

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SINH TỔNG HỢP MANNITOL BỞI CHỦNG *LACTOBACILLUS FERMENTUM* HF08

Đỗ Trọng Hưng[✉], Lê Đức Mạnh, Nguyễn La Anh, Vũ Thị Thuận, Nguyễn Thùy Linh, Lương Thị Như Hoa, Nguyễn Hoàng Phi

Viện Công nghiệp Thực phẩm (FIRI)

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: hungvtp@gmail.com

Ngày nhận bài: 26.01.2018

Ngày nhận đăng: 24.3.2018

TÓM TẮT

Mannitol là một đường rượu có mạch cấu trúc gồm 6 carbon có giá trị cho sức khỏe con người (năng lượng thấp, giảm chỉ số đường huyết, kiểm soát hàm lượng insulin, chống sâu răng và mang đặc tính prebiotic). Mannitol có đặc điểm không hút ẩm nên được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm. Trong công nghiệp thực phẩm, do có vị ngọt, mannitol được sử dụng như một chất đường thay thế. Mannitol không bị hấp thụ nên không làm tăng hàm lượng insulin trong máu, do đó nó được ứng dụng trong các thực phẩm cho người bị bệnh tiểu đường. Mannitol được sản xuất bằng các phương pháp hóa học, enzyme và lên men, trong đó công nghệ lên men sản xuất mannitol có ưu việt hơn, không đòi hỏi nguyên liệu có độ tinh sạch cao, dễ triển khai sản xuất ở qui mô công nghiệp. Có nhiều nhóm vi sinh vật có khả năng lên men sinh tổng hợp mannitol, trong đó nhóm vi khuẩn lactic lên men chuyên hóa fructose thành mannitol bằng mannitol dehydrogenase với hàm lượng mannitol sinh ra cao và không có sản phẩm phụ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số điều kiện thích hợp sinh tổng hợp mannitol bởi chủng *Lactobacillus fermentum* HF08. Hàm lượng mannitol đạt 93,1-93,2 g/l sau 48 giờ lên men trong môi trường SP bao gồm các thành phần (g/L): pepton 7,0; glucose/fructose = 50/100; cao nấm men 2,0; K₂HPO₄ 2,0; MgSO₄.5H₂O 0,2; MnSO₄ 0,01. Nhiệt độ lên men 35-37°C, pH lên men 5,0-5,5.

Từ khóa: *Lactobacillus fermentum* HF08, mannitol, đường rượu, polyols

MỞ ĐẦU

Mannitol thuộc nhóm polyol, còn được gọi là "sugar alcohol", chúng được sử dụng như một chất tạo ngọt thay thế trong chế biến thực phẩm, dược phẩm. Một tính chất quan trọng của mannitol khác với các polyol khác là có khả năng hút ẩm kém ngay cả khi trong điều kiện độ ẩm không khí cao, do vậy kéo dài thời gian sử dụng sản phẩm thực phẩm, chống lại các điều kiện bảo quản khắc nghiệt như khí hậu nóng và ẩm như ở Miền Bắc nước ta hoặc không được bao gói kỹ càng. Ngoài ra mannitol cũng mang đặc tính của prebiotic nên cũng mang một số tính chất chức năng sinh học như các đường chức năng khác (Patra, 2009; Saha, 2003; Saha, Racine, 2011).

Mannitol được sản xuất bằng các phương pháp hóa học, enzyme và lên men, trong đó công nghệ lên men sinh tổng hợp mannitol có ưu việt hơn, tạo ra sản phẩm có độ tinh khiết cao, dễ triển khai sản xuất ở qui mô công nghiệp. Có rất nhiều nhóm vi sinh vật

có khả năng sinh tổng hợp mannitol, trong đó vi khuẩn lactic dị hình là đối tượng thích hợp nhất trong sản xuất các đường mannitol bằng cơ chế oxi hoá khử chuyển hóa fructose thành mannitol dưới tác dụng mannitol dehydrogenase (MDH) cùng cofactor NAD(P)H. Quá trình lên men sinh tổng hợp mannitol chịu ảnh hưởng nhiều của các yếu tố như cơ chất carbon, nguồn nitrogen, nhiệt độ, pH bởi những yếu tố này ngoài tác động đến sự sinh trưởng của vi sinh vật và tạo điều kiện thích hợp cho hoạt động của enzyme MDH chuyển hóa tạo mannitol (Ortiz *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2012; Monedero *et al.*, 2010).

Saha, Nakamura (2003) đã đưa ra một số chủng vi khuẩn lactic dị hình thuộc các chi *Lactobacillus* và *Leuconostoc* có khả năng lên men chuyên hóa tạo mannitol từ fructose, trong đó có chủng *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693, *L. fermentum* NRRL B-1915. Von Weymarn *et al.* (2002b) cũng tiến hành lên men sinh mannitol bởi chủng *L. fermentum* NRRL B-

1932 trên môi trường MRS, 35°C cho hiệu suất chuyển hoá fructose thành mannitol đạt 94%. Ở Việt Nam, việc nghiên cứu công nghệ sản xuất mannitol bằng phương pháp lên men vi sinh vật chưa được quan tâm nghiên cứu, trong khi nhu cầu sử dụng đường chức năng này cho ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và một số ngành công nghiệp khác ngày càng tăng, do đó mannitol sử dụng trong nước hoàn toàn phải nhập khẩu. Trong khi đó, công nghệ sản xuất mannitol bằng phương pháp lên men vi khuẩn lactic ở nước ta là hoàn toàn có thể nghiên cứu được để chủ động tạo ra sản phẩm trong nước.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Chủng *L. fermentum* HF08 từ bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật của Viện Công nghiệp Thực phẩm.

Các môi trường nuôi cấy

Môi trường hoạt hóa MRS (g/l): Pepton: 10,0; Cao thịt: 5,0; Glucose: 20; Cao nấm men: 5,0; K₂HPO₄: 2,0; MgSO₄.5H₂O: 0,2; MnSO₄: 0,01; thanh trùng: 121°C/ 15 phút.

Môi trường nhân giống OSCP (g/l): Trypton:10,0; Glucose: 10; Fructose: 20; Cao nấm men: 5,0; K₂HPO₄: 2,0; MgSO₄.5H₂O: 0,2; MnSO₄: 0,01; thanh trùng: 121°C/ 15 phút.

Môi trường lên men SP (g/l): Pepton:10,0; Glucose/fructose = 50/100; Cao nấm men: 5,0; K₂HPO₄: 2,0; MgSO₄.5H₂O: 0,2; MnSO₄: 0,01; thanh trùng 121°C/ 15 phút.

Hóa chất

Hoá chất môi trường

Glucose, fructose, peptone, cao thịt, cao nấm men, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, MnSO₄, casamino acid,...(Merck, Sigma và Trung Quốc), agar (Việt Nam).

Hoá chất phân tích

Natri periodate, ammonium axetat, axetyl acetone, natri thiosulfate, D-mannitol, NaOH, KOH,...(Merck, Sigma)

Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển của chủng vi khuẩn bằng xác định mật độ tế bào

Dịch lên men được khuấy đều và pha loãng đến tỷ lệ thích hợp và được cấy dịch trên môi trường MRS agar, nuôi trong tủ ấm 30°C, 48 giờ. Công

thức tính:

$$M_i \text{ (CFU/ml)} = A_i \times D_i / V$$

Trong đó A_i là số khuẩn lạc trung bình trên các đĩa cùng độ pha loãng; D_i là độ pha loãng, V là thể tích dịch huyền phù tế bào cấy vào mỗi đĩa thạch (ml).

Xác định hàm lượng mannitol bằng phương pháp so màu

Đường mannitol được oxy hóa bằng natri periodate trong điều kiện môi trường axit tạo ra formaldehyde. Formaldehyde được tiếp tục phản ứng tạo chất màu vàng dị vòng với ammonium acetate và acetyl acetone (phản ứng Hantzsch). Natri thiosulfate có tác dụng phản ứng với ion periodate còn dư trong phản ứng oxi hóa để không gây ảnh hưởng đến phản ứng tạo màu. Cường độ màu vàng được đo tại bước sóng 412nm trên thiết bị quang phổ UV-Vis 1601-PC (Nhật Bản). Hàm lượng mannitol trong dịch lên men được tính toán dựa vào đường chuẩn nồng độ mannitol đã biết (Sanchez, 1998).

Xác định ảnh hưởng của các điều kiện lên men sinh tổng hợp mannitol

Chủng *L. fermentum* HF08 được hoạt hóa trên môi trường MRS và nhân giống trên môi trường OSCP với điều kiện nuôi 30°C trong 24 giờ. Thí nghiệm lên men sinh tổng hợp mannitol được tiến hành trên bình tam giác dung tích 250 ml chứa 150 ml môi trường SP. Các điều kiện như nồng độ cơ chất, nhiệt độ, thời gian và pH được nghiên cứu ảnh hưởng đến quá trình lên men. Kết quả thí nghiệm được đánh giá bằng mật độ tế bào, hàm lượng mannitol sinh ra.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp mannitol

Mỗi loại vi sinh vật thích hợp với một nồng độ đường thích hợp, nếu nồng độ đường quá cao tạo ra áp suất thẩm thấu sẽ gây ức chế quá trình trao đổi chất. Trong thí nghiệm này, chủng giống sau khi hoạt hóa và nhân giống với các điều kiện đã được xác định, sau đó tiến hành lên men trên môi trường SP có thành phần đường phối hợp fructose/ glucose theo tỉ lệ 2/1, tiến hành thử nghiệm khảo sát nồng độ đường fructose thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp mannitol. Điều kiện lên men: 35°C, 48h, tỉ lệ tiếp giống 7%, pH ban đầu 6,2-6,5.

Kết quả bảng 1 cho thấy với nồng độ đường fructose thấp hơn 100 g/l và glucose thấp hơn 50 g/l thì mật độ tế bào thấp do hạn chế cơ chất nguồn đường glucose, do đó dẫn đến khả năng chuyển hoá fructose thành mannitol cũng bị hạn chế, còn với nồng độ đường fructose và glucose cao hơn thì sẽ tạo áp suất thẩm thấu tác dụng lên thành tế bào vi khuẩn làm ức chế sự trao đổi chất sinh trưởng của chúng, dẫn đến hàm lượng mannitol sinh ra bị giảm. Điều này cũng phù hợp với nhận định của von Weymarn (2002a) khi nghiên cứu lên men chuyển hóa tạo mannitol trên chủng *Leuconostoc mesenteriodes* ATCC 9135 cho rằng ở nồng độ fructose cao trên 120-140 g/l

sẽ tạo áp suất thẩm thấu ức chế sự sinh trưởng tế bào làm giảm quá trình chuyển hóa tạo mannitol. Do vậy nồng độ đường thích hợp cho chủng *L. fermentum* sinh tổng hợp mannitol là fructose 100 g/l và glucose 50 g/l. Kết quả này cũng phù hợp với Saha (2005) khi nghiên cứu sinh tổng hợp mannitol bởi *L. intermedius* NRRL B-30560 với mannitol đạt cao nhất (97,1 g/l) trên môi trường có sự kết hợp fructose/glucose tương ứng 100/50 g/l. Luciana *et al.* (2017) khi nghiên cứu lên men sinh tổng hợp mannitol bởi *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034 cho kết quả mannitol cao nhất, đạt 85,03 g/l trên môi trường chứa tổng lượng đường 165 g/l với tỷ lệ fructose/ glucose là 2 : 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp mannitol của chủng *L. fermentum* HF08.

TT	Nồng độ cơ chất (g/l)		Mật độ tế bào (CFU/ml x 10 ⁹)	Hàm lượng mannitol (g/l)
	Fructose	Glucose		
1	70	35	3,13 ± 0,15	54,83 ± 0,81
2	80	40	3,53 ± 0,12	67,1 ± 0,56
3	90	45	3,87 ± 0,12	78,17 ± 0,45
4	100	50	4,1 ± 0,06	87,57 ± 0,57
5	110	55	3,77 ± 0,15	88,9 ± 1,15
6	120	60	3,07 ± 0,12	75,67 ± 1,46
7	130	65	2,13 ± 0,15	52,23 ± 1,74

Ảnh hưởng của nguồn nitrogen hữu cơ đến sự sinh trưởng của tế bào và khả năng sinh tổng hợp mannitol

Vi sinh vật cũng như tất cả các cơ thể sống khác cần nitrogen trong các quá trình sống để xây dựng tế bào. Tất cả các môi trường nuôi cấy vi sinh vật đều phải có các loại hợp chất nitrogen mà vi sinh vật có thể đồng hóa được. Việc chọn nguồn nitrogen là rất cần thiết đảm bảo được tốc độ sinh trưởng, hiệu suất

lên men cao và có lợi về mặt kinh tế. Vì vậy trong thí nghiệm này sau khi chủng giống được hoạt hoá và nhân giống, sau đó tiến hành lên men trên môi trường SP với các thành phần đường fructose/glucose = 100/50 g/l và khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitrogen hữu cơ đến sự phát triển và khả năng sinh tổng hợp mannitol. Nguồn nitrogen được khảo sát gồm: cao nấm men, cao thịt, cao ngô, casamino acid với nồng độ 5 g/l. Điều kiện lên men: 35°C, 48h, tỉ lệ tiếp giống 7%, pH ban đầu 6,2-6,5.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp mannitol của chủng *L. fermentum* HF08

TT	Nguồn nitrogen hữu cơ	Mật độ tế bào (CFU/ml x 10 ⁹)	Hàm lượng mannitol (g/l)
1	Cao thịt	3,87 ± 0,12	85,1 ± 0,82
2	Cao ngô	3,07 ± 0,06	74,33 ± 0,57
3	Cao nấm men (Merck)	4,13 ± 0,05	87,83 ± 0,35
4	Cao nấm men (Viện CNTP)	4,17 ± 0,06	87,8 ± 0,4
5	Casamino acid	2,73 ± 0,15	71,9 ± 0,75

Kết quả bảng 2 cho thấy khả năng sinh trưởng và lên men sinh tổng hợp mannitol trên môi trường SP có nguồn nitrogen hữu cơ khác nhau cho kết quả khác nhau. Nguồn nitrogen hữu cơ là cao nấm men cho khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp mannitol cao nhất vì so với các nguồn nitrogen khác thì cao nấm men cung cấp đầy đủ các loại axit amin nhất đặc biệt các axit amin không thay thế, đồng thời còn chứa nhiều loại vitamin nhóm B và khoáng chất nên kích thích vi khuẩn phát triển tốt nhất. Đồng thời kết quả thí nghiệm còn lựa chọn được nguồn cao nấm men do Viện Công nghiệp Thực phẩm sản xuất có kết quả lên men sinh tổng hợp mannitol tương đương với cao nấm men ngoại nhập có giá thành cao hơn nhiều. Do vậy, khi sản xuất nên chọn nguồn nitrogen hữu cơ là cao nấm men do Viện Công nghiệp Thực phẩm sản xuất làm môi trường cho quá trình lên men sinh tổng hợp mannitol. Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa giá trị kinh tế cao, góp phần giảm chi phí sản xuất đáng kể.

Ảnh hưởng của tỉ lệ nguồn nitrogen đến sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp mannitol

Tỷ lệ nguồn nitrogen ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp mannitol của vi khuẩn lactic. Trong thí nghiệm này, chủng *L.fermentum* HF08 được tiến hành lên men trên môi trường SP có thành phần nguồn nitrogen từ peptone và cao nấm men do Viện Công nghiệp Thực phẩm sản xuất với các tỷ lệ khác nhau. Điều kiện lên men: 35°C, 48h, tỉ lệ tiếp giống 7%, pH ban đầu 6,2-6,5.

Qua kết quả bảng 3 cho thấy với tỉ lệ peptone 7 g/l và cao nấm men 2 g/l trong môi trường lên men cho kết quả chủng *L. fermentum* HF08 sinh trưởng và lên men sinh tổng hợp mannitol tốt nhất. Ở nồng độ nấm men và pepton cao hơn thì kết quả sinh trưởng và sinh tổng hợp mannitol tăng không đáng kể, không hiệu quả kinh tế. Do vậy, trong các nghiên cứu tiếp theo tỉ lệ nguồn nitrogen trên môi trường lên men SP được chọn là peptone 7 g/l và cao nấm men Viện Công nghiệp Thực phẩm 2 g/l.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguồn nitrogen đến sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp mannitol của chủng *L. fermentum* HF08.

TT	Tỷ lệ nguồn nitrogen (g/l)		Mật độ tế bào (CFU/ml x 10 ⁹)	Hàm lượng mannitol (g/l)
	Peptone	Cao nấm men		
1	10	0	2,47 ± 0,12	73,2 ± 0,79
2	10	2	3,83 ± 0,06	86,27 ± 0,55
3	10	5	4,17 ± 0,06	87,6 ± 0,46
4	10	7	4,0 ± 0,1	86,1 ± 0,3
5	0	2	2,37 ± 0,12	70,4 ± 0,9
6	5	2	3,73 ± 0,06	83,57 ± 1,1
7	7	2	4,17 ± 0,11	87,13 ± 0,83
8	10	2	3,83 ± 0,06	85,5 ± 0,80
9	15	2	3,07 ± 0,21	78,7 ± 1,61

Ảnh hưởng của pH môi trường trong quá trình lên men đến sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp mannitol

Theo một số nghiên cứu cho thấy điều chỉnh pH môi trường trong quá trình lên men sinh tổng hợp mannitol có ảnh hưởng nhiều đến khả năng sinh tổng hợp mannitol. Mỗi loài vi khuẩn có giá trị pH thích hợp cho quá trình sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp mannitol khác nhau. Có những loài thì pH thích hợp cho sinh trưởng nhưng pH thích hợp cho quá

trình sinh tổng hợp lại ở giá trị pH khác (Saha, Racin, 2010). Vì vậy trong thí nghiệm này chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường lên men đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp mannitol của chủng *L. fermentum* HF08. Chủng *L. fermentum* HF08 được hoạt hoá trên môi trường MRS và nhân giống trên môi trường OSCP ở 30°C, 24h. Lên men trên môi trường SP với điều kiện: nhiệt độ 35°C, thời gian lên men 48h, tỷ lệ tiếp giống 7%, trong đó pH môi trường được điều chỉnh các giá trị khác nhau trong quá trình lên men.

Bảng 4. Ảnh hưởng pH môi trường lên men đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp mannitol của chủng *L. fermentum* HF08.

TT	pH lên men	Mật độ tế bào (CFU/ml x 10 ⁹)	Hàm lượng mannitol (g/l)
1	Đ/C	3,77 ± 0,15	87,73 ± 0,85
2	4,0	3,03 ± 0,12	82,27 ± 1,45
3	4,5	4,03 ± 0,05	89,10 ± 0,75
4	5,0	4,23 ± 0,06	93,10 ± 0,40
5	5,5	4,53 ± 0,06	92,63 ± 0,47
6	6,0	4,60 ± 0,00	82,33 ± 0,85
7	6,5	3,70 ± 0,10	78,27 ± 1,55

Kết quả bảng 4 cho thấy, chủng *L. fermentum* HF08 có khả năng sinh tổng hợp mannitol tốt nhất ở pH 5,0-5,5, mặc dù mật độ tế bào ở giá trị pH này không phải là cao nhất. Điều đó cho thấy enzyme MDH hoạt động tốt nhất trong dải pH 5,0-5,5. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu của Rodríguez và cộng sự (2012), Saha, Racin (2010) khi nghiên cứu trên các chủng *Lactobacillus* đều cho thấy pH 5,0 là thích hợp cho quá trình chuyển hoá fructose thành mannitol bởi enzyme MDH.

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp mannitol

Vi khuẩn lactic thuộc loại vi khuẩn ưa ấm, nhưng ở nhiệt độ cao quá hoặc thấp quá đều ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng, phát triển và khả năng trao đổi chất của chúng, tuy nhiên mỗi chủng vi khuẩn lactic đều có nhiệt độ thích hợp riêng của nó.

Vì vậy trong thí nghiệm này, các nhiệt độ được chọn để nghiên cứu là 30; 35; 37; 40 và 45°C với điều kiện lên men: môi trường lên men SP với nồng độ đường fructose/glucose: 100/50 g/l, pH lên men 5,0, thời gian lên men 48 giờ, tỷ lệ tiếp giống 7%.

Kết quả bảng 5 cho thấy nhiệt độ thích hợp cho chủng *L. fermentum* HF08 sinh trưởng tốt trong dải nhiệt độ 30-37°C, nhưng khả năng sinh tổng hợp mannitol tốt nhất ở nhiệt độ 35-37°C. Do vậy, chúng tôi chọn nhiệt độ lên men là 35°C là nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men sinh tổng hợp mannitol để nghiên cứu tiếp theo. Một số nghiên cứu khác cũng đã xác định được nhiệt độ 35°C thích hợp cho quá trình lên men sản xuất mannitol của chủng *Lactobacillus*, có nghiên cứu thì cho thấy nhiệt độ 37°C thích hợp nhất trong quá trình sinh tổng hợp mannitol (Saha, 2003; Saha, Racine, 2011).

Bảng 5. Ảnh hưởng nhiệt độ lên men đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp mannitol của chủng *L. fermentum* HF08.

TT	Nhiệt độ lên men (°C)	Mật độ tế bào (CFU/ml x 10 ⁹)	Hàm lượng mannitol (g/l)
1	30	3,77 ± 0,15	81,0 ± 0,3
2	35	4,27 ± 0,06	92,8 ± 0,3
3	37	4,57 ± 0,05	93,17 ± 0,35
4	40	3,83 ± 0,05	80,4 ± 0,65
5	45	3,07 ± 0,06	66,33 ± 1,06

Ảnh hưởng của thời gian lên men đến sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp mannitol

Thời gian lên men cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng của quá trình lên men và hiệu quả kinh tế. Để xác định được thời gian lên men thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp mannitol đối với chủng *L. fermentum* HF08, thí nghiệm lên men được tiến hành trên môi trường SP với các thời gian lên men khác nhau là 12, 24, 36, 48, 60 và 72 giờ và các điều kiện thí nghiệm: nồng độ cơ chất fructose/

glucose là 100/50 g/l, nhiệt độ 35°C, pH 5,0.

Kết quả bảng 6 cho thấy trong giai đoạn đầu của quá trình lên men, sinh trưởng của chủng vi khuẩn được tăng mạnh trong thời gian 24 giờ đầu, đồng thời hàm lượng mannitol tăng lên đáng kể và đạt cao ở 48 giờ, sau thời gian này thì hàm lượng mannitol tăng không đáng kể, tế bào có chiều hướng già chết dẫn đến tốc độ sinh trưởng giảm xuống, điều này là do chất dinh dưỡng môi trường bị cạn kiệt. Do vậy, thời gian lên men thích hợp được lựa chọn là 48 giờ.

Bảng 6. Ảnh hưởng thời gian lên men đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp mannitol của chủng *L. fermentum* HF08.

TT	Thời gian lên men (giờ)	Mật độ tế bào (CFU/ml x 10 ⁹)	Hàm lượng mannitol (g/l)
1	12	2,47 ± 0,15	43,40 ± 1,08
2	24	3,7 ± 0,1	72,17 ± 0,65
3	36	4,03 ± 0,15	80,60 ± 0,87
4	48	4,37 ± 0,06	93,12 ± 0,4
5	60	4,17 ± 0,06	93,37 ± 0,25
6	72	3,93 ± 0,12	93,53 ± 0,15

KẾT LUẬN

Đã xác định được các điều kiện lên men sinh tổng hợp mannitol bởi chủng *L. fermentum* HF08 trên môi trường SP: nồng độ cơ chất phối hợp fructose/ glucose là 100/50 g/l, nhiệt độ lên men 35-37°C, thời gian lên men 48 giờ, pH lên men 5,0-5,5, nguồn nitrogen hữu cơ là cao nấm men do Viện Công nghiệp Thực phẩm sản xuất với tỷ lệ thích hợp là pepton 7 g/l và cao nấm men 2 g/l. Hàm lượng mannitol trong dịch lên men đạt 93,1-93,2 g/l.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện trên cơ sở trang thiết bị cùng với sự tạo điều kiện giúp đỡ của Ban lãnh đạo và các nhà khoa học tại Viện Công nghiệp Thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Monedero V, Pérez-Martínez G, Yebra MJ (2010) Perspective of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 1003–1015.

Ortiz ME, Bleckwedel J, Raya RR, Mozzi F (2013) Biotechnological and in situ food production of polyols by lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 4713–4726.

Patra F, Tomar SK, and Arora S (2009) Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *J Food Sci* 74(1): 16–23.

Rodríguez C, Rimaux T, Fornaguera MJ, Vrancken G, de Valdez GF, Vuyst LD, Mozzi F (2012). Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. *Appl Microbiol*

Biotechnol 93: 2519–2527.

Rodríguez LG, Aller K, Bru E, De Vuyst L, Hébert EM, Mozzi F (2017) Enhanced mannitol biosynthesis by the fruit origin strain *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(15): 6165–6177.

Saha BC (2003) Production of mannitol by fermentation. In: Saha BC (ed) Fermentation biotechnology. *American Chemical Society*, Washington, DC, pp 67–85.

Saha BC (2005) Method for making mannitol with *Lactobacillus intermedius*. Patent US 6,855,526 B2.

Saha BC, Nakamura LK (2003) Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Biotechnol Bioeng* 82: 864–871.

Saha BC, Racine FM (2010) Effects of pH and corn steep liquor variability on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 553–560.

Saha BC, Racine FM (2011) Biotechnological production of mannitol and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 879–891.

Sanchez J (1998) Colorimetric assay of alditols in complex biological samples. *J Agric Food Chem* 46: 157–160.

Von Weymarn FNW (2002b) High-level production of D-mannitol with membrane cell-recycle bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29: 44–49.

Von Weymarn FNW, Hujanen M, Leisola MSA (2002a) Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Proc Biochem* 37: 1207–1213.

Yue M, Cao H, Zhang J, Li S, Meng Y, Chen W, Huang L, Du Y (2013) Improvement of mannitol production by *Lactobacillus brevis* mutant 3-A5 based on dual-stage pH control and fed-batch fermentations. *World J Microbiol Biotechnol* 29: 1923–1930.

FERMENTATION CONDITIONS FOR MANNITOL BIOSYNTHESIS BY *LACTOBACILLUS FERMENTUM* HF08

Do Trong Hung, Le Duc Manh, Nguyen La Anh, Vu Thi Thuan, Nguyen Thuy Linh, Luong Thi Nhu Hoa, Nguyen Hoang Phi

Food Industries Research Insitute (FIRI)

SUMMARY

Mannitol is a six-carbon sugar alcohol that is claimed to have several health promoting effects (low-caloric, low-glycemic, low-insulinemic, anticariogenic, and prebiotic). Due to its low hygroscopic character, it widely used in food and pharmaceutical industries. In food industry, mannitol is used as sugar replacers because of their taste and sweetness. It is nonmetabolizable sweeteners which do not affect insulin levels making it applicable in diabetic food products. Among mannitol production methods including: chemical, enzyme and fermentation, the conversion of fructose to mannitol by lactic acid bacteria fermentation is the best way because of no requirement for highly purified substrates, making pure product and easy to produce in industry scale. There are many groups of microorganisms capable of fermenting mannitol biosynthesis, including lactic acid bacteria group, because of their conversion of fructose to mannitol by mannitol dehydrogenase with high mannitol content and low byproducts. In the study, we researched on conditions of fermentation for mannitol biosynthesis by *Lactobacillus fermentum* HF08. Mannitol production of the strain was reached to the maximum 93.1-93.2 g/l after 48 hours of fermentation in an appropriate medium (g/l): pepton 7.0; glucose/fructose 50/100; yeast extract 2.0; K₂HPO₄ 2.0; MgSO₄.5H₂O 0.2; MnSO₄ 0.01. The pH of the medium fermentation for the mannitol production was 5.0-5.5. Suitable temperature for mannitol production was 35-37°C.

Keywords: *Lactobacillus fermentum* HF08, mannitol, sugar alcohol, polyols