



DOI:10.22144/ctu.jvn.2023.068

ĐÁNH GIÁ VÀ ỨNG DỤNG DỊCH THỦY PHÂN BÃ MEN BIA TRONG SẢN XUẤT ACID LACTIC SỬ DỤNG *Lactobacillus casei*

Lưu Minh Châu¹, Lâm Dương Hồng Thẩm², Nguyễn Ngọc Thanh¹, Bùi Hoàng Đăng Long¹, Huỳnh Xuân Phong¹ và Hà Thanh Toàn^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên ngành Công nghệ Sinh học K45, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Hà Thanh Toàn (email: httoan@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 18/10/2022

Ngày nhận bài sửa: 03/11/2022

Ngày duyệt đăng: 07/11/2022

Title:

Evaluation and application of brewer's spent yeast hydrolysate in the production of lactic acid using *Lactobacillus casei*

Từ khóa:

Acid lactic, bã men bia, dịch thủy phân nấm men, *Lactobacillus casei*

Keywords:

Lactic acid, *Lactobacillus casei*, spent brewer's yeast, yeast hydrolysate

ABSTRACT

This study aimed to analyze main compositions and evaluate the effectiveness of hydrolysate from brewer's spent yeast as an economical nitrogen source to replace commercial yeast extract in a lactic fermentation medium. The main composition in hydrolysate from yeast residue was protein content of 74.45% (dried weight), while carbohydrates and fat were undetected. The total polyphenol content in the yeast hydrolysate was 0.32 mg GAE/mL. The antioxidant capacity at a concentration of 100 μ L/mL could reduce 34.51% of the free radicals of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The protein source of the De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium was entirely replaced by 10% (v/v) hydrolysate, which increased the density of lactic acid bacteria to 8.09 CFU/mL and was not significantly different from that of the commercial MRS medium. The lactic acid content produced was 66.52% of the acid content produced by commercial MRS medium. This study indicates that the hydrolysate from brewer's spent yeast can potentially apply as a protein source in microbial fermentation.

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là phân tích một số thành phần chính và đánh giá hiệu quả của dịch thủy phân bã men bia như một nguồn nitơ có giá trị kinh tế hơn để thay thế chiết xuất nấm men thương mại trong môi trường lên men lactic. Kết quả phân tích thành phần cơ bản trong dịch thủy phân từ bã men bia với hàm lượng protein 74,45% (tính theo vật chất khô) nhưng carbohydrate và chất béo không được phát hiện. Hàm lượng polyphenol tổng hiện diện trong dịch thủy phân nấm men là 0,32 mg GAE/mL và khả năng kháng oxy hóa ở nồng độ 100 μ L/mL có khả năng khử 34,51% gốc tự do của 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Nguồn đạm của môi trường De Man, Rogosa và Sharpe (MRS) được thay thế bằng 10% (v/v) dịch thủy phân cho thấy khả năng làm tăng mật số vi khuẩn lactic đạt 8,09 CFU/mL và khác biệt không có ý nghĩa so với môi trường MRS thương mại. Hàm lượng acid lactic sinh ra đạt 66,52% so với lượng acid sinh ra từ môi trường MRS. Nghiên cứu bước đầu cho thấy dịch thủy phân từ men bia có tiềm năng ứng dụng như nguồn đạm bổ sung trong các quá trình lên men vi sinh vật.

1. GIỚI THIỆU

Acid lactic là một chất hóa học được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp dược phẩm, mỹ phẩm, hóa chất, dệt may và thực phẩm (Wee et al., 2006). Do đó, nhu cầu sử dụng acid lactic ngày càng tăng. Acid lactic có thể được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học và phương pháp lên men. Tuy nhiên, vì các vấn đề liên quan đến môi trường nên phương pháp tổng hợp hóa học không được ưa chuộng nữa. Thay vào đó là sản xuất acid lactic thông qua quá trình lên men lactic bởi các vi sinh vật có khả năng sử dụng các nguồn carbohydrate khác nhau. Trong đó, nhóm vi khuẩn lactic đóng vai trò chính trong quá trình sản xuất acid lactic. Tuy nhiên, vi khuẩn lactic thường được nuôi cấy chủ yếu trên môi trường MRS (De Man, Rogosa và Sharpe) với giá thành khá cao. Trong đó, chi phí của cao nấm men chiếm khoảng 38% tổng chi phí sản xuất acid lactic và điều này đã làm tăng giá thành của acid lactic (Juturu & Wu, 2016). Thực tế cho thấy, trong số nhiều nguồn nitơ, chiết xuất nấm men là nguồn tốt nhất do hàm lượng nitơ cao, giàu acid amin và vitamin. Chính vì vậy, đây là yếu tố không chỉ làm tăng sinh khối mà còn tạo ra sự chuyên hóa acid lactic ở mức độ cao. Do đó, điều quan trọng là phải tìm các giải pháp thay thế bằng nguồn nitơ rẻ tiền hơn. Các nghiên cứu trước đây đã nỗ lực tìm kiếm một số nguồn nitơ có giá trị kinh tế hơn để thay thế một phần hoặc toàn bộ chiết xuất nấm men trong môi trường sản xuất lactic như trong nghiên cứu của Safari et al. (2012) (thủy phân từ vảy cá ngừ), Li et al. (2013) (thủy phân từ hạt bông), Izaguirre et al. (2020) (thủy phân từ chất thải rắn hữu cơ).

Men bia đã qua sử dụng hay còn được gọi là bã men bia là một trong những sản phẩm phụ chiếm khối lượng khá lớn trong ngành công nghiệp sản xuất bia. Bã men bia chiếm khoảng 1,5-2,5% tổng sản lượng bia và là một nguồn cung cấp các thành phần có giá trị (Bekatorou et al., 2015). Chiết xuất men bia đã được chứng minh là giàu protein, chứa nhiều acid amin thiết yếu cũng như khoáng chất và vitamin nhưng lại ít chất béo và đạm (Vieira et al., 2016). Bên cạnh đó, chiết xuất men bia còn được biết đến là một nguồn đầy hứa hẹn của các thành phần có nhiều hoạt tính sinh học như phenolic, flavonoid, carotenoid và peptide (Vieira et al., 2018). Hiện nay, có nhiều phương pháp để thu nhận chiết xuất nấm men. Trong đó, phương pháp tự phân bởi các enzyme nội bào của nấm men phổ biến hơn nhưng diễn ra chậm, năng suất thấp và có nguy cơ hư hỏng do nhiễm vi sinh vật. Quá trình thâm thấu

(plasmolysis) bổ sung chất xúc tác như muối vô cơ hoặc dung môi hữu cơ làm cho sản phẩm chứa nhiều muối và có mùi khó chịu. Ngoài ra, thủy phân bằng acid, kiềm cũng được thực hiện nhưng lại tạo ra các sản phẩm chứa các hợp chất gây ung thư. Quá trình thủy phân bằng enzyme được cho là tốt hơn so với quá trình thủy phân bằng acid nhưng chi phí enzyme cao và có thể không ly giải hoàn toàn tế bào. Bên cạnh đó, còn có các phương pháp phá hủy cơ học bằng sóng siêu âm, nghiền hạt và xử lý áp suất cao.

