**TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN LÊN MEN BÁN RẮN KHÔ DẦU ĐẬU NÀNH QUY MÔ PILOT NHẰM NÂNG CAO KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ALPHA-GALACTOSIDASE CỦA *LACTOBACILLUS FERMENTUM* NC1 BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT**

***Phạm Huỳnh Ninh1, Trần Quốc Tuấn2, Nguyễn Thị Hà1 , Vũ Minh1, Bùi Thị Hồng Chiên1***

*1 Phân Viện Chăn nuôi Nam Bộ*

*2Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh*

Tác giả liên hệ: Phạm Huỳnh Ninh, Mobile: 0918369577; Email: ninhpham1980@yahoo.com

**TÓM TẮT**

Phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology) được sử dụng để tối ưu hóa các điều kiện lên men bán rắn khô dầu đậu nành nhằm nâng cao khả năng sinh enzyme alpha (α)-galactosidase của *Lactobacillus fermentum* NC1, giúp phân giải các oligosaccharide kháng dinh dưỡng. Phương pháp này là một phân tích thống kê về tác động của các biến khác nhau đến quy trình lên men và thể hiện được sự tương tác của các biến này với nhau tại một thời điểm. Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học của Phân viện Chăn nuôi Nam bộ từ tháng 2 năm 2018 đến tháng 2 năm 2019. Kết quả cho thấy trong các yếu tố khảo sát bằng thiết kế Plackett-Burman thì 3 yếu tố: nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ giống là có ảnh hưởng nhiều nhất đến quá trình lên men (P<0,05). Từ đó, sử dụng thiết kế Box-Behnken để tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng và đưa ra được các thông số tối ưu là nhiệt độ lên men 30oC sau 30 giờ nuôi cấy và tỷ lệ giống 4% thì *L. fermentum* NC1 sinh enzyme α-galactosidase có hoạt tính cao nhất, cụ thể là hoạt tính enzyme đạt 25,6 U/g canh trường. Với điều kiện tối ưu này, quá trình lên men bán rắn với *L. fermentum* NC1 đã loại bỏ được 83,06% oligosaccharide kháng dinh dưỡng (raffinose, stachyose) trong khô dầu đậu nành.

**Từ khóa:** *alpha-galactosidase, Lactobacillus, khô dầu đậu nành, phương pháp đáp ứng bề mặt*.

**ABSTRACT**

**Optimization of solid-state fermentation conditions with *Lactobacillus fermentum* NC1 to improve alpha-galactosidase in soybean meal at pilot scale using Response Surface Methodology**

The Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize the conditions of soybean meal fermentation process in order to improve the α-galactosidase production ability of *Lactobacillus fermentum* NC1. RSM is a statistical analysis of the impact of different process variables on fermentation process and also displays the interaction of different variables with each other at a time. The study was conducted at the laboratory of Institute of Animal sciences for Southern Vietnam from February 2018 to February 2019. The results showed that among 5 surveyed factors by Plackett-Burman design, three factors such as temperature, time and inoculum size have the most influence on the α-galactosidase production ability of *L. fermentum* NC1 (P < 0.05). The optimal conditions derived from Box-Behnken design for solid-state fermentation of soybean meal by *L. fermentum* NC1 were: temperature = 30oC, time = 30 hours and inoculum size = 4%. Under this optimal condition, the α-galactosidase activity reached to the highest level, at 25.6 U/g and removed 83.06% of antinutritional oligosaccharide (raffinose, stachyose) in soybean meal.

