0.007	-0.006	0.7	0.4311
X <sub>3</sub>	0.0009	1	0.007	-0.011	2.2	0.1816
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.0002	1	0.01	0.008	0.56	0.4792
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.007	1	0.01	0.041	15.82	0.0053
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	4x10 <sup>-6</sup>	1	0.01	-0.001	0.009	0.9259
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.005	1	0.01	-0.035	11.75	0.011
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.001	1	0.01	-0.015	2.32	0.1714
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.0002	1	0.01	0.008	0.57	0.4766
Sai số	0.003	7	0.094			
Tổng	0.022	16				

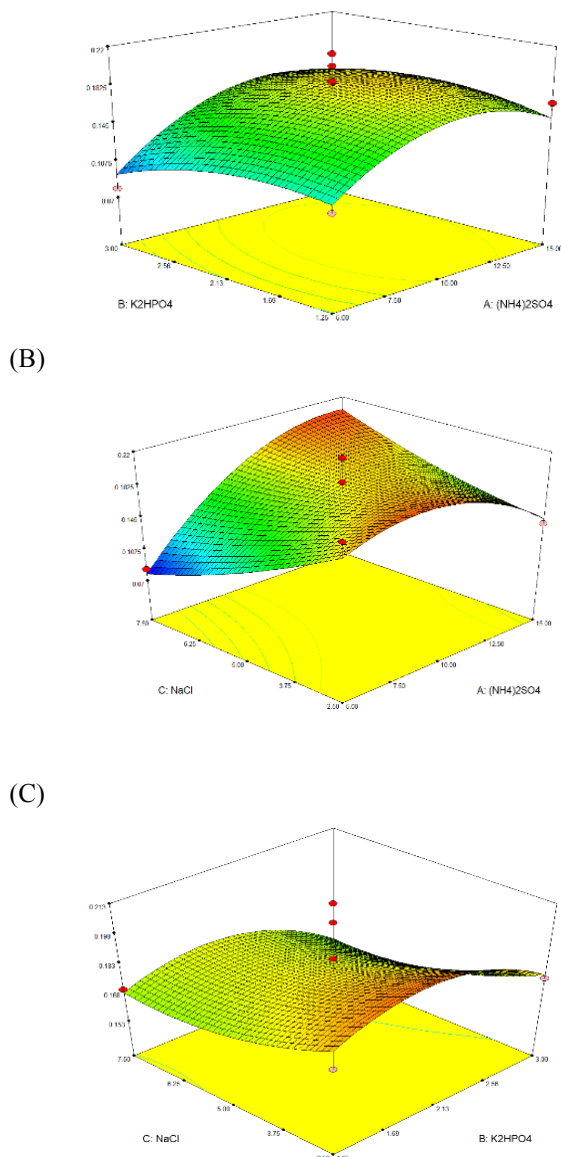
R<sup>2</sup> = 0.8611; C.V% = 12.98 %; R<sup>2</sup>-điều chỉnh = 0.6825; R<sup>2</sup>-dự đoán = -0.0858

Từ kết quả phân tích ANOVA nhận được phương trình hồi quy như sau: Y = 0.16 + 0.016X<sub>1</sub> + 0.003X<sub>2</sub> + 0.007X<sub>3</sub> + 0.002X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> + 0.01X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> - 0.0002X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> + 0.0001X<sub>1</sub><sup>2</sup> + 9x10<sup>-6</sup>X<sub>2</sub><sup>2</sup> + 5x10<sup>-5</sup>X<sub>3</sub><sup>2</sup>.

Kết quả từ Hình 3 (A) cho ta thấy giá trị OD tăng cực đại khi gia tăng lượng (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Trong khi đó Hình 3 (B) và 3 (C) chỉ ra giá trị OD không bị ảnh hưởng nhiều bởi lượng NaCl sử dụng. Từ các dữ liệu trên và phương trình hồi quy nhận được, thông số tối ưu cho các biến được các định ở Bảng 4 như sau: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15 g/l, NaCl 7.5 g/l và K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.13 g/l. Giá trị OD tối đa nhận được là 0.189 ở



bước sóng 610nm. Kết quả trên phù hợp với nghiên cứu của Trần Quốc Tuấn và cộng sự (2014).



**Hình 3.** Mặt đáp ứng sinh khối theo hai yếu tố: (A).  $(NH_4)_2SO_4$  ( $X_1$ ) –  $K_2HPO_4$  ( $X_2$ ) với NaCl ở nồng độ 7.5 g/l; (B).  $(NH_4)_2SO_4$  ( $X_1$ ) – NaCl với  $K_2HPO_4$  ở nồng độ 2.13 g/l; (C)  $K_2HPO_4$  ( $X_2$ ) – NaCl với  $(NH_4)_2SO_4$  ở nồng độ 15 g/l.

#### 4. KẾT LUẬN

Bước khảo sát đơn yếu tố đã chọn được nguồn carbon là ri đường và nguồn nitơ là  $(NH_4)_2SO_4$ . Sau đó thông qua thiết kế Plackett-Burman chọn ra được 3 yếu tố có ảnh hưởng lớn

nhất là  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $K_2HPO_4$  và NaCl. Thiết kế Box-Behken có ý nghĩa với p-value < 0.05 ở mức độ tin cậy 95%. Giá trị sinh khối OD tối đa đạt được là 0.189, phương trình hồi quy  $Y = 0.16 + 0.016X_1 + 0.003X_2 + 0.007X_3 + 0.002X_1X_2 + 0.01X_1X_3 - 0.0002X_2X_3 + 0.0001X_1^2 + 9 \times 10^{-6}X_2^2 + 5 \times 10^{-5}X_3^2$  với Y là sinh khối chùng *Bacillus subtilis* LH1. Thành phần môi trường tối ưu lên men chùng *Bacillus subtilis* LH1 với ri đường 10 g/l,  $(NH_4)_2SO_4$  15 g/l, nguồn khoáng: NaCl 7.5 g/l,  $K_2HPO_4$  2.13 g/l,  $CaCl_2$  0.2 g/l,  $MgSO_4$  1g/l.

#### 5. CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám Hiệu Trường Đại học Lạc Hồng, Lãnh đạo Khoa và quý thầy cô Khoa Kỹ Thuật Hóa Học và Môi trường Trường Đại học Lạc Hồng, Trung tâm Nghiên cứu Hhoa học và Ứng dụng Trường Đại học Lạc Hồng, Liên Hiệp các Hội Khoa học Kỹ thuật tỉnh Đồng Nai đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu.

#### 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đoàn Thị Tuyết Lê và cs. Phân lập, định danh và khảo sát các đặc tính probiotic của chủng *Bacillus subtilis* từ ruột tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus Vannamei*) ở huyện Nhon Trạch, tỉnh Đồng Nai. *Kỷ yếu hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc khu vực phía Nam lần thứ IV*. **2016**, 193.
- [2] Nguyễn Cảnh. *Quy hoạch thực nghiệm*. NXB Đại Học Quốc Gia TP.HCM. **2004**.
- [3] Trần Quốc Tuấn và cs. Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men chùng *Bacillus subtilis* thu nhận nattokinase tái tổ hợp bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. *Tạp chí sinh học*. **2014**, 36, 130-137.
- [4] Trần Vũ Đình Nguyên. *Nghiên cứu quy trình sản xuất chế phẩm probiotics nhằm bổ sung vào thức ăn cho tôm hùm nuôi lồng*. Luận văn Thạc sĩ, Trường Đại học Nha Trang. **2013**.
- [5] Chen P. T., Chiang C. J., Chao Y. P. Medium optimization for the production of recombinant nattokinase by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. *Biotechnol. Prog.* **2007**, 23, 1327-1332.
- [6] Jau K. W., Hua H. C., Ching S. H. Optimization of the medium components by statistical experimental methods to enhance nattokinase activity. *Fooyin J. Health Sci.* **2009**, 1, 21-27.
- [7] Liu J., Xing J., Chang T., Ma Z., Liu H. Optimization of nutritional condition for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. *Process. Biochem.* **2005**, 40, 2757-2762.
- [8] Plackett R. L. and Burman J. P. *The design of optimum multifactorial experiments*. *Biometrika*. **1946**, 33, 305-325.
- [9] Prafulla M. M., Sagar V. G., Smita S. L. Production of nattokinase using *Bacillus natto* using response surface methodology. *Brazilian Journal of Microbiolog.* **2010**, 45, Issue1, 81-88.