Nhìn chung, mỗi phương pháp đều có ưu nhược điểm nhất định và có liên quan đến chất lượng cũng như thành phần của chiết xuất nấm men. Do đó, tùy thuộc vào mục đích sản xuất và điều kiện mà lựa chọn phương pháp phá vỡ tế bào cho phù hợp. Trong nghiên cứu này, dịch thủy phân được thu từ men bia bằng phương pháp xử lý ở nhiệt độ cùng với áp suất cao và đánh giá hiệu quả của dịch thủy phân thông qua sự gia tăng mật độ vi khuẩn và khả năng hình thành acid lactic.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Bã nấm men bia được thu từ nhà máy bia Sài Gòn (khu công nghiệp An Nghiệp, xã An Hiệp, huyện Châu Thành, tỉnh Sóc Trăng) và vận chuyển trong can 30 lít đến phòng thí nghiệm. Mẫu nấm men được thu hồi bằng ly tâm và bảo quản ở 4°C (sử dụng tối đa trong 5 ngày).

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus casei* (*L. casei*) được lưu trữ ở phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

Hóa chất: Acid galic (Sigma-Aldrich, Germany), Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Germany), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Tokyo Chemical Industry, Japan), NaOH chuẩn 0,1N (Cemaco, Việt Nam), Na₂CO₃, (Xilong Scientific, Trung Quốc), phenolphthalein, yeast extract (Himedia - Ấn Độ và Angel - Việt Nam).

Môi trường: MRS (De Man, Rogosa và Sharpe) gồm có yeast extract 0,4%, beef extract 0,8%, peptone 1%, D-glucose 2%, K₂HPO₄ 0,2%, MgSO₄ 0,02%, MnSO₄ 0,004%, Tween 80 0,1%, C₂H₃NaO₂ (sodium acetate) 0,5%.

2.2. Thu nhận dịch thủy phân và chuẩn bị dịch vi khuẩn *L. casei*

Bã men bia được ly tâm ở 5.000 vòng trong 15 phút ở 4°C để loại bỏ dịch bia. Nước cất khử trùng được thêm vào bã men bia theo tỉ lệ 1:1 (m/v). Huyền phù được khuấy trong 10 phút và sau đó rửa

hai đến ba lần bằng nước cất đã khử trùng. Sau đó, huyền phù được ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để thu được các tế bào men bia và trữ lạnh cho đến khi sử dụng (Alves et al., 2021). Thu nhận dịch thủy phân bằng phương pháp cơ học được thực hiện như sau: Sinh khối nấm men được phối trộn với nước cất theo tỉ lệ 1:3 và hấp ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút bằng nồi hấp khử trùng. Hỗn hợp sau đó được làm lạnh nhanh trong nước đá khoảng 15 phút; tiến hành ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch phía trên được thu và trữ lạnh ở 4°C (Zarei et al., 2016).

Vi khuẩn *L. casei* từ ống thạch nghiêng được cấy chuyển sang ống nghiệm chứa 9 mL môi trường MRS lỏng (MRS, 1960) để tăng sinh; sau đó, tiến hành ủ lactic ở 37±0,5°C trong 24-36 giờ cho đến khi mật độ đạt được khoảng 10⁸ tế bào/mL.

2.3. Xác định các thành phần cơ bản của dịch thủy phân nấm men

Phần dịch trong được thu và đánh giá thành phần dinh dưỡng dựa trên các chỉ tiêu phân tích (tổng số chất khô, protein, carbohydrate, lipid). Mẫu được gửi phân tích tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm CASE – chi nhánh Cần Thơ.

2.4. Xác định hàm lượng phenolic tổng và khả năng khử gốc DPPH của dịch thủy phân nấm men

Hàm lượng phenolic tổng có trong dịch thủy phân nấm men được xác định theo phương pháp của Yadav & Agarwala (2011) như sau: 1 mL mẫu cho vào ống nghiệm, thêm 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%. Sau 5 phút, 2 mL Na₂CO₃ 2% được thêm vào và vortex đều; ủ trong 45 phút ở nhiệt độ phòng và đo mật độ hấp thụ ở bước sóng 765 nm. Mẫu được pha loãng sao cho mật độ quang đo được trong khoảng đường chuẩn (20-120 µg/mL).

Hai trăm µL mẫu được trộn với 1 mL dung dịch DPPH 0,1 mM. Hỗn hợp được lắc và ủ trong 15 phút trong điều kiện tối. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 517 nm. Mẫu đối chứng (Ac) gồm 200 µL ethanol và 1 mL DPPH 0,1 mM (Ye et al., 2013). Khả năng kháng oxy hóa được thể hiện qua phần trăm ức chế DPPH (%) = (Ac-As)/Ac×100. Trong đó: Ac là bước sóng đo được của mẫu đối chứng; As là bước sóng đo được của mẫu thử.

2.5. Khảo sát ảnh hưởng của dịch thủy phân đến khả năng tăng trưởng của *L. casei*

Sử dụng 45 mL môi trường MRS (không chứa đạm) cho vào bình tam giác 100 mL và bổ sung dịch thủy phân nấm men theo tỉ lệ 10, 20, 30 và 40%

(v/v); tiến hành khử trùng nhiệt ướt ở 121°C trong 20 phút. Đổ dung dịch nguội đến khoảng 30-37°C, sau đó chủng 5 mL dung dịch vi khuẩn *L. casei* (mật số 10⁶ tế bào/mL) được cho vào bình tam giác chứa sẵn cơ chất, lắc nhẹ để vi khuẩn phân tán đều trong môi trường. Sau khi đậy kín nắp, các bình tam giác được chuyển vào tủ ủ ở 37±0,5°C. Môi trường đối chứng âm là môi trường MRS không chứa đạm bao gồm D-glucose 2%, K₂HPO₄ 0,2%, MgSO₄ 0,02%, MnSO₄ 0,004%, Tween 80 0,1%, C₂H₃NaO₂ (sodium acetate) 0,5%. Môi trường đối chứng dương bao gồm MRS tổng hợp có chứa cả yeast extract 0,4%, beef extract 0,8%, peptone 1% (MRStH); MRS chỉ chứa yeast extract của hãng Himedia 2,2% (MRSHi) và MRS chỉ chứa yeast extract của hãng Angel 2,2% (MRSAn). Khả năng tăng trưởng của *L. casei* được xác định thông qua số khuẩn lạc đếm được sau 30 giờ nuôi cấy bằng phương pháp đếm nhỏ giọt (Naghili et al., 2013).