**Key words:** *alpha-galactosidase, Lactobacillus, soybean meal, Response Surface Methodology*.

**ĐẶT VẤN ĐỀ**

Khô dầu đậu nành là sản phẩm của quá trình tách chiết dầu từ hạt đậu nành (chiếm khoảng 74% nguyên liệu đầu vào), chủ yếu được sử dụng để chế biến thức ăn chăn nuôi gà và heo (Chen và cs, 2010). Đây là nguồn cung cấp protein rất tốt cho vật nuôi do có hàm lượng các axít amin không thay thế cao. Tuy nhiên, trong khô dầu đậu nành có chứa các oligosaccharide kháng dinh dưỡng như raffinose và stachyose (chiếm khoảng 5,5-6,2%) và có ảnh hưởng tiêu cực đến năng suất vật nuôi, đặc biệt là vật nuôi giai đoạn non (Anderson và Wolf, 1995; Parsons và cs, 2000; Smiricky và cs, 2002). Stachyose và raffinose làm giảm tỷ lệ tiêu hóa hồi tràng của vật chất khô và năng lượng ở heo (Kempen và cs, 2006), tăng tỷ lệ tiêu chảy (Liying và cs, 2003).

Galactosidase là một nhóm các enzyme có khả năng thủy phân các oligosaccharide chứa gốc galactose. Tùy thuộc vào dạng cấu tử galactose (dạng alpha hay beta) mà galactosidase có hai nhóm khác nhau là α-galactosidase và β-galactosidase. α-galactosidase (EC 3.2.1.22) là enzyme có khả năng phân giải các oligosaccharide kháng dinh dưỡng trong đậu nành. Có khá nhiều nghiên cứu về việc sinh tổng hợp enzyme α-galactosidase của vi sinh vật được công bố. Cruz và cs (1981), Fuller (1992) chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn lên men lactic acid như *Lactobacillus* có khả năng thủy phân các liên kết α-galactoside thành dạng carbohydrate có thể tiêu hóa được thông qua quá trình lên men. Một tính chất nổi trội có triển vọng ứng dụng của enzyme α-galactosidase đối với ngành chăn nuôi là khả năng phân giải các oligosaccharide kháng dinh dưỡng trong đậu nành bao gồm raffinose, stachyose và verbasco (Carevíc và cs, 2016). Gần đây, Du và cs (2012) đã phân lập được chủng *Lactobacillus salivarius* XA1R, XH4B và *Pediococcus acidilactici* XS1B từ 28 loại thực phẩm lên men từ thực vật của Trung Quốc có khả năng lên men tốt khô dầu đậu nành và các phụ phẩm ngành nông nghiệp khác đồng thời sản sinh ra α-galactosidase với hoạt tính enzyme là 5,81-5,92 U/ml trên cơ chất là khô dầu đậu nành.

Quá trình lên men khô dầu đậu nành bằng *Lactobacillus* chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau.Vì vậy, tối ưu điều kiện lên men là rất quan trọng để *Lactobacillus* sinh enzyme α-galactosidase có hoạt tính cao nhất. Tối ưu hóa quy trình lên men bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology – RSM) là cách tiếp cận hiệu quả hơn so với phương pháp nghiên cứu truyền thống khảo sát từng yếu tố. Phương pháp nghiên cứu truyền thống 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 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 (Plackett và Burman, 1946). Phương pháp RSM gồm các kỹ thuật toán học, thống kê để mô hình hóa và phân tích các vấn đề (thiết kế, phát triển, tối ưu quy trình)(Khuri và Mukhopadhyay, 2010). Do được tích hợp các kỹ thuật hồi quy, phân tích ANOVA nên RSM làm giảm đáng kể số thí nghiệm phải tiến hành. Sử dụng RSM gồm 3 bước: sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng chính, xác định khoảng tối ưu của từng yếu tố và ước lượng mô hình đáp ứng nhằm xác định tổ hợp tối ưu giá trị của các yếu tố đầu vào.

Mục tiêu nghiên cứu: Sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt để tối ưu hóa một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sản sinh α-galactosidase của *Lactobacillus fermentum* NC1 sử dụng trong lên men bán rắn khô dầu đậu nành.

**VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**Vật liệu nghiên cứu**

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus* *fermentum* NC1 được phân lập từ các sản phẩm lên men tự nhiên.

Khô dầu đậu nành Argentina được nghiền nhỏ qua rây có kích thước 1mm.

Khay lên men inox có kích thước 50 cm x 80 cm x 8 cm (ngang x dài x cao).

**Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học của Phân việc Chăn nuôi Nam bộ từ tháng 02/2018 đến tháng 02/2019.

**Phương pháp lên men bán rắn quy mô pilot**

Khô dầu đậu nành được bổ sung nước đạt độ ẩm 60% và được hấp khử trùng (hấp cách thủy) ở 100oC trong 120 phút. Khô dầu đậu nành sau khi hấp khử trùng được bổ sung giống *L. fermentum* NC1 và tiến hành lên men trên khay inox (50 cm x 80 cm x 8 cm). Toàn bộ khay được bao bọc với màng PE nhằm tạo điều kiện kỵ khí cũng như hạn chế việc mất độ ẩm.

**Đinh lượng enzyme α-galactosidase**

Hoạt tính enzyme α-galactosidase được xác định theo phương pháp Dey và Pridham (1972) dựa trên nguyên tắc tạo màu của p-nitrophenol được giải phóng ra khi enzyme α-galactosidase phân giải cơ chất p-nitrophenyl-α-d-galactopyranoside (pNPG) ở bước sóng 450 nm.

Cân 5g khô dầu đậu nành đã được lên men bằng chủng vi khuẩn *L. fermentum* NC1, bổ sung 15 ml đệm acetate 0,2 M (pH 5) và phá tế bào bằng máy sonicator trên nước đá trong 7 phút. Sau đó ly tâm 4000 vòng trong 10 phút, thu dịch enzyme.

Lấy 400 μl đệm acetate 0,2 M (pH 5), 50 μl cơ chất pNPG 10 mM và bổ sung 50 μl dịch enzyme, ủ ở 50oC trong 10 phút. Dừng phản ứng bằng 500 μl dung dịch Na2CO3 0,5 M. Đo độ hấp thụ của dung dịch phản ứng ở bước sóng 450 nm. Một đơn vị hoạt tính (U) được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μmol p-nitrophenol từ pNPG trong 1 ml dịch phản ứng trong 1 phút dưới các điều kiện phản ứng.

**Định lượng oligosaccharide kháng dinh dưỡng**

Hàm lượng raffinose và stachyose trong khô dầu đậu nành được phân tích bằng bộ Raffinose/Sucrose/D-Glucose Assay Kit của hãng Megazyme. Quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Màu của dung dịch phản ứng được đo ở bước sóng 510 nm sử dụng máy đo quang phổ Ultrospec 7000 của Thụy Điển.

**Tối ưu hóa và thiết kế thí nghiệm**

***Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng chính đến hoạt tính* α-galactosidase**

Sau khi có được kết quả của các thí nghiệm đơn yếu tố để làm cơ sở chọn lựa khoảng biến thiên giá trị phù hợp cho từng yếu tố, bố trí thí nghiệm sàng lọc các yếu tố bằng thiết kế Plackett-Burman nhằm xác định yếu tố có tác động lớn tới quá trình lên men.

Thiết kế Plackett-Burman cho phép đánh giá các yếu tố có mức ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh tổng hợp enzyme α-galactosidase, mỗi yếu tố được kiểm tra ở hai mức độ: mức thấp (-1) và mức cao (+1) theo như bảng 1. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, quá trình lên men được thực hiện trong khay. Chỉ tiêu theo dõi là hoạt tính enzyme α-galactosidase thu được từ quá trình lên men. Kết quả nghiên cứu được phân tích bằng chương trình “Design Expert® version 11”.

