

Nghiên cứu sử dụng hạt calci carbonat-alginate trong lên men thu sinh khối *Bifidobacterium bifidum*

Bùi Quốc Huy, Nguyễn Minh Thái*

Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

*minhthai2511@ump.edu.vn

Tóm tắt

Bifidobacterium bifidum (*B. Bifidum*) là vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt, có tiềm năng cao được sử dụng làm lợi khuẩn trong hỗ trợ sức khỏe đường ruột. Tuy nhiên, nuôi cấy *B. bifidum* ở mật độ cao gặp nhiều khó khăn do khả năng sinh acid hữu cơ làm đổi pH môi trường, gây giảm hiệu suất sinh khối thu được. Do đó, nghiên cứu đánh giá khả năng đệm pH của vật liệu sinh học như hạt gel calcium carbonate-alginate trong nuôi cấy *B. bifidum* mật độ cao là cần thiết. Số lượng tế bào được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Kết quả cho thấy sau 48 giờ lên men, pH của mẫu thử có chứa hạt gel CaCO₃-alginate có pH ổn định hơn, giảm từ $5,87 \pm 0,14$ còn $4,48 \pm 0,18$, còn mẫu chứng giảm từ $5,87 \pm 0,14$ xuống $4,05 \pm 0,03$. Và sau 24 giờ lên men, mật độ tế bào của mẫu thử tăng vượt trội hơn mẫu chứng, với mức tăng vượt trội hơn khoảng 2,36 lần. Kết quả của nghiên cứu chứng minh hiệu quả của việc sử dụng hạt gel CaCO₃-alginate như một hệ đệm pH hỗ trợ tăng trưởng ở mật độ cao của *B. bifidum*.

Nhận 30/12/2025

Được duyệt 15/01/2026

Công bố 28/02/2026

Từ khóa

Hạt calci carbonat-alginate,
Bifidobacterium bifidum,
lên men mật độ cao

© 2026 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Hệ khuẩn đường ruột đóng vai trò quan trọng đối với sức khỏe con người. Các nghiên cứu cho thấy rằng bệnh về đường tiêu hóa thường do rối loạn hệ khuẩn đường ruột gây ra. Việc mất cân bằng hệ sinh thái trong đường tiêu hóa có thể dẫn đến nhiều căn bệnh nguy hiểm khác như viêm loét dạ dày-tá tràng, đại tháo đường, béo phì [1], ung thư [2] hay thậm chí rối loạn thần kinh [3]. Bằng cách bổ sung probiotic vào đường tiêu hóa có thể giúp ngăn ngừa các vấn đề do rối loạn hệ khuẩn đường ruột gây nên. Probiotic nói chung có khả năng điều chỉnh phản ứng miễn dịch [4], đồng thời làm giảm pH của dạ dày và ruột, từ đó ngăn ngừa sự phát triển của các vi sinh vật gây hại [5].

Trong số các loại probiotic đã được nghiên cứu và ứng dụng, chủng *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*) được đặc biệt chú ý nhờ vào nhiều tác động tích cực đến sức khỏe vật chủ [6]. Những tác động này được thể hiện thông qua các cơ chế sinh học đa dạng và phức tạp như cạnh tranh vị trí gắn với các vi sinh vật gây bệnh như *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., hay *Clostridium difficile*, từ đó ức chế sự xâm nhập và phát triển của vi sinh vật gây bệnh trong niêm mạc ruột [7]; tham gia vào quá trình điều hòa miễn dịch thông qua việc kích hoạt các tế bào miễn dịch như đại thực bào, tế bào T và tế bào trình diện kháng nguyên [8]; ức chế sự phát triển của nhiều vi sinh vật gây bệnh khác thông qua khả năng tạo ra các acid hữu cơ như acid

acetic và acid lactic, gây ức chế sự phát triển của nhiều vi sinh vật gây bệnh có điều kiện [9]; hỗ trợ duy trì và phục hồi tính toàn vẹn của hàng rào niêm mạc bằng cách điều hòa biểu hiện của các protein liên kết chặt như occludin, claudin và zonula occludens-1 (ZO-1), giúp tăng cường tính toàn vẹn của biểu mô ruột và hạn chế hiện tượng “rò rỉ ruột” (leaky gut) [10].