2.6. Khảo sát ảnh hưởng của dịch thủy phân đến khả năng sinh acid lactic của *L. casei*

Cho 45 mL môi trường MRS (không chứa đạm) được bổ sung thêm đường để đạt tỉ lệ 2%, 4% và 6% D-glucose trong bình tam giác 100 mL và tiếp tục bổ sung dịch thủy phân nấm men theo tỉ lệ thích hợp từ thí nghiệm trên (v/v); tiến hành khử trùng nhiệt ướt ở 121°C trong 20 phút. Môi trường nguội và chủng 5 mL dung dịch vi khuẩn *L. casei* (mật số vi khuẩn là 10⁶ tế bào/mL) được cho vào bình tam giác chứa sẵn cơ chất, lắc nhẹ để vi khuẩn phân tán đều trong môi trường. Sau khi đậy kín nắp, các bình tam giác được chuyển vào tủ ủ ở 37±0,5°C. Môi trường đối chứng tương tự như thí nghiệm trên. Hàm lượng acid lactic sinh ra trong 7 ngày được xác định bằng phương pháp chuẩn độ (Nguyen & Hwang, 2016).

2.7. Phương pháp phân tích số liệu

Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ). Số liệu được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ) và Design Expert 7.0 (StatEase Inc., Hoa Kỳ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần cơ bản của dịch thủy phân nấm men

Thành phần cơ bản của dịch thủy phân nấm men sau khi xử lý bằng nhiệt ở 121°C trong 20 phút ở được trình bày ở Bảng 1. Kết quả cho thấy, dịch thủy phân thu được có độ ẩm cao đạt 96,83%, tương ứng với hàm lượng chất khô đạt 3,17%. Trong đó, lượng protein chiếm tỉ lệ khá cao với 74,45% (tính theo vật

chất khô). Điều này cho thấy, dưới tác động của nhiệt độ và áp suất cao, các tế bào nấm men bia đã bị phá vỡ. Từ đó, các thành phần bên trong tế bào được giải phóng ra bên ngoài mà protein được xem là thành phần chính trong các chất chiết xuất từ nấm men. Kết quả từ nghiên cứu này có sự tương đồng với nghiên cứu của Jacob et al. (2019), khi so sánh ảnh hưởng của các phương pháp phá vỡ trong việc sản xuất chiết xuất nấm men từ men bia đã qua sử dụng. Kết quả cho thấy thành phần dinh dưỡng có sự khác nhau giữa các phương pháp ly giải tế bào,

trong đó ghi nhận phương pháp tự phân cho hàm lượng protein cao nhất, đạt 74,3%. Tuy nhiên, kết quả này cao hơn so với các kết quả được đề cập trong các nghiên cứu trước đây. Cụ thể là trong nghiên cứu của Vieira et al. (2016), khi xác định đặc điểm của chiết xuất nấm men được điều chế bằng cách phá vỡ cơ học cho thấy hàm lượng protein đạt 64,1%. Bên cạnh đó, Podpora et al. (2016) báo cáo rằng hàm lượng protein trong hai chiết xuất nấm men từ nấm men lần lượt là 62,5-63,8%.

Bảng 1. Thành phần cơ bản của dịch thủy phân nấm men

Chỉ tiêu phân tích	Kết quả	Đơn vị tính	Phương pháp
Độ ẩm	96,83	%	TCVN 4326:2001
Protein	2,36 (nitơ tổng x 6,25)	%	TCVN 4328-1:2007
Carbohydrate	0,00	%	CASE.NS.0079
Béo thô	< MDL = 0,02	%	TCVN 4331:2001

Ghi chú: Kết quả được phân tích tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm CASE – chi nhánh Cần Thơ.

MQL: ngưỡng định lượng tối thiểu, MDL: ngưỡng phát hiện tối thiểu.

Ngoài hàm lượng protein, các thành phần cơ bản khác như carbohydrate, chất béo của dịch nấm men cũng được phân tích và thể hiện trong Bảng 1. Tuy nhiên, kết quả cho thấy hàm lượng carbohydrate không có trong dịch thủy phân, tương tự, chất béo cũng không được tìm thấy với ngưỡng phát hiện tối thiểu của phương pháp là 0,02%. Nguyên nhân là do tỷ lệ polysaccharide không hòa tan của bã men bia khá cao, chiếm khoảng 83% tổng hàm lượng polysaccharide và ngay cả sau khi xử lý bằng dung dịch kiềm mạnh thì chúng chỉ có thể được hòa tan một phần (Pinto et al., 2015). Kết quả này cho thấy lượng carbohydrate và chất béo thấp hơn nhiều so với nghiên cứu của Vieira et al. (2018), hàm lượng chất béo của dịch chiết từ sinh khối nấm men qua các lần tái sử dụng đều thấp hơn 1%. Ngoài ra, nghiên cứu của Vučurović et al. (2018) ghi nhận kết quả phân tích thành phần của chiết xuất nấm men bổ sung vào bột làm bánh mì cho thấy hàm lượng carbohydrate, chất béo đạt lần lượt là 8,17% và 0,21%. Nhìn chung, các kết quả từ nhiều nghiên cứu chứng tỏ chiết xuất từ men bia giàu protein, chứa ít calo, carbohydrate và chất béo. Chính vì vậy, có thể xem đây là nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất cao nấm men và ứng dụng trong các quá trình lên men.

3.2. Hàm lượng phenolic tổng và khả năng khử gốc DPPH của dịch thủy phân nấm men

Nấm men được biết là có khả năng hấp thụ polyphenol trong quá trình sản xuất bia hoặc khi được nuôi trong môi trường có chứa hàm lượng cao

các hợp chất đó (Rizzo et al., 2006; LeónGonzález et al., 2018). Sự hiện diện của các hợp chất polyphenol trong tế bào nấm men có thể liên quan chặt chẽ đến nguồn nguyên liệu trong quá trình sản xuất bia bao gồm hoa bia (humulones, iso-humulones, lupulones, chalcones và flavones) và mạch nha. Ngoài ra, nấm men dùng trong sản xuất bia thường được tái sử dụng khoảng 4-6 chu kỳ trước khi loại bỏ nhằm tiết kiệm chi phí lên men. Chính vì vậy, mà tế bào nấm men có khả năng hấp thụ polyphenol ở mức độ khác nhau và hình thành các đặc tính để chống chịu với điều kiện của môi trường (Rizzo et al., 2006). Năm 2015, Bryant & Cohen đã xác định các acid từ hoa houblon của nấm men đã qua sử dụng cao hơn nhiều so với các loại bia tương ứng. Do đó, hàm lượng polyphenol tổng của dịch nấm men đã được xác định và đánh giá qua các giá trị mg GAE/mL dịch thủy phân và mg GAE/g chất khô.