Bảng 1. Các biến trong ma trận Plackett-Burman

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Yếu tố | Đơn vị | Ký hiệu | Mức | | Mức độ ảnh hưởng | |
| Thấp (-1) | Cao (+1) | Ảnh hưởng | P value |
| Nhiệt độ | ºC | A | 30 | 40 | -3,84a | 0,0101 |
| Thời gian | giờ | B | 24 | 72 | -2,35a | 0,0145 |
| Tỷ lệ giống | % | C | 1 | 5 | 2,01a | 0,0271 |
| Độ dày | cm | D | 1 | 7 | -1,30b | 0,1090 |
| pH | - | E | 4 | 7 | -1,67b | 0,0522 |

a Có ý nghĩa ở độ tin cậy α≤0,05; b Không có ý nghĩa ở độ tin cậy α>0,05Bảng 2. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nghiệm thức | Các biến | | | | | Hoạt tính enzyme  α-galactosidase (U/g) | |
| A | B | C | D | E | Thực nghiệm | Mô hình |
| 1 | +1 | -1 | +1 | +1 | +1 | 5,41 | 5,74 |
| 2 | -1 | -1 | +1 | -1 | -1 | 18,59 | 16,80 |
| 3 | +1 | +1 | +1 | -1 | -1 | 4,38 | 6,98 |
| 4 | +1 | -1 | -1 | +1 | -1 | 2,46 | 5,06 |
| 5 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | 9,14 | 9,49 |
| 6 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | 5,03 | 4,32 |
| 7 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | 11,26 | 10,86 |
| 8 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 12,80 | 12,78 |
| 9 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | 1,28 | 2,14 |
| 10 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | 4,71 | 3,64 |
| 11 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | 4,09 | 0,36 |
| 12 | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | 3,74 | 4,74 |

***Tối ưu hóa giá trị của các yếu tố chính ảnh hưởng đến hoạt tính α-galactosiadse của L.fermentum NC1 bằng thiết kế Box-Behnken***

Sau khi xác định được các yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình lên men, bố trí thí nghiệm theo thiết kế Box-Behnken nhằm xác định giá trị tối ưu nhất của các yếu tố chính cho quá trình lên men. Trong ma trận thiết kế Box-Behnken, mỗi yếu tố được đánh giá ở 3 mức (-1, 0 và +1) theo như bảng 3. Ma trận thiết kế thí nghiệm gồm 17 nghiệm thức, trong đó có 5 nghiệm thức trung tâm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Quá trình lên men được thực hiện trong khay, độ dày lên men 4 cm, pH 5,5. Chỉ tiêu theo dõi là hoạt tính enzyme α-galactosidase.

Bảng 3. Các yếu tố trong thiết kế Box-Behnken

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ký hiệu | Yếu tố | Đơn vị | Khoảng biến thiên | Mức | | |
| Dưới (-1) | Cơ sở (0) | Trên (+1) |
| A | Nhiệt độ | oC | 30 - 40 | 30 | 35 | 40 |
| B | Thời gian | giờ | 24 - 72 | 24 | 48 | 72 |
| C | Tỷ lệ giống | % | 1 - 5 | 1 | 3 | 5 |

Xây dựng mô hình hàm bậc hai cho 3 yếu tố từ các kết quả thí nghiệm dựa vào phân tích thống kê bằng phần mềm Design Expert® version 11. Hàm mục tiêu tổng quát có dạng:

Y = B0 + B1X1 + B2X2 + B3X3 + B12X1X2 + B13X1X3 + B23X2X3 + B11X12 + B22X22 + B33X32

Trong đó Y là hoạt tính α-galactosidase (U/g canh trường); B1, B2, B3 là các hệ số bậc 1; B11, B22, B33 là hệ số bậc 2; B12, B13, B23 là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; X1, X2, X3, X12, X13, X23, X12, X22, X32 là các biến độc lập .

Sau khi xây dựng được mô hình của mặt đáp ứng, chọn tổ hợp các giá trị của các biến đầu vào trong khoảng khảo sát của chúng sao cho hàm mục tiêu đạt giá trị cao nhất.