Tuy nhiên, *B. bifidum* là chủng vi khuẩn sống kỵ khí bắt buộc, có ngưỡng pH sinh trưởng trong khoảng 4,5-9 [11]. Khi nuôi cấy ở mật độ cao, chúng sản sinh các acid hữu cơ như acid acetic và acid lactic làm giảm pH môi trường dẫn đến ức chế ngược lại quá trình sinh trưởng, gây giảm hiệu suất lên men thu sinh khối. Trong quá trình lên men, pH môi trường thường được điều chỉnh bằng cách bổ sung các bazơ vô cơ như NaOH, KOH hoặc NH₄OH nhằm duy trì điều kiện tối ưu cho sự phát triển của vi sinh vật. Thông thường, có hai phương pháp được áp dụng: (1) bổ sung một lượng bazơ cố định theo khoảng thời gian định sẵn và (2) điều chỉnh pH dựa trên tín hiệu từ đầu dò cảm biến pH trong hệ thống [12]. Tuy nhiên, phương pháp thứ nhất tiềm ẩn nguy cơ dư thừa lượng bazơ, làm pH môi trường vượt quá ngưỡng phát triển sinh lý của vi sinh vật, từ đó ức chế sinh trưởng và giảm hiệu suất lên men. Trong khi đó, phương pháp thứ hai tuy chính xác hơn nhưng đòi hỏi hệ thống lên men tích hợp cảm biến và điều khiển tự động phức tạp, kéo theo chi phí đầu tư và vận hành cao. Vì vậy, việc tìm kiếm các giải pháp thay thế đơn giản, hiệu quả và tiết kiệm hơn được chú trọng trong nghiên cứu và ứng dụng công nghệ lên men vi sinh vật.

Một trong những hướng tiếp cận được quan tâm hiện nay là ứng dụng hệ đệm hạt gel CaCO₃-alginate vào quá trình lên men. Phương pháp này được đánh giá là đơn giản, tiết kiệm chi phí và dễ triển khai ở cả quy mô phòng thí nghiệm lẫn công nghiệp. Việc sử dụng hạt gel CaCO₃-alginate trong nuôi cấy vi sinh vật cho phép duy trì môi trường ổn định thông qua khả năng điều chỉnh pH đồng thời tạo điều kiện kỵ khí – yếu tố đặc biệt quan trọng đối với các chủng vi sinh vật kỵ khí bắt buộc. Bên cạnh đó, hình thức gel hóa còn có tác dụng như một giá thể cho vi sinh vật, tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật phát triển [13]. Ngoài ra, tạo hạt gel sẽ cố định CaCO₃, từ đó hỗ trợ việc loại bỏ lượng bột CaCO₃ dư thừa sau khi quá trình lên men kết thúc, tránh ảnh hưởng đến sai số liên quan đến khối lượng sinh

khối thu được. Phương pháp này hiện đang thu hút nhiều sự quan tâm trong nghiên cứu sản xuất probiotic nhờ vào hiệu suất, chất lượng ổn định và dễ dàng thực hiện.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Chủng vi khuẩn *B. bifidum*

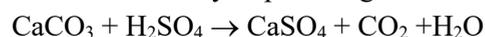
Chủng *B. bifidum* THT0101 từ nhà cung cấp THT probiotics (Bi) được cấy trên môi trường thạch MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) sau đó các đĩa được ủ trong điều kiện kỵ khí (10 % CO₂, 5 % O₂, 85 % N₂) trong hộp ủ kỵ khí AnaeroPack-MicroAero (Mitsubishi, Japan). Khóm vi khuẩn được nhận định bằng cách nhuộm Gram, khóm cho kết quả Gram dương cùng với hình thái chữ “Y” đặc trưng của *Bifidobacterium* sp. sẽ được tiếp tục sử dụng. Phân tán vi khuẩn vào môi trường MRS và tăng sinh ở 37 °C trong điều kiện kỵ khí cho đạt đến mật độ quang OD_{600nm} đạt 1.0 tương ứng với 1×10^9 CFU/mL. Dịch chứa khuẩn sau đó được sử dụng để thử nghiệm lên men mật độ cao.