Kết quả cho thấy hàm lượng tổng các hợp chất polyphenol có trong dịch thủy phân nấm men là 0,24 mg GAE/mL. Kết quả thấp hơn nhiều so với nghiên cứu của Podpora et al. (2015) khi tự phân bã men bia ở 47°C trong 48 giờ, hàm lượng của các hợp chất polyphenol dao động từ 2,28 đến 3,36 mg GAE/mL và nghiên cứu của Vieira et al. (2017) sau khi tối ưu hóa quá trình tự phân của nấm men bia đã qua sử dụng bằng phương pháp đáp ứng bề mặt cho hàm lượng polyphenol tổng đạt cao nhất là 65,45 mg GAE/mL. Khi xét trên hàm lượng chất khô lại cho thấy hàm lượng polyphenol trong nghiên cứu này cao hơn công bố của Vieira et al. (2016), chiết xuất nấm men được thu hồi bằng phương pháp nghiên cứu chứa hàm lượng polyphenol tổng là 1,16 mg GAE/g.

Tuy nhiên, Podpora et al. (2016) đã xác định các hợp chất phenolic có trong chiết xuất nấm men lên đến 487,3 mg GAE/g. Nhiều nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt đáng kể về hàm lượng phenolic tổng được công bố. Mức độ của các polyphenol này có thể bị thất thoát hoặc biến đổi trong quá trình xử lý bã men bia trước khi chiết xuất hay phương pháp dùng để chiết xuất và thậm chí là các quá trình sấy thu nhận chất khô. Điều này cũng được chứng minh qua nghiên cứu của Jacob et al. (2019), khi các chất chiết xuất tự phân với nhiệt độ 50°C trong 24 giờ cho hàm lượng polyphenol thấp hơn so với các chất chiết xuất thu nhận bằng phương pháp nghiền hoặc siêu âm.

Bên cạnh đó, khi so sánh hàm lượng polyphenol tổng có trong dịch thủy phân nấm men với hàm lượng polyphenol tổng có trong một số loại nước trái cây cho thấy dịch nấm men có chứa một lượng đáng kể các hợp chất phenolic. Wern et al. (2016) đã xác định lượng polyphenol có trong nước trái cây tươi, nước trái cây thương mại và đồ uống có nước trái cây với các giá trị lần lượt trong khoảng 0,14-0,80 mg GAE/mL, 0,22-1,30 mg GAE/mL và 0,03-0,45 mg GAE/mL. Tuy nhiên, hàm lượng polyphenol tổng ở nghiên cứu này (9,98 mg GAE/mL) chỉ bằng khoảng 1/10 hàm lượng polyphenol có trong các chiết xuất từ trà (*Camellia sinensis* 88,2-97,72 mg GAE/mL) và một số loại thảo mộc (*Aspalathus linearis*, *Mentha piperita*, *Matricaria chamomilla* 77,79-96,46 mg GAE/mL) (Cleverdon et al., 2018).

Sau khi xác định hàm lượng polyphenol có trong dịch nấm men, hoạt tính kháng oxy cũng được đánh giá qua phương pháp DPPH. Theo đó, các hợp chất chống oxy hóa sẽ trung hòa gốc DPPH trong dung dịch ethanol bằng cách cho hydrogen để thành dạng DPPH-H. Dẫn đến làm giảm lượng DPPH có trong

dung dịch được thể hiện qua sự giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và làm nhạt dần màu tím của gốc DPPH có trong dung dịch phản ứng, sau đó chuyển sang màu vàng nhạt hoặc không màu. Kết quả thể hiện khả năng kháng oxy của dịch thủy phân ở nồng độ 100 µL/mL (3,17 mg/mL) là 34,51%. Năm 2011, Hassan đánh giá các hoạt tính chống oxy hóa của 2 loại chiết xuất nấm men bánh mì tự phân từ men tươi và men khô bằng phương pháp DPPH cho thấy chiết xuất từ men khô (87,53%) có khả năng chống oxy hóa cao hơn chiết xuất từ men tươi (11,86 %) ở nồng độ 12,5 mg/mL. Điều này cho thấy sự trung hòa các gốc tự do của dịch thủy phân thu nhận từ bã men bia đạt kết quả đáng mong đợi. Ngoài các thành phần enzyme có sẵn trong nấm men như superperoxide dismutase, catalase hoặc glutathione reductase thì hoạt động chống oxy hóa của dịch thủy phân có thể là do các chất không phải enzyme như vitamin, glutathione, ion khoáng hoặc các sản phẩm thủy phân của nấm men như acid amin có chứa lưu huỳnh (Santiago & Mori, 1993). Đặc biệt là hoạt tính kháng oxy được cho là có liên quan chặt chẽ đến sự có mặt của các hợp chất polyphenol từ hoa bia và mạch nha. Từ đó, có thể ứng dụng dịch nấm men như một nguồn nguyên liệu để tăng khả năng chống oxy hóa cho thực phẩm.

3.3. Ảnh hưởng của dịch thủy phân đến khả năng tăng trưởng của *L. casei*

Kết quả phân tích các thành phần cơ bản của dịch thủy phân làm tiền đề cho việc đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung dịch thủy phân trong môi trường đến khả năng tăng trưởng của tế bào vi khuẩn lactic. Sự phát triển của *L. casei* thông qua mật số tế bào được trình bày cụ thể trong Bảng 2 và Hình 1.

Bảng 2. Mật số tế bào (log CFU/mL) vi khuẩn *L. casei* sau 30 giờ nuôi cấy ở các môi trường khác nhau

Môi trường ¹	Mật số tế bào ² (log CFU/mL) vi khuẩn <i>L. casei</i> theo thời gian (giờ)											
	0	2	4	6	8	10	20	22	24	26	28	30
Đối chứng âm	5,07 ^a	5,03 ^b	5,06 ^c	5,03 ^c	5,04 ^f	5,01 ^c	5,12 ^e	5,15 ^e	5,09 ^e	5,11 ^e	5,02 ^c	5,09 ^f
MRSTh	5,17 ^a	5,15 ^{ab}	5,63 ^b	6,17 ^b	6,74 ^c	7,10 ^{ab}	8,36 ^a	8,25 ^a	8,27 ^a	8,22 ^a	8,25 ^a	8,28 ^a
MRSHi	5,06 ^a	5,20 ^{ab}	5,48 ^c	6,17 ^b	6,98 ^a	7,18 ^a	8,17 ^b	8,17 ^{ab}	8,28 ^a	8,17 ^{ab}	8,22 ^a	8,19 ^a
MRSAn	5,25 ^a	5,10 ^{ab}	5,60 ^b	6,28 ^{ab}	6,84 ^b	7,02 ^b	8,14 ^{bc}	8,06 ^{bc}	8,12 ^b	8,07 ^{ab}	8,12 ^a	7,96 ^b
NĐ10	5,13 ^a	5,07 ^{ab}	5,30 ^d	6,10 ^b	6,48 ^e	6,95 ^b	8,09 ^{bc}	8,04 ^c	7,80 ^{cd}	7,78 ^{cd}	7,78 ^b	7,74 ^c
NĐ20	5,14 ^a	5,18 ^{ab}	5,57 ^b	6,07 ^b	6,60 ^d	7,00 ^b	8,01 ^c	7,98 ^c	7,65 ^d	7,65 ^d	7,60 ^b	7,54 ^{de}
NĐ30	5,12 ^a	5,12 ^{ab}	5,80 ^a	6,29 ^{ab}	6,83 ^{bc}	7,10 ^{ab}	7,72 ^d	7,80 ^d	8,06 ^{bcd}	7,95 ^{bc}	7,63 ^b	7,44 ^e
NĐ40	5,18 ^a	5,31 ^a	5,63 ^b	6,52 ^a	6,97 ^a	7,07 ^{ab}	7,67 ^d	7,78 ^d	8,10 ^{bc}	7,97 ^{abc}	7,74 ^b	7,65 ^{cd}