Bảng 4. Thiết kế Box-Behnken

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Thí nghiệm | Các biến | | | | | Hoạt tính α-galactosidase (U/g) | |
| A | B | | C | | Thực nghiệm | Mô hình |
| 1 | 35 | | 48 | | 3 | 20,87 | 19,86 |
| 2 | 30 | | 48 | | 5 | 21,65 | 21,26 |
| 3 | 30 | | 48 | | 1 | 6,53 | 6,82 |
| 4 | 40 | | 48 | | 1 | 2,16 | 2,55 |
| 5 | 35 | | 72 | | 5 | 4,45 | 5,10 |
| 6 | 35 | | 48 | | 3 | 19,81 | 19,86 |
| 7 | 35 | | 24 | | 1 | 8,38 | 7,73 |
| 8 | 40 | | 72 | | 3 | 1,65 | 1,29 |
| 9 | 30 | | 24 | | 3 | 22,27 | 22,63 |
| 10 | 35 | | 72 | | 1 | 1,89 | 1,87 |
| 11 | 35 | | 48 | | 3 | 19,94 | 19,86 |
| 12 | 40 | | 48 | | 5 | 0,29 | 0,0025 |
| 13 | 30 | | 72 | | 3 | 8,45 | 8,19 |
| 14 | 40 | | 24 | | 3 | 3,74 | 4,00 |
| 15 | 35 | | 24 | | 5 | 16,37 | 16,40 |
| 16 | 35 | | 48 | | 3 | 18,81 | 19,86 |
| 17 | 35 | | 48 | | 3 | 19,86 | 19,86 |

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

***Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính* α-galactosidase *của L. fermentum* NC1 trên môi trường khô nành bán rắn**

Kết quả ma trận Plackett-Burman (Bảng 2) cho thấy, hoạt tính α-galactosidase giữa thực nghiệm và mô hình có sự chênh lệch không đáng kể. Vì vậy, số liệu thu được từ thực nghiệm là có độ tin cậy.

Theo kết quả phân tích ở bảng 1 thấy rằng có 3 yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính α-galactosidase của *L. fermentum* NC1 trên môi trường khô dầu đậu nành là nhiệt độ, thời gian lên men và tỷ lệ giống (P ≤ 0,05). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Garro và cs (2004) khi cho thấy rằng nhiệt độ và thời gian lên men ảnh hưởng rất lớn đối với khả năng sản sinh α-galactosidase của vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*. Từ kết quả này, ba yếu tố ảnh hưởng chủ yếu đến hoạt tính enzyme α-galactosidase là nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ giống sẽ được tối ưu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt.

***Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính α-galactosidase bằng phương pháp đáp ứng bề mặt***

Thiết kế Box-Behnken được thực hiện trên 3 yếu tố ở 3 mức gồm 17 nghiệm thức, trong đó giá trị trung tâm được lặp lại 5 lần và chỉ tiêu theo dõi là hoạt tính enzyme α-galactosidase được thể hiện trong bảng 4. Kết quả cho thấy hoạt tính enzyme α-galactosidase biến thiên trong khoảng 0,29 U/g đến 22,27 U/g canh trường. Bên cạnh đó, số liệu thực nghiệm không có sự chênh lệch đáng kể so với mô hình đưa ra, nên kết quả thu được có độ tin cậy.

Bảng 5. Kết quả phân tích ANOVA thiết kế Box-Behnken của *L. fermentum* NC1

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nguồn biến thiên | Tổng bình phương | Bậc tự do | Trung bình bình phương | F-value | p-value |
| Model | 1146,08 | 9 | 127,34 | 231,89 | < 0.0001 |
| A – Nhiệt độ | 387,72 | 1 | 387,72 | 706,04 | < 0.0001 |
| B – Thời gian | 42,53 | 1 | 42,53 | 77,44 | < 0.0001 |
| C – Tỷ lệ giống | 3,86 | 1 | 3,86 | 7,04 | 0,0328 |
| AB | 34,40 | 1 | 34,40 | 62,64 | < 0.0001 |
| AC | 72,17 | 1 | 72,17 | 131,41 | < 0.0001 |
| BC | 7,37 | 1 | 7,37 | 13,42 | 0,0080 |
| A² | 126,11 | 1 | 126,11 | 229,65 | < 0.0001 |
| B² | 120,87 | 1 | 120,87 | 220,10 | < 0.0001 |
| C² | 190,58 | 1 | 190,58 | 347,05 | < 0.0001 |
| Phần dư | 3,84 | 7 | 0,5491 |  |  |
| Sự thiếu phù hợp | 1,71 | 3 | 0,5708 | 1,07 |  |
| Sai số | 2,13 | 4 | 0,5329 |  |  |
| Tổng | 1149,92 | 16 |  |  |  |

R2=0,9967; R2-điều chỉnh=0,9924; R2-dự đoán=0,9733; Độ chính xác thích hợp=39,81

Kết quả phân tích ANOVA (bảng 5) cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê (P<0,0001), hệ số hồi quy R2=0,9967>0,75 chứng tỏ mô hình tương thích với thực nghiệm. Hơn nữa,giá trị R2 dự đoán là 0,9733 phù hợp với R2 điều chỉnh là 0,9924 (độ lệch 0,0191<0,2), độ chính xác thích hợp AP (adequate precision) dùng để định hướng cho không gian thiết kế phải có giá trị lớn hơn 4 (AP= 39,81>4). Vì vậy, mô hình thí nghiệm có ý nghĩa thống kê, có độ tin cậy cao và sử dụng để phân tích xác định thông số tối ưu.

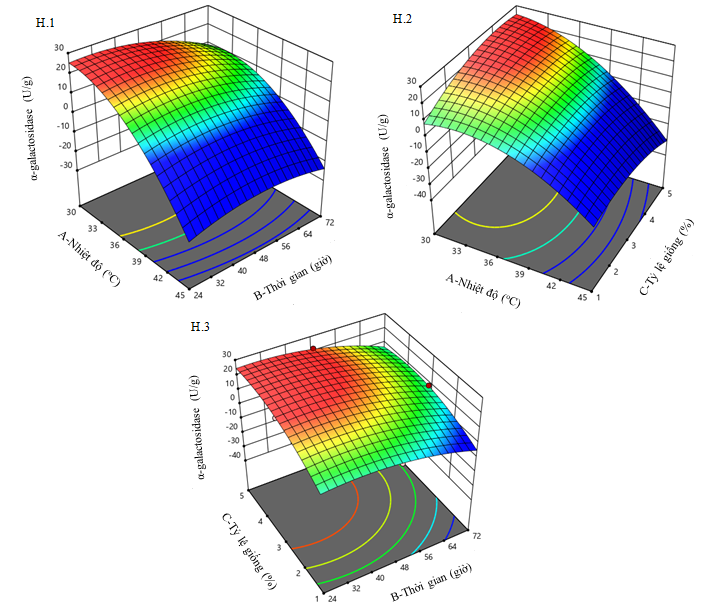
Bảng 6. Các hệ số trong phương trình hàm mục tiêu

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Yếu tố | Hệ số ước tính | Bậc tự do | Sai số chuẩn | 95% CI thấp | 95% CI cao | VIF |
| Intercept | 15,30 | 1 | 0,3282 | 14,52 | 16,07 |  |
| A- Nhiệt độ | -17,78 | 1 | 0,6692 | -19,37 | -16,20 | 2,90 |
| B- Thời gian | -2,82 | 1 | 0,3209 | -3,58 | -2,06 | 1,50 |
| C- Tỷ lệ giống | 0,8512 | 1 | 0,3209 | 0,0925 | 1,61 | 1,50 |
| AB | 4,40 | 1 | 0,5558 | 3,08 | 5,71 | 1,50 |
| AC | -6,37 | 1 | 0,5558 | -7,69 | -5,06 | 1,50 |
| BC | -1,36 | 1 | 0,3705 | -2,23 | -0,4814 | 1,00 |
| A2 | -12,31 | 1 | 0,8126 | -14,24 | -10,39 | 2,91 |
| B2 | -5,36 | 1 | 0,3611 | -6,21 | -4,50 | 1,01 |
| C2 | -6,73 | 1 | 0,3611 | -7,58 | -5,87 | 1,01 |

Dựa vào bảng 6 có thể xác định phương trình hàm mục tiêu như sau:

Y=15,30 – 17,78A – 2,82B + 0,8512C + 4,40AB – 6,37AC – 1,36BC – 12,31A2 – 5,36B2 – 6,73C2

Trong đó, Y là hoạt tính enzyme α-galactosidase (U/g), A là nhiệt độ lên men (oC), B là thời gian lên men (giờ), C là tỷ lệ giống bổ sung (%). Phương trình hồi quy được sử dụng như là một mô hình để dự đoán hoạt tính enzyme α-galactosidase.



Hình 1. Mặt đáp ứng hoạt tính enzyme α-galactosidase theo hai yếu tố: H.1: Nhiệt độ (A)-Thời gian (B) với tỷ lệ giống 4%; H.2: Nhiệt độ (A) – Tỷ lệ giống (C) với thời gian 30 giờ;  
 H.3: Thời gian (B) – Tỷ lệ giống (C) với nhiệt độ 30oC.

Để thấy được mối tương quan giữa các yếu tố, đồ thị bề mặt ba chiều tương tác được xây dựng với trục Z là hoạt tính α-galactosidase và hai biến độc lập bất kỳ, trong khi duy trì biến còn lại ở mức tối ưu của chúng. Kết quả ở hình H.1 cho thấy hoạt tính của α-galactosidase lớn hơn 20 U/g khi nhiệt độ ở 30-33oC tại 24 - 48 giờ. Trong khi đó hình H.2 và H.3 đều cho thấy ở nồng độ giống 4-5% thì hoạt tính enyme đạt cao nhất. Với các dữ liệu thu được và phương trình hồi quy mức tối ưu của các yếu tố khảo sát được xác định lần lượt là: nhiệt độ lên men 30oC, thời gian lên men 30 giờ và tỷ lệ giống là 4%. Với các yếu tố được tối ưu thì hoạt tính enzyme α-galactosidase đạt được là 25,6 U/g, tăng 15% so với trước khi tối ưu.

Nhằm kiểm tra độ chính xác của mô hình và hiệu quả phân giải các oligosacharide kháng dinh dưỡng của quá trình lên men, chúng tôi tiến hành lên men khô dầu đậu nành với chủng vi khuẩn *L. fermentum* NC1 theo các điều kiện tối ưu đã xác định như trên. Kết quả cho thấy, sau 30 giờ lên men với chủng vi khuẩn *L. fermentum* NC1 hàm lượng các oligosacharide kháng dinh dưỡng trong khô dầu đậu nành giảm mạnh (raffinose và stachyose) giảm được 83,06%. Như vậy việc lên men với *L. fermentum* NC1 cho hiệu quả cao trong phân giải các oligosacharide kháng dinh dưỡng trong khô dầu đậu nành. Việc loại bỏ hoàn toàn các oligo-saccharide kháng dinh dưỡng là yêu cầu cấp thiết trong việc sử dụng khô dầu đậu nành trong thức ăn cho heo con nhằm tối ưu hóa khả năng hấp thu các chất dinh dưỡng. Lên men với vi khuẩn có khả năng sinh enzyme α-galactsidase để loại bỏ các olgosaccharide đã được nghiên cứu trên thế giới, tuy nhiên, hiện tại chưa có bất kỳ nghiên cứu nào dạng này được công bố tại Việt Nam. Hướng nghiên cứu này cần được tiếp tục tập trung vào việc nâng cao hoạt tính enzyme α-galactsidase cũng như đo lường lượng axit lactic sinh ra vì đây là một axit hữu cơ rất tốt cho hệ tiêu hóa của heo con. Các chỉ tiêu chất lượng của khô dầu đậu nành và các chất gây dị ứng như glycinine hay β-conglycinine cũng cần được theo dõi.

**KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ**

**Kết luận**

Từ năm yếu tố ban đầu, nghiên cứu đã lựa chọn được ba yếu tố có ảnh hưởng hoạt tính của α-galactosidase trong quá trình lên men khô dầu đậu nành bằng *Lactobacillus fermentum* NC1 là nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ giống bằng thiết kế Plackett-Burman. Sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken, chúng tôi đã tìm được điều kiện lên men tối ưu cho việc sản sinh enzyme α-galactosidase có hoạt tính cao nhất 25,6 U/g canh trường là nhiệt độ 30oC, 30 giờ nuôi cấy và tỷ lệ giống 4%. Với điều kiện tối ưu này, quá trình lên men bán rắn khô dầu đậu nành với *L. fermentum* NC1 đã loại bỏ được 83,06% oligosaccharide kháng dinh dưỡng (raffinose, stachyose).

**Đề nghị**

Tiếp tục nghiên cứu để phân giải hoàn toàn các oligosachharide kháng dinh dưỡng trong khô dầu đậu nành và cả các protein gây dị ứng, giúp cải thiện chất lượng khô dầu đậu nành sử dụng trong thức ăn chăn nuôi.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất khô dầu đậu nành lên men bán rắn sử dụng trong chăn nuôi” do Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh quản lý.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

[Anderson R.L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Anderson%20RL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=7884537)., [Wolf W.J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wolf%20WJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=7884537)., 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. [The Journal of Nutrition](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7884537) 125, pp.581-588.

Carevíc M., Banjanac K., Corovíc M., Jakovetíc S., Milivojevíc A., Vukasinovíc-Sekulíc M., Bezbradica D., 2016. Selection of lactic acid bacteria strain simultaneous production of α-and β-galactosidases. Scientific paper, Zastita Materijala 57, pp.265-273.

Chen C.C., Shih Y.C., Chiou P.W.S., Yu B., 2010. Evaluating nutritional quality of single stage- and two stage-fermented soybean meal. Asian-Aust. J Anim Sci 23, pp.598-606.

Cruz R., Bastistela J.C., Wosiacki G., 1981. Microbial α-galactosidase for soybean processing. *J.Food Sci. 46,* pp.1196-1200.

Dey P.M. and Pridham J.B., 1972. BioChemistry of α-galactosidase. Adv Enzymol 36, pp. 911-930.

Du X.Y., Mao C.Q., Gao X.Y., Cui M.L., He G.Q., 2012. Screening of lactic acid bacteria for producing α-galactosidase from Chinese traditional fermented foods. Advance Journal of Food Science and Technology 4(6), pp.372-376.

Fuller R., 1992. History and development of probiotics. In: *Probiotics - The Scientific Basis*. Chapman and Hall, London, England, pp.1-8.

Garro M.S., Valdez G.E.D., Giori G.S.D., 2004. Temperature effect on the biological activity of *Biﬁdobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. Food Microbiology 21, pp. 511–518

Kempen T.A.T.V., Heugten E., Moeser A.J., Muley N.S., Sewalt V.J.H., 2006. Selecting soybean meal characteristics preferred for swine nutrition. Journal of animal science 84(6), pp.1387-1395.

Khuri A.I. and Mukhopadhyay S., 2010. Response surface methodology. John Wiley & Sons, Inc. WIREs Comp Stat 2, pp. 128-149.

Liying Z., Li D., Qiao S., Johnson E.W., Li B., Thacker P.A., Han I.K., 2003. Effects of stachyose on performance, diarrhoea incidence and intestinal bacteria in weanling pigs. Archives of animal nutrition 57(1), pp.1-10.

Parsons C.M., Zhang Y., Araba M., 2000. Nutritional evaluation of soybean meals varying in oligosaccharide content. Poult. Sci. 79, pp.1127–1131.

Plackett R. L., and Burman J.P., 1946. The design of optimum multifactorial experiments Biometrika, 33, pp. 305-325.

Smiricky M.R., Grieshop C.M., Albin D.M., Wubben J.M., Gabert V.M., Fahey J.C., 2002. The influence of soy oligosaccharides on apparent and true ileal amino acid digestibilities and fecal consistency in growing pigs. J. Anim. Sci. 80, pp.2433–2441.