2.2 Tạo hạt gel CaCO₃-alginate

Hạt gel CaCO₃-alginate được tạo thành theo phương pháp nhỏ giọt. Hòa tan natri alginate vào nước với tỷ lệ 2 % (w/v), sau đó đem đi hấp tiệt trùng (121 °C, 1 atm, 30 phút) và để nguội. Thêm vào lượng CaCO₃ tương ứng với 20 % (w/v) thể tích natri alginate và phân tán đều. Hỗn dịch CaCO₃-natri alginate được bơm vào ống tiêm 10 mL, đầu kim 24G (Vinahankook, Việt Nam), sau đó được nhỏ giọt vào becher chứa dung dịch CaCl₂ 0,2 M được khuấy nhẹ bằng máy khuấy từ. Sau khi quá trình tạo hạt kết thúc, hạt gel CaCO₃-alginate được thu bằng phương pháp lọc qua rây và rửa lại bằng nước cất. Hạt gel thu được phải được khử trùng bằng cách chiếu UV trong thời gian 30 phút.

2.3 Đánh giá khả năng đệm pH của hạt gel CaCO₃-alginate

Khả năng đệm pH của hạt gel CaCO₃-alginate được đánh giá thông qua phương pháp chuẩn độ acid-bazơ, sử dụng dung dịch H₂SO₄ 0,5 M làm chất chuẩn độ. Trong quá trình chuẩn độ sẽ xảy ra phản ứng sau:



Dung dịch thử chứa hạt gel sẽ được chuẩn độ cho đến khi đạt pH mục tiêu, đồng thời tiến hành mẫu đối chứng (mẫu trắng) không chứa hạt gel để loại trừ ảnh hưởng của môi trường nền. Lượng H⁺ thực sự phản ứng với

hạt gel sẽ được tính bằng hiệu số thể tích H₂SO₄ 0,5 M tiêu thụ giữa mẫu có hạt và mẫu trắng, từ đó phản ánh khả năng đệm pH của hệ gel.

Lượng H₂SO₄ mà hạt CaCO₃-alginate có thể trung hòa được bằng công thức sau:

$$n \text{ H}_2\text{SO}_4 = C_M \times V$$

$n \text{ CaCO}_3$ phản ứng = $n \text{ H}_2\text{SO}_4$ thừa - $n \text{ H}_2\text{SO}_4$ trắng

Trong đó: $C_M \text{ H}_2\text{SO}_4 = 0,5 \text{ M}$

V: thể tích H₂SO₄ 0,5 M đã sử dụng (mL)

n: Số mol của các chất phản ứng (mmol)

Tính hiệu suất phản ứng theo công thức sau:

$$H\% = \frac{n \text{ CaCO}_3 \times M \text{ CaCO}_3}{m \text{ cân} \times 20\%} \times 100$$

2.4 Lên men thu sinh khối *B. bifidum* ở mật độ cao

2.4.1 Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy được sử dụng là Lactobacillus MRS broth (Hiimedia, India), bổ sung 0,5 % (w/v) L-cystein. pH môi trường được hiệu chỉnh bằng NaOH 1 M về mức 7,0 trước khi hấp tiệt trùng (121 °C, 1 atm, 30 phút). Sau khi hấp xong, làm nguội và đo pH, ghi nhận giá trị pH môi trường lúc ban đầu.

2.4.2. Tiến hành quá trình lên men *B. bifidum*

Thêm lượng hạt gel CaCO₃-alginate với tỷ lệ 30 % (w/v), sau đó thêm sinh khối *B. bifidum* chuẩn bị ở bước 2.1 vào môi trường nuôi cấy với tỷ lệ 10 % (v/v). Quá trình lên men được tiến hành trong môi trường kỵ khí, ở 37 °C và lắc nhẹ ở 50 rpm. Thời gian lên men được khảo sát theo các mốc thời gian 24 giờ và 48 giờ. Các mẫu đối chứng không sử dụng hạt gel được thực hiện song song với điều kiện nuôi cấy tương đương.