Ghi chú: ¹Môi trường MRSTh: môi trường MRS có chứa yeast extract 0,4%, beef extract 0,8%, peptone 1%; MRSHi: môi trường MRS có chứa yeast extract 2,2% (Himedia); MRSAn: môi trường MRS có chứa yeast extract 2,2% (Angel); NĐ10: môi trường MRS có chứa 10% dịch thủy phân; các môi trường còn lại tương ứng với các nồng độ dịch thủy phân tăng dần (20, 30, 40%); ²Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại; Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Có thể thấy, mật số tế bào của môi trường không chứa đạm có sự thay đổi không đáng kể trong 30 giờ khảo sát. Riêng các môi trường đôi chúng và môi trường thử nghiệm đều cho thấy sự phát triển của vi khuẩn lactic. Trong khoảng 10 giờ đầu, các tế bào bắt đầu tăng trưởng với mật số nằm trong khoảng 6,95-7,18 log CFU/mL và 10 giờ tiếp theo, mật số tế bào ở các môi trường khảo sát có sự thay đổi rõ hơn (Hình 3). Cụ thể là môi trường MRSTh đạt 8,36 log CFU/mL và có khác biệt ý nghĩa so với các môi trường còn lại. Trong đó, môi trường MRSHi, MRSA_n và môi trường có bổ sung dịch nấm men ở nồng độ 10% và 20% cho kết quả mật số tế bào không có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Riêng môi trường bổ sung dịch thủy phân ở nồng độ 30% và 40% đạt mật số thấp nhất với các giá trị lần lượt là 7,72 và 7,67 log CFU/mL và khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, ở thời gian 24 giờ tăng sinh, 2 môi trường này bắt đầu đạt đỉnh sinh trưởng với mật số tế bào là 8,06-8,10 log CFU/mL. Sau thời gian đó, số lượng tế bào trong môi trường thử nghiệm được bổ sung 10% và 20% dịch thủy phân lại có xu hướng giảm dần theo thời gian. Các môi trường bổ sung các nguồn đạm thương mại dường như không có sự thay đổi rõ rệt về mật số tế bào trong các giờ khảo sát tiếp theo.

Một cách tổng quan, có thể thấy vi khuẩn *L. casei* phát triển mạnh mẽ trong môi trường MRSTh cũng như MRS chỉ chứa cao nấm men Hi và An. Nguyên nhân là do việc phối hợp các nguồn đạm góp phần đa dạng các chất dinh dưỡng hay việc lựa chọn nguồn cao nấm men giàu chất dinh dưỡng để bổ sung vào môi trường nuôi cấy cũng giúp tăng cường hoạt động tế bào và hiệu suất tăng trưởng của vi khuẩn lactic. Choi et al. (2021), cho thấy chiết xuất từ mạch nha hay chiết xuất từ thịt bò cũng không mang hiệu quả cho sự phát triển của *L. plantarum* 200655. Tuy nhiên, chiết xuất nấm men lại cho sinh khối tối đa (1,722 g/L), tiếp theo là đậu nành (1,480 g/L) và tryptone (1,371 g/L). Điều này chứng minh, chiết xuất từ nấm men là nguồn cung cấp vitamin, acid amin và peptide phong phú và đã được ghi nhận là có tác dụng tăng cường kích thích tăng trưởng của vi khuẩn lactic khi được sử dụng trong môi trường nuôi cấy (Liu et al., 2010). Hơn nữa, nghiên cứu của Gaudreau et al. (1999) lại cho thấy 9 vi khuẩn lactic thử nghiệm phát triển tốt hơn trong môi trường chứa cao nấm men bánh mì hơn là cao nấm men bia. Tuy nhiên, nhược điểm cần được quan tâm là chi phí chiết xuất từ men bánh mì cao hơn men bia.

Bên cạnh đó, vi khuẩn *L. casei* cũng có thể tăng trưởng trong môi trường thử nghiệm được bổ sung dịch thủy phân nấm men. Trong đó, nồng độ bổ sung 10% và 20% cho thấy tốc độ phát triển gần như tương đương với môi trường đạm thương mại và ở nồng độ bổ sung 30% và 40% lại cho tốc độ sinh trưởng chậm hơn. Điều này có thể giải thích là do khi bổ sung 10% đến 20% dịch thủy phân nấm men thì môi trường đã đủ cung cấp nguồn đạm cần thiết cho sự phát triển của vi khuẩn lactic. Nhưng khi tăng hàm lượng dịch thủy phân lên đến 30% và 40% thì lúc này nguồn đạm đã vượt quá mức cần thiết, đồng thời, hàm lượng các hợp chất phenolic cũng tăng lên đáng kể nên vi khuẩn cần thời gian thích nghi nhiều hơn. Nguyên nhân gây nên hiện tượng này là do các acid α và β được tìm thấy từ hoa bia có khả năng ức chế vi khuẩn Gram dương gây hư hỏng bia và trong nghiên cứu của Podpora et al. (2015) cho thấy các 2 loại acid này đã được hấp thụ vào thành tế bào của nấm men trong quá trình sản xuất bia. Ngoài ra, Vieira et al. (2016, 2017) đã tìm thấy 13 hợp chất phenolic có trong men bia với hàm lượng polyphenol tổng được công bố đạt đến 65,45 mg GAE/mL. Sự hiện diện của các hợp chất này được xác định là có thể liên quan đến nguồn nguyên liệu sản xuất bia bao gồm hoa bia và mạch nha và trong quá trình tái sử dụng nấm men (4-6 chu kỳ) trước khi loại bỏ đã tạo điều kiện cho nấm men có khả năng thích ứng để chống chịu với các điều kiện ức chế và tích lũy các hợp chất phenolic (Rizzo et al., 2006). Các hợp chất này có thể hoạt động như chất hoạt hóa hoặc chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn tùy thuộc vào cấu trúc hóa học và nồng độ (Figueiredo et al., 2008; García-Ruiz et al., 2008). Trong số các vi khuẩn Gram dương, một số loài vi khuẩn acid lactic ít nhạy cảm hơn với các hợp chất hoa bia và có khả năng phát triển gây hư hỏng bia với tần suất cao bao gồm *L. brevis*, *L. lindneri* và các loài khác như *L. buchneri*, *L. casei*, *L. coryneformis*, *L. curvatus* và *L. plantarum* cũng có khả năng phát triển nhưng ít phổ biến hơn (Priest, 1996).

Tóm lại, khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lactic không chỉ phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy mà còn phụ thuộc vào chủng của các loài *Lactobacillus* bởi vì mỗi chủng có nhu cầu dinh dưỡng khác nhau để thúc đẩy sự phát triển và đạt được mật độ tế bào cao (Ren et al., 2019). Nghiên cứu này cho thấy dịch thủy phân nấm men được bổ sung vào môi trường nuôi cấy có hiệu quả sinh trưởng tương đồng và cho kết quả đầy hứa hẹn so với môi trường MRS thương mại.

3.4. Ảnh hưởng của dịch thủy phân đến khả năng sinh acid lactic của *L. casei*

Sau khi đánh giá khả năng tăng trưởng của vi khuẩn lactic và xác định được nồng độ dịch thủy phân bổ sung thích hợp trong môi trường nuôi cấy, tiến hành bổ sung hàm lượng đường theo tỉ lệ và khảo sát khả năng sản xuất acid lactic của vi khuẩn *L. casei* trong 6 ngày ở 37°C. Khả năng lên men được theo dõi bằng cách phân tích hàm lượng acid lactic sinh ra qua từng ngày bằng phương pháp chuẩn độ. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Số liệu trình bày trong Bảng 3 cho thấy môi trường đối chứng không bổ sung nguồn đạm có sự thay đổi về hàm lượng acid lactic nhưng không đáng kể và chỉ dao động trong khoảng 0,3-0,825 g/L. Các môi trường còn lại cho thấy *L. casei* đã sử dụng nguồn dinh dưỡng trong môi trường để lên men acid lactic với hàm lượng acid tăng dần từ 4,2 g/L đến 8,25 g/L sau 1 ngày lên men. Ở ngày lên men thứ 2, lượng acid lactic tăng vượt trội ở môi trường MRStH, MRSHi và MRSA_n và đạt cao nhất với các giá trị lần lượt là 17,03, 16,20, 16,88 g/L và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các môi trường còn lại. Tuy nhiên, ở ngày lên men tiếp theo, các môi trường MRS thương mại đều ghi nhận sự giảm của hàm lượng acid lactic. Nguyên nhân có thể là do các chất dinh dưỡng dần cạn kiệt, pH giảm và

trong điều kiện acid tăng cao thì chính vi khuẩn lactic cũng bị ức chế. Lúc này tế bào gây ra khả năng phân giải acid lactic và theo Elferink (2001) thì mỗi mol acid lactic được chuyển thành khoảng 0,5 mol acid acetic, 0,5 mol 1,2-propanediol và ethanol.

Số liệu trình bày trong Bảng 3 cho thấy môi trường đối chứng không bổ sung nguồn đạm có sự thay đổi về hàm lượng acid lactic nhưng không đáng kể và chỉ dao động trong khoảng 0,30-0,83 g/L. Các môi trường còn lại cho thấy *L. casei* đã sử dụng nguồn dinh dưỡng trong môi trường để lên men lactic với hàm lượng acid tăng dần từ 4,20 g/L đến 8,25 g/L sau 1 ngày lên men. Ở ngày lên men thứ 2, lượng acid lactic tăng vượt trội ở môi trường MRStH, MRSHi và MRSA_n và đạt cao nhất với các giá trị lần lượt là 17,03, 16,20, 16,88 g/L và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các môi trường còn lại. Tuy nhiên, ở ngày lên men tiếp theo, các môi trường MRS thương mại đều ghi nhận sự giảm của hàm lượng acid lactic. Nguyên nhân có thể là do các chất dinh dưỡng dần cạn kiệt, pH giảm và trong điều kiện acid tăng cao thì chính vi khuẩn lactic cũng bị ức chế. Lúc này tế bào gây ra khả năng phân giải acid lactic và theo Elferink et al. (2001) thì mỗi mol acid lactic được chuyển thành khoảng 0,5 mol acid acetic, 0,5 mol 1,2-propanediol và ethanol.

Bảng 3. Hàm lượng acid lactic sinh ra (g/L) của *L. casei* sau 6 ngày lên men ở các môi trường khác nhau

Môi trường ¹	Hàm lượng acid lactic ² (g/L) sinh ra theo thời gian (ngày)					
	1	2	3	4	5	6
Đối chứng âm	0,30 ^e	0,38 ^g	0,53 ^h	0,68 ⁱ	0,60 ^f	0,83 ^e
MRStH	8,03 ^a	17,03 ^a	15,75 ^a	15,53 ^a	15,08 ^a	15,15 ^a
MRSHi	8,25 ^a	16,20 ^b	15,00 ^b	15,00 ^b	14,40 ^b	14,40 ^b
MRSA _n	7,88 ^a	16,88 ^a	14,40 ^c	14,55 ^c	14,10 ^b	14,10 ^b
NĐ10-2% glucose	4,20 ^d	11,33 ^c	12,30 ^d	12,53 ^d	12,90 ^c	12,38 ^c
NĐ10-4% glucose	4,28 ^d	9,60 ^d	11,25 ^e	11,55 ^e	11,40 ^d	11,18 ^d
NĐ10-6% glucose	4,65 ^d	8,93 ^f	10,80 ^f	11,25 ^f	11,25 ^d	11,40 ^d
NĐ20-2% glucose	6,23 ^b	9,3 ^e	10,05 ^g	10,73 ^g	10,88 ^e	11,25 ^d
NĐ20-4% glucose	5,78 ^{bc}	9,08 ^{ef}	9,98 ^g	10,73 ^g	11,40 ^d	11,18 ^d
NĐ20-6% glucose	5,40 ^c	8,85 ^f	9,83 ^g	10,35 ^h	10,65 ^e	11,25 ^d

Ghi chú: ¹Môi trường MRStH: môi trường MRS có chứa yeast extract 0,4%, beef extract 0,8%, peptone 1%; MRSHi: môi trường MRS có chứa yeast extract 2,2% (Himedia); MRSA_n: môi trường MRS có chứa yeast extract 2,2% (Angel); NĐ10: môi trường MRS có chứa 10% dịch thủy phân; các môi trường còn lại tương ứng với các nồng độ dịch thủy phân tăng dần (20, 30, 40%); ²Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại; Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Riêng các môi trường thử nghiệm có bổ sung đường thì hàm lượng acid lactic sinh ra ở ngày thứ 3 có xu hướng tăng và nằm trong khoảng 9,88-12,30 g/L. Sau đó ở các ngày khảo sát tiếp theo, lượng acid lactic hình thành ở tất cả môi trường có không có sự thay đổi hoặc thay đổi rất ít. Tuy nhiên, vẫn có sự

khác biệt về khả năng sản xuất lactic giữa môi trường MRS thương mại và môi trường bổ sung dịch thủy phân. Điều này có thể được giải thích là do môi trường MRS chứa một nguồn nitơ hữu cơ dồi dào cũng như chứa một loạt các nguyên tố vi lượng, vitamin và các yếu tố tăng trưởng. Những hợp chất

này không chỉ góp phần vào sinh khối cao mà còn góp phần vào mức độ chuyên hóa acid lactic cao (Nourmohammadi et al., 2017). Một nguyên nhân khác dẫn đến sự khác biệt này là do sự hiện diện của một số loại chất ức chế trong dịch thủy phân. Kết quả từ thí nghiệm này và thí nghiệm tăng trưởng đã cho thấy trong điều kiện bất lợi, vi khuẩn lactic ưu tiên nguồn dinh dưỡng cho việc tăng trưởng tế bào nên việc hình thành acid lactic sẽ kém hiệu quả hơn. Ngoài ra, một số nghiên cứu trước đây cho thấy, lên men trong môi trường có chứa các hợp chất từ bia sẽ ảnh hưởng đến quá trình hình thành acid lactic và *L. casei* có thể tạo ra diacetyl thông qua con đường hình thành diacetyl - là sản phẩm chính thay vì acid lactic (Hough et al., 1982).

Kết quả từ nghiên cứu này tương đồng với kết quả thu được của Izaguirre et al. (2020), khi lên men 2 chủng *L. fermentum* ATCC 9338 và *L. plantarum* NCIMB 8826 trong môi trường MRS cho hàm lượng acid lactic đạt 15,5 g/L và 13,2 g/L trong 22 giờ. Còn khi lên men trong môi trường sử dụng dịch thủy phân từ chất thải rắn hữu cơ làm nguồn nitơ cho thấy mức tiêu thụ glucose chậm hơn và sản lượng acid lactic đạt lần lượt là 9,0 g/L và 11,1 g/L. Bên cạnh đó, có nhiều nhóm tác giả đã nỗ lực nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau từ phụ phẩm của ngành công nghiệp thực phẩm đến quá trình sản xuất acid lactic nhằm giảm thiểu chất thải và giảm chi phí lên men (Göksungur & Guvenc, 2001; Yu et al., 2008).

Với mục đích tương tự, nghiên cứu này tận dụng nguồn phụ phẩm dồi dào từ quá trình sản xuất bia như nguồn nitơ thay thế cho các loại cao nấm men thương mại. Một nghiên cứu của Mathias et al. (2017) đã sử dụng các sản phẩm phụ trong quá trình sản xuất bia làm môi trường sản xuất protease. Kết quả nhận thấy việc bổ sung chiết xuất từ bã men bia

hoặc kết hợp với các sản phẩm phụ khác của chính nhà máy bia đã có tác động tích cực đáng kể đến quá trình lên men vi khuẩn acid lactic. Ngoài ra, hiệu quả của chiết xuất nấm men đối với sự phát triển của vi khuẩn lactic cũng đã được chứng minh bởi Abbasiliasi et al. (2011) hay Zhang et al. (2020) trong nghiên cứu thúc đẩy sản xuất bacteriocin. Hơn nữa, các chiết xuất từ nấm men bia được sử dụng như một nguồn nitơ cho quá trình sản xuất sinh khối của *Bacillus thuringiensis* (Saksinchai et al., 2001) hay dùng trong sản xuất succinate bằng vi khuẩn *Actinobacillus succinogenes* (Sawisit et al., 2012) và trong quá trình lên men ethanol (Sridee et al., 2011). Nhìn chung, các kết quả nghiên cứu cho thấy, bã men bia là nguồn nguyên liệu phù hợp, cung cấp nitơ cho sự phát triển của vi sinh vật.

4. KẾT LUẬN

Dịch thủy phân thu nhận từ bã men bia bằng phương pháp thủy phân có hàm lượng protein là 74,45%, carbohydrate và chất béo là 0%. Bổ sung 10% (v/v) dịch thủy phân thu nhận từ nấm men bia bằng phương pháp xử lý nhiệt có khả năng sử dụng thay thế nguồn đạm thương mại của môi trường MRS thông qua hiệu quả phát triển và lên men của vi khuẩn lactic. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin để có thể định hướng ứng dụng nguồn đạm từ dịch thủy phân nấm men trong các quá trình lên men vi sinh vật.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VinIF) và Viện Nghiên cứu dữ liệu lớn (VinBigdata) thuộc tập đoàn Vingroup (mã số VINIF.2021.ThS.35) đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbasiliasi, S., Ramanan, R. N., Ibrahim, T. A. T., Mustafa, S., Mohamad, R., Daud, H. H. M., & Ariff, A. B. (2011). Effect of medium composition and culture condition on the production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Lactobacillus paracasei* LA07, a strain isolated from Budu. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(4), 2652-2657. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0101>
- Alves, E. M., Souza, J. F. D., & Oliva Neto, P. D. (2021). Advances in yeast autolysis technology-a faster and safer new bioprocess. *Brazilian Journal of Food Technology*, 24, e2020249. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.24920>
- Bekatorou, A., Plessas, S., and Mantzourani, I. (2015). Biotechnological exploitation of brewery solid wastes for recovery or production of value-added products. In V. R. Rai (Ed.). *Advances in Food Biotechnology* (pp. 393–414). Chichester: Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118864463.ch24>
- Choi, G. H., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2021). Optimization of medium composition for biomass production of *Lactobacillus plantarum* 200655 using response surface methodology, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(1), 717-725. <https://doi.org/10.4014/jmb.2103.03018>

- Cleverdon, R., Elhalaby, Y., McAlpine, M. D., Gittings, W., & Ward, W. E. (2018). Total polyphenol content and antioxidant capacity of tea bags: Comparison of black, green, red rooibos, chamomile and peppermint over different steep times. *Beverages*, 4(1), 15. <https://doi.org/10.3390/beverages4010015>
- Elferink, S. J. W. H. O., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F., & Driehuis, F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 125-132. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>
- Figueiredo, A. R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T., & Couto, J. A. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology*, 25(1), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.07.004>
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19(9), 835-841. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.018>
- Gaudreau, H., Champagne, C. P., Conway, J., & Degré, R. (1999). Effect of ultrafiltration of yeast extracts on their ability to promote lactic acid bacteria growth. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(11), 891-897. <https://doi.org/10.1139/w99-089>
- Göksungur, Y. & Güvenç, U. (1997). Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69(4), 399-404. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199708\)69:4<399::AID-JCTB728>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199708)69:4<399::AID-JCTB728>3.0.CO;2-Q)
- Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R., Young, T.W., 1982. *Malting and Brewing Science*, vol. 2, 2nd ed. Chapman & Hall, London. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1799-3>
- Izaguirre, J. K., Dietrich, T., Villarán, M. C., & Castañón, S. (2020). Protein hydrolysate from organic fraction of municipal solid waste compost as nitrogen source to produce lactic acid by *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 and *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. *Process Biochemistry*, 88, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.09.028>
- Jacob, F. F., Striegel, L., Rychlik, M., Hutzler, M., & Methner, F. J. (2019). Yeast extract production using spent yeast from beer manufacture: influence of industrially applicable disruption methods on selected substance groups with biotechnological relevance. *European Food Research and Technology*, 245(6), 1169-1182. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03237-9>
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2016). Microbial production of lactic acid: the latest development. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 967-977. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1066305>
- Li, Y., Wang, L., Ju, J., Yu, B., & Ma, Y. (2013). Efficient production of polymer-grade D-lactate by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source. *Bioresource Technology*, 142, 186-191. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.124>
- Liu, B., Yang, M., Qi, B., Chen, X., Su, Z., & Wan, Y. (2010). Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As. 1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. *Biochemical Engineering Journal*, 52(2-3), 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.08.013>
- Mathias, T.R.D.S.; De Aguiar, P.F., Silva, J.B.D.A.E., De Mello, P.P.M. and Sérvulo, E.F.C. (2017). Brewery waste reuse for protease production by lactic acid fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 55, 218-224. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4378>
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Razavi Rouhani, S. M., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum*, 4(3), 179-183.
- Nguyen, L., & Hwang, E. S. (2016). Quality characteristics and antioxidant activity of yogurt supplemented with aronia (*Aronia melanocarpa*) juice. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21(4), 330-337. <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.4.330>
- Nourmohammadi, E., SadeghiMahoonak, A., Alami, M., & Ghorbani, M. (2017). Amino acid composition và antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil cake protein. *International Journal of Food Properties*, 20(12), 3244-3255. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1283516>
- Pinto, M., Coelho, E., Nunes, A., Brandão, T., & Coimbra, M. A. (2015). Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. *Carbohydrate Polymers*, 116, 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.010>
- Podpora, B., Świdorski, F., Sadowska, A., Piotrowska, A., & Rakowska, R. (2015). Spent brewer's yeast autolysates as a new and valuable component of functional food and dietary supplements. *Journal of Food Processing and Technology*, 6(12), 526-530. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000526>

- Priest, F. G. (1996). Gram-positive brewery bacteria. In: Priest, F.G., Cambell, I. (Eds.), *Brewing Microbiology*, 2nd ed. Chapman & Hall, London, pp. 127 - 161. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4679-2_5
- Ren, H., Zentek, J., & Vahjen, W. (2019). Optimization of production parameters for probiotic *Lactobacillus* strains as feed additive. *Molecules*, 24(18), 3286. <https://doi.org/10.3390/molecules24183286>
- Rizzo, M., Ventrice, D., Varone, M. A., Sidari, R., & Caridi, A. (2006). HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42(1), 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.058>
- Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J. M., Gildberg, A., & Rasco, B. (2012). Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 73-79. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0225-8>
- Saksinchai, S., Suphantharika, M., & Verduyn, C. (2001). Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki: a physiological study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(3), 307-316. <https://doi.org/10.1023/A:1016717428583>
- Santiago, L. A. & Mori, A. (1993). Antioxidant defenses of baker's yeast against free radicals and lipid peroxides in rat brain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 306(1), 16-21. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1474>
- Sawisit, A., Seesan, S., Chan, S., Kanchanatawee, S., Jantama, S. S., & Jantama, K. (2012). Validation of fermentative parameters for efficient succinate production in batch operation by *Actinobacillus succinogenes* 130ZT. *Advanced Materials Research*, 550, 1448-1454. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.550-553.1448>
- Sridee, W., Laopaiboon, L., Jaisil, P., & Laopaiboon, P. (2011). The use of dried spent yeast as a low-cost nitrogen supplement in ethanol fermentation from sweet sorghum juice under very high gravity conditions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(6), 3-3. <https://doi.org/10.2225/vol14-issue6-fulltext-5>
- Vieira, E. F., Carvalho, J., Pinto, E., Cunha, S., Almeida, A. A., and Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2016). Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. *Journal of Food Composition and Analysis*, 52, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.07.006>
- Vieira, E. F., Melo, A., & Ferreira, I. M. (2017). Autolysis of intracellular content of Brewer's spent yeast to maximize ACE-inhibitory and antioxidant activities. *LWT-Food Science and Technology*, 82, 255-259. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.046>
- Vieira, E. F., Van Camp, J., Ferreira, I.M.P.L.V.O., and Grootaert, C. (2018). Protein hydrolysate from canned sardine and brewing by-products improves TNF- α -induced inflammation in an intestinal-endothelial co-culture cell model. *European Journal of Nutrition*, 57(6), 2275-2286. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1503-2>
- Vučurović, V. M., Puškaš, V. S., Miljić, U. D., Filipović, J. S., & Filipović, V. S. (2018). The effect of yeast extract addition to dough on the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 22(3), 150-152. <https://doi.org/10.5937/JPEA1803150V>
- Wee, Y. J., Kim, J. N., & Ryu, H. W. (2006). Biotechnological production of lactic acid và its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 163-172.
- Wern, K. H., Haron, H., & Keng, C. B. (2016). Comparison of total phenolic contents (TPC) and antioxidant activities of fresh fruit juices, commercial 100% fruit juices and fruit drinks. *Sains Malaysiana*, 45(9), 1319-1327.
- Yadav, R. N. S., & Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*, 3(12), 10-14.
- Ye, M., Ren, L., Wu, Y., Wang, Y., & Liu, Y. (2013). Quality characteristics and antioxidant activity of hickory-black soybean yogurt. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 314-318. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.027>
- Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X., & Feng, Y. (2008). Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochemical Engineering Journal*, 39(3), 496-502. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.008>
- Zarei, O., Dastmalchi, S., & Hamzeh-Mivehroud, M. (2016). A simple and rapid protocol for producing yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* suitable for preparing bacterial culture media. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15(4), 907-913.
- Zhang, J., Bu, Y., Zhang, C., Yi, H., Liu, D., & Jiao, J. (2020). Development of a low-cost and high-efficiency culture medium for bacteriocin Lac-B23 production by *Lactobacillus plantarum* J23. *Biology*, 9(7), 171. <https://doi.org/10.3390/biology9070171>