

## TỐI ƯU HÓA MỘT SỐ THÀNH PHẦN DINH DƯỠNG TRONG MÔI TRƯỜNG LÊN MEN CHÌM NHÂN SINH KHỐI CHỦNG *Azotobacter chroococcum*

Nguyễn Thu Hà<sup>1</sup>, Đào Văn Thông<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

*Azotobacter chroococcum* là vi khuẩn có khả năng cố định nitơ được sử dụng trong sản xuất phân bón vi sinh vật. Nhằm tối ưu một số thành phần môi trường nuôi cấy *Azotobacter chroococcum* VACC 86, công trình nghiên cứu đã ứng dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm các biến ảnh hưởng theo phương pháp hàm mong đợi và sử dụng công cụ hỗ trợ tối ưu là phần mềm Design Expert Version 12.0.3.0. Kết quả đã xác định được hàm lượng dinh dưỡng tối ưu là glucose 11,9991 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,978683 g/l và MgSO<sub>4</sub> 0,328847 g/l. Kết quả áp dụng mô hình tối ưu cho thấy vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 được lên men nhân sinh khối trên môi trường sản xuất tối ưu đáp ứng yêu cầu về mật độ vi khuẩn và hoạt tính sinh học.

**Từ khóa:** *Azotobacter chroococcum*, hàm lượng dinh dưỡng tối ưu, lên men chìm nhân sinh khối, phương pháp qui hoạch thực nghiệm

---

<sup>1</sup> Viện Thổ nhưỡng Nông hóa; <sup>2</sup> Viện Môi trường Nông nghiệp

**I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

*Azotobacter chroococcum* là vi khuẩn cố định nitơ sống tự do trong đất, hiếu khí, không sinh bào tử, gram âm. *Azotobacter chroococcum* có thể sử dụng nhiều loại hợp chất hữu cơ làm nguồn thức ăn cacbon. *Azotobacter chroococcum* thích hợp với điều kiện hiếu khí và pH trung tính hoặc hơi kiềm (Nguyễn Lân Dũng và ctv., 2017).

Việc tối ưu hóa thành phần nuôi cấy nhằm nâng cao mật độ vi sinh vật trong quá trình lên men nhân sinh khối đang được quan tâm nghiên cứu. Phương pháp tối ưu hóa truyền thống thực hiện việc tối ưu từng nhân tố (onefactor-at-a-time) tuy đơn giản, dễ thực hiện và những tác động của các thành phần có thể được nhận thấy trên đồ thị mà không cần phải phân tích thống kê. Tuy nhiên, mô hình này 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 khi lên men ở quy mô lớn (Plackett and Burman, 1946). Thiết kế thí nghiệm thống kê cung cấp một cách tiếp cận hiệu quả để tối ưu hóa; cho phép tối ưu nhiều hơn một yếu tố ở hai hay nhiều mức độ khác nhau như thiết kế các yếu tố đầy đủ (full factorial design) hay thiết kế BoxBehnken (Box-Behnken design-BBD) (Sanket et al., 2007; Singh et al., 2013).

Nghiên cứu này ứng dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm, tối ưu các biến ảnh hưởng theo phương pháp hàm mong đợi, sử dụng công cụ hỗ trợ tối ưu là phần mềm Design Expert Version 12.0.3.0 để tìm ra hàm lượng dinh dưỡng tối ưu cho lên men nhân sinh khối chủng *Azotobacter chroococcum* VACC 86 - chủng vi sinh vật được sử dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh vật cải tạo đất.

**II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1. Vật liệu nghiên cứu**

- Chủng vi sinh vật nghiên cứu: Vi khuẩn *Azotobacter chroocococcum* VACC 86, có hoạt tính cố định nitơ.

- Hóa chất sử dụng trong điều chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật: NaCl, CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, glucose, pepton, cao nấm men, bột nấm men, ri đường,...

**2.2. Phương pháp nghiên cứu**

Mật độ *Azotobacter chroocococcum* được xác định theo TCVN 6166:2002 và hoạt tính cố định nitơ được xác định theo TCVN 10786:2015.

Hàm lượng tối ưu của ba yếu tố ảnh hưởng là glucose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O được xác định bằng cách sử dụng qui hoạch trực giao đối xứng, mỗi yếu tố tiến hành tại ba mức (-1, 0, +1); hàm mục tiêu là mật độ vi khuẩn đạt cực đại.

Ba nguồn dinh dưỡng chính được sử dụng nghiên cứu tối ưu hóa là glucose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và MgSO<sub>4</sub>. Miền khảo sát hàm lượng một số nguồn dinh dưỡng chính sử dụng trong môi trường lên men chìm nhân sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 được tổng hợp trong bảng 1.

**Bảng 1.** Miền khảo sát hàm lượng ba nguồn dinh dưỡng chính sử dụng trong môi trường lên men chìm nhân sinh khối chủng *Azotobacter chroococcum* VACC 86

STT	Nguồn dinh dưỡng	Đơn vị đo	Hàm lượng/Giá trị mã hóa		
			-1	0	+1
1	Glucose	g/L	8,0	10,0	12,0
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g/L	0,6	0,8	1,0
3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	g/L	0,3	0,5	0,7

Ma trận kế hoạch thực nghiệm gồm 17 thí nghiệm tương ứng 17 giá trị khác nhau của ba yếu tố dinh dưỡng chính được tổng hợp trong bảng 2.

**Bảng 2.** Ma trận thực nghiệm sử dụng trong môi trường lên men chìm nhân sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86

Thí nghiệm	Các biến		
	Glucose (g/l)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/l)
1	10,0	0,8	0,5
2	10,0	0,6	0,3
3	10,0	0,8	0,5
4	8,0	0,8	0,7
5	10,0	1,0	0,3
6	10,0	0,8	0,5
7	12,0	0,8	0,7
8	10,0	0,6	0,7
9	10,0	1,0	0,7
10	8,0	1,0	0,5
11	12,0	1,0	0,5
12	10,0	0,8	0,5
13	8,0	0,8	0,3
14	12,0	0,8	0,3
15	8,0	0,6	0,5
16	10,0	0,8	0,5
17	12,0	0,6	0,5

Phần mềm thống kê Design-Expert 12.0.3.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) được sử dụng để phân tích các hệ số hồi quy, bề mặt đáp ứng và tối ưu hóa với thuật toán hàm mong đợi.

**2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 9 đến tháng 12 năm 2019 tại Viện Thổ nhưỡng Nông hóa.

**III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Tối ưu hóa hàm lượng một số thành phần dinh dưỡng trong môi trường lên men chìm nhân sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86**

Kết quả đánh giá mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 17 của thí nghiệm theo ma trận kế hoạch thực nghiệm được tổng hợp trong bảng 3 cho thấy mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 đạt cực đại (9,5314 log CFU/ml) ở hàm lượng glucose là 12,0 g/lít; hàm lượng K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> là 1,0 g/lít và hàm lượng MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O là 0,50 g/lít (thí nghiệm thứ 11). Kết quả thí nghiệm cũng xác định mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 đạt cực tiểu (7,8129 log CFU/ml) ở hàm lượng glucose là 8,0 g/lít; hàm lượng K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> là 0,60 g/lít và hàm lượng MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O là 0,50 g/lít (thí nghiệm thứ 15).

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của ma trận thực nghiệm với ba yếu tố glucose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và MgSO<sub>4</sub> đến mật độ VSV trong quá trình lên men chìm nhân sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86

Thí nghiệm	Các biến			Mật độ VSV (log CFU/ml)
	Glucose (g/l)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/l)	
1	10,0	0,8	0,5	8,8260
2	10,0	0,6	0,3	8,7075
3	10,0	0,8	0,5	8,8325
4	8,0	0,8	0,7	7,9444
5	10,0	1,0	0,3	8,8808
6	10,0	0,8	0,5	8,8260
7	12,0	0,8	0,7	9,4624
8	10,0	0,6	0,7	8,7160
9	10,0	1,0	0,7	8,9138
10	8,0	1,0	0,5	7,9340
11	12,0	1,0	0,5	9,5314
12	10,0	0,8	0,5	8,8325
13	8,0	0,8	0,3	7,8920
14	12,0	0,8	0,3	9,4624
15	8,0	0,6	0,5	7,8129
16	10,0	0,8	0,5	8,8388
17	12,0	0,6	0,5	9,3010

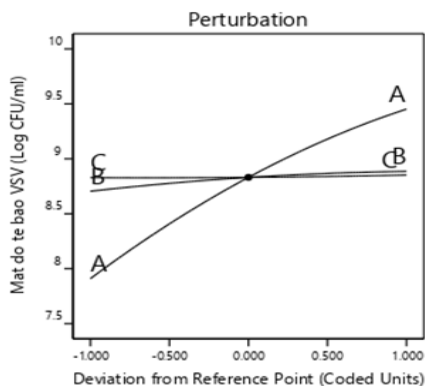
Phân tích phương sai của mô hình (Bảng 4) cho phép kiểm tra sự có nghĩa của các hệ số và sự thích ứng của mô hình được tiến hành bằng phân tích hồi quy. Kết quả ở bảng 4 xác định đối với chủng vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 chuẩn F của mô hình bằng 21.829,52 có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99,99% (p < 0,0001). Sự có nghĩa của các hệ số hồi quy được kiểm định bởi chuẩn F, các giá trị p < 0,05 cho biết các hệ số hồi quy đều có nghĩa. Chuẩn F của mô hình còn cho biết giá trị không tương thích của mô hình là 0,7156 (p = 0,5921). Kết quả này cho thấy mô hình hoàn toàn tương thích với thực nghiệm.

**Bảng 4.** Phân tích phương sai Anova của mô hình đối với chủng vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86

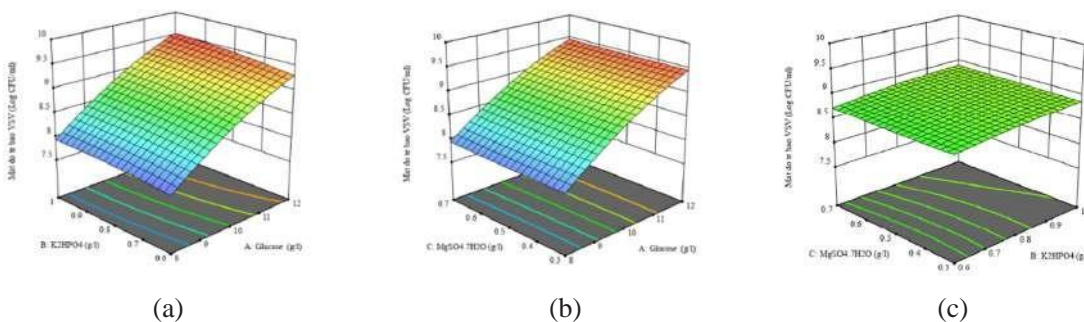
Thông số	Phương sai	Chuẩn F	Giá trị p (khả năng > F)
Mô hình	0,5486	21.829,52	< 0,0001
A- Glucose	4,76	1,896E+05	< 0,0001
B- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0654	2600,78	< 0,0001
C-MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0011	43,79	0,0003
AB	0,0030	117,90	< 0,0001
AC	0,0007	27,30	0,0012
BC	0,0002	6,00	0,0441
A <sup>2</sup>	0,0950	3780,72	< 0,0001
B <sup>2</sup>	0,0055	217,24	< 0,0001
C <sup>2</sup>	0,0004	14,66	0,0065
Không tương thích	0,0000	0,7156	0,5921

Từ kết quả phân tích trên, thiết lập phương trình hồi quy đối với mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 như sau: Y = 8,8312 + 0,771664\*A + 0,090386\*B + 0,0117277\*C + 0,027216\*AB - 0,013097\*AC + 0,00614177\*BC - 0,150215\*A<sup>2</sup> - 0,0360081\*B<sup>2</sup> + 0,00935504\*C<sup>2</sup>.

Lần lượt xem xét ảnh hưởng của từng yếu tố (khi các yếu tố khác giữ ở tâm) đến mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 cho thấy cả 3 yếu tố là hàm lượng glucose, hàm lượng K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và hàm lượng MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O có ảnh hưởng đến mật độ chủng vi sinh vật nghiên cứu.



**Hình 1.** Ảnh hưởng các yếu tố tới mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86



**Hình 2.** Bề mặt đáp ứng của mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 tác động bởi các yếu tố (a) hàm lượng  $K_2HPO_4$  và hàm lượng glucose; (b) hàm lượng  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  và hàm lượng glucose; (c) hàm lượng  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  và hàm lượng  $K_2HPO_4$

**Bảng 5.** Phương án tối ưu về hàm lượng một số thành phần dinh dưỡng chính trong pha chế môi trường nhân sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86

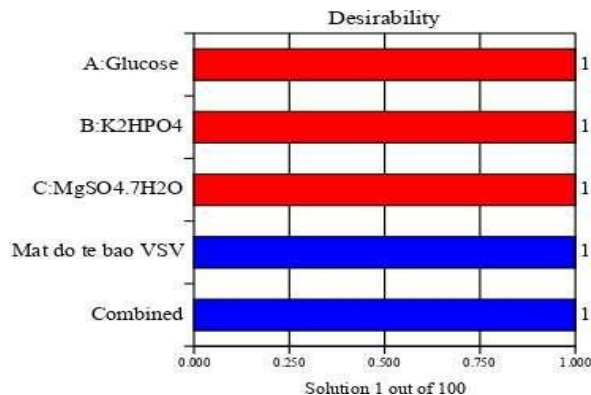
Nguồn dinh dưỡng	Đơn vị đo	Giá trị theo phương án tối ưu
Glucose	g/l	11,9991
$K_2HPO_4$	g/l	0,978683
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	g/l	0,328847
Mật độ vi khuẩn cực đại	log CFU/ml	9,53209

Kết quả ở hình 3 cho thấy với phương án tối ưu này, mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 thu được đối với ba yếu tố ảnh hưởng là hàm lượng glucose,  $K_2HPO_4$  và  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  đều đạt 100% như mong muốn.

Từ kết quả nghiên cứu trên, đã xác định được hàm lượng tối ưu một số thành phần dinh dưỡng chính bao gồm: Hàm lượng glucose; hàm lượng  $K_2HPO_4$  và hàm lượng  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  trong môi trường lên men nhân sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86. Kết quả được tổng hợp ở bảng 6.

Xem xét sự tương tác của các cặp yếu tố tới hàm mục tiêu: mật độ vi sinh vật có thể thấy qua các đồ thị 3D - bề mặt đáp ứng.

Sử dụng phương pháp hàm kỳ vọng để tối ưu hóa mật độ của chủng vi khuẩn nghiên cứu bằng phần mềm quy hoạch thực nghiệm Design Expert đã xác định được phương án tốt nhất để cực đại hàm mục tiêu là mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86.



**Hình 3.** Mức độ đáp ứng sự mong đợi đối với vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86

### 3.2. Ứng dụng kết quả tối ưu hàm lượng một số thành phần dinh dưỡng trong môi trường lên men nhân sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86

Chủng vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 được lên men chìm nhân sinh khối trên môi trường sản xuất với thành phần dinh dưỡng được tối ưu hóa trên thiết bị lên men dung tích 20 lít. Kết quả đánh giá mật độ và hoạt tính sinh học của chủng vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 được tổng hợp trong bảng 7.

**Bảng 6.** Thành phần môi trường lên men nhân sinh khối cơ bản và môi trường tối ưu một số thành phần dinh dưỡng

Hóa chất	Hàm lượng (g/l) trong môi trường lên men nhân sinh khối cơ bản	Hàm lượng (g/l) trong môi trường lên men nhân sinh khối được tối ưu hóa
Glucose(*)	10,0	11,9991
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (*)	0,8	0,978683
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	0,2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O(*)	0,5	0,328847
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1	0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,05	0,05
CaCO <sub>3</sub>	5,0	5,0

**Bảng 7.** Mật độ chủng vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 được nhân sinh khối trên môi trường sản xuất được tối ưu hóa một số thành phần chính

Chỉ tiêu đánh giá		Đơn vị đo	Kết quả
Mật độ tế bào	Theo mô hình tối ưu	log CFU/ml	9,53209
	Kết quả thực tế	log CFU/ml	9,51850
Hoạt tính sinh học: Hàm lượng etylen hình thành	Ban đầu	nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h	4.210
	Theo mô hình tối ưu	nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h	4.050

Kết quả ở bảng 7 cho thấy, chủng vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 được lên men chìm nhân sinh khối trên môi trường sản xuất được tối ưu hóa ba thành phần dinh dưỡng chính (glucose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu về mật độ tế bào và hoạt tính sinh học.

#### IV. KẾT LUẬN

Đã xác định hàm lượng dinh dưỡng tối ưu cho

### Optimization of some nutritional components in submerged fermentation medium of *Azotobacter chroococcum* bacteria

Nguyen Thu Ha, Dao Van Thong

#### Abstract

*Azotobacter chroococcum* is a nitrogen-fixing bacterium that is used in the production of microbiological fertilizers. In order to optimize some components of *Azotobacter chroococcum* VACC 86 culture medium, the research has applied experimental planning method to optimize the affected variables according to the expected functional method and to use the optimal support tool Design Expert Version 12.0.3.0 software. The results showed that the optimal nutrient content was glucose 11.9991 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.978683 g/l and MgSO<sub>4</sub> 0.328847 g/l. The results of applying the optimal model showed that *Azotobacter chroococcum* VACC 86 bacteria were fermented on the optimal production medium to meet the requirements of bacteria density and biological activity.

**Keywords:** *Azotobacter chroococcum*, experimental planning method, optimal nutrient content, submerged fermentation

Ngày nhận bài: 04/9/2020  
Ngày phản biện: 20/9/2020

lên men chìm nhân sinh khối chủng *Azotobacter chroococcum* VACC 86 như sau: hàm lượng glucose: 11,9991 g/l; hàm lượng K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,978683 g/l và hàm lượng MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,328847 g/l. Kết quả đánh giá áp dụng mô hình tối ưu cho thấy vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* VACC 86 được lên men chìm nhân sinh khối trên môi trường sản xuất tối ưu đáp ứng được yêu cầu về mật độ tế bào và hoạt tính sinh học.

#### LỜI CẢM ƠN

Bài báo là một phần kết quả nghiên cứu của Dự án “Áp dụng giải pháp hữu ích số 1198 để sản xuất chế phẩm vi sinh vật cải tạo đất ở quy mô công nghiệp”. Tập thể tác giả chân thành cảm ơn Cục Sở hữu trí tuệ đã cấp kinh phí và tạo điều kiện để hoàn thành công trình nghiên cứu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển, Phạm Văn Ty, 2017. *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản giáo dục.
- TCVN 6166:2002. Tiêu chuẩn Việt Nam về Phân bón vi sinh vật cố định ni tơ.
- TCVN 10786:2015. Tiêu chuẩn Việt Nam về Phân bón vi sinh vật - Xác định hoạt tính cố định ni tơ của *Azotobacter* - Phương pháp định lượng khí etylen.
- Plackett R. L., Burman J. P., 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33: 305-325.
- Sanket J., S. Yadav, A. Neurkar and A. J. Desai, 2007. Statistical Optimization of Medium Components for the Production of Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. *J. Microbiol. Biotechnol*, 17 (2): 313-319.
- Singh S.P., Bharali P., Konwar B.K., 2013. Optimization of nutrient requirements and culture conditions for the production of rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 7815) using *Mesua ferrea* seed oil. *Indian J. Microbiol.* doi: 10.1007/s12088-013-0403-2.

Người phản biện: GS.TS. Phạm Văn Toàn  
Ngày duyệt đăng: 02/10/2020