2.5 Phân tích khả năng lên men thu sinh khối *B. bifidum* ở mật độ cao

2.5.1 Phân tích pH môi trường theo thời gian nuôi cấy.

Mỗi 24 giờ, lấy 2 mL huyền phù nuôi cấy, ly tâm ở 4 000 rpm sau đó thu dịch và đo pH bằng máy đo pH (Istek, Korea) đã được hiệu chỉnh trước.

2.5.2 Kiểm tra mật độ vi khuẩn.

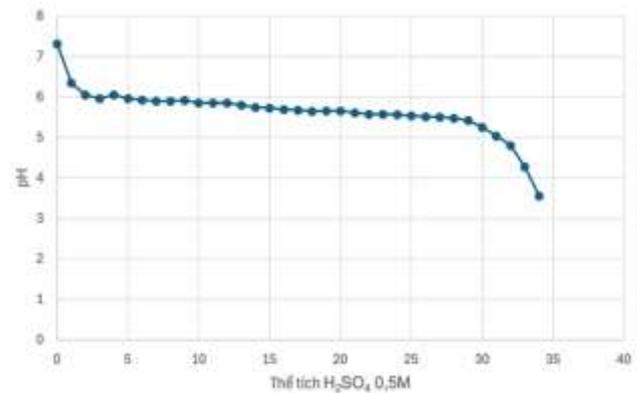
Mật độ vi khuẩn sau mỗi thời gian nuôi cấy được kiểm tra phương pháp pha loãng trải đĩa đếm sống: lấy phần sinh khối tế bào còn lại trong bước phân tích pH môi trường tại mục 2.5.1 và phân tán vào 2 mL dung dịch PBS. Hút 100 µL huyền phù vi khuẩn này cho vào 900 µL dung dịch PBS 1x, ta thu được nồng độ pha loãng thứ nhất hay độ pha loãng 10⁻¹. Lặp lại thao tác này đến

khí đạt được nồng độ pha loãng 10⁻¹⁰. Trải 100 µL dịch vi khuẩn pha loãng ở 3 nồng độ cuối lên đĩa thạch MRS và ủ trong tủ ấm 37 °C ở môi trường kỵ khí trong 48 giờ. Sau thời gian ủ ấm, kiểm tra và đếm số lượng khuẩn lạc của đĩa có khoảng 30-300, sau đó tính mật độ vi khuẩn theo công thức sau:

Mật độ tế bào (CFU/mL) = số khuẩn lạc × 10^{độ pha loãng + 1}

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Đánh giá khả năng đệm pH của hạt gel CaCO₃-alginate bằng phương pháp chuẩn độ

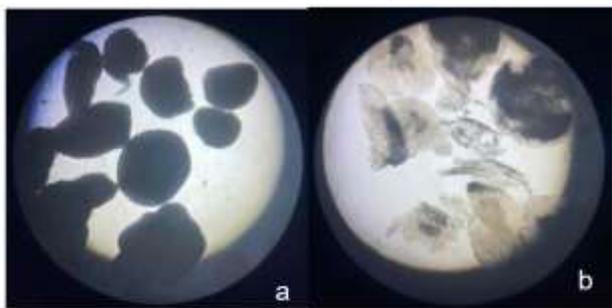


Hình 1 Đồ thị tương quan giữa thể tích H₂SO₄ 0,5 M và pH môi trường chứa hạt gel CaCO₃-alginate

Kết quả chuẩn độ môi trường có chứa hạt gel CaCO₃-alginate cho thấy khả năng đệm pH của hạt gel giúp môi trường luôn duy trì pH ở khoảng 5,5-6. Đây là pH phù hợp hỗ trợ giúp vi khuẩn *B. bifidum* có thể phát triển tốt dù lên men ở mật độ cao, giảm tối thiểu tác động do việc sản sinh các acid hữu cơ làm giảm pH môi trường từ đó ức chế khả năng sinh trưởng của *B. bifidum* và làm giảm hiệu suất lên men chủng vi khuẩn này [11].

Kết quả cho thấy, khi sử dụng 10 gram hạt CaCO₃-alginate có thể trung hòa đến 34 mL H₂SO₄ 0,5M tương ứng với 34 mmol H⁺ (Hình 1). Hiệu suất phản ứng của CaCO₃ khi kết hợp với alginate sẽ có hiệu suất phản ứng với H⁺ là 85,17 %, tương ứng với tỷ lệ phản ứng với H⁺ 1:1,7 tính trên lượng mol CaCO₃ có trong hạt CaCO₃-alginate. Với các hệ đệm sử dụng bằng NaOH hay KOH, tỷ lệ phản ứng với H⁺ là 1:1 còn CaO, K₂HPO₄, Na₂CO₃ là 2:1 [14]. Tuy nhiên, để đảm bảo pH không nhảy vọt lên quá khoảng pH sinh trưởng, cần phải theo dõi pH định kỳ và thêm điều chỉnh pH. Điều này cho thấy khả năng đệm của CaCO₃-alginate vượt trội hơn các hệ đệm thông thường, đồng thời cũng

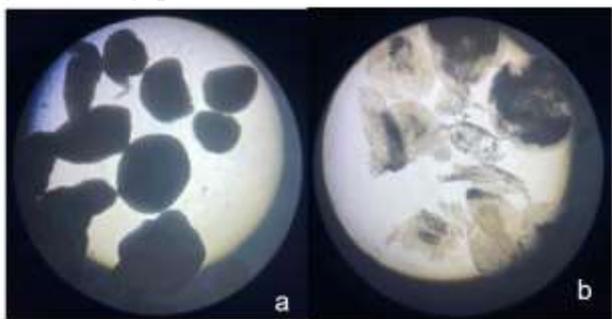
không ảnh hưởng để thành phần hóa học của môi trường nuôi cấy quá nhiều khi sau phản ứng chỉ có thêm ion Ca^{2+} được thêm vào môi trường nuôi cấy.



Hình 2 Ảnh chụp ở vi trường 4× của hạt gel CaCO_3 -alginate trước khi phản ứng với acid (Hình a) và sau khi phản ứng với acid (Hình b)

Phân tích hình ảnh hạt gel CaCO_3 -alginate dưới kính hiển vi quang học ở vi trường 4× cho thấy sau khi phản ứng với acid, CaCO_3 trong hạt gel đã phản ứng với acid có trong môi trường nuôi cấy. Đối với hạt gel đã phản ứng cho thấy không còn CaCO_3 được cố định trong hạt gel, hạt gel trở nên trong hơn khi chỉ còn lại cấu trúc khung của alginate. Điều này cho thấy được việc tạo thành hạt gel CaCO_3 -alginate không làm ảnh hưởng đến khả năng trung hòa acid có trong môi trường. Đồng thời, với kích thước hạt gel CaCO_3 -alginate dao động từ (0,5-1) mm giúp việc loại bỏ sau bằng cách sử dụng rây có kích thước < 0,5 mm khi quá trình lên men kết thúc, giảm thiểu sai số lên khối lượng sinh khối do CaCO_3 dư nếu sử dụng ở dạng bột.

3.2 Đánh giá khả năng đệm pH của hạt gel CaCO_3 -alginate trong quá trình lên men



Hình 3 Ảnh chụp ở vi trường 100× của *B. bifidum* khi lên men sau 48 giờ ở mẫu thử có hạt gel CaCO_3 -alginate (a) và mẫu chứng không có hạt gel CaCO_3 -alginate (b)

Quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 100X cho thấy khi có mặt của hạt gel CaCO_3 -alginate, vi khuẩn *B. bifidum* phát triển mạnh mẽ hơn khi trên

cùng kích thước vi trường, kích thước của vi khuẩn *B. bifidum* có xu hướng phát triển dài hơn. Ngoài ra, có thể thấy có nhiều cụm tế bào hình chữ Y hơn, điều này cũng cho thấy vi khuẩn còn có khả năng sinh sản thêm so với mẫu chứng không có hạt gel CaCO_3 -alginate. Điều này có thể giải thích do sau quá trình lên men 48 giờ, pH của môi trường vẫn nằm trong khoảng thích hợp cho *B. bifidum* phát triển. Đồng thời việc có giá thể cũng góp phần hỗ trợ tăng trưởng cho *B. bifidum* khi *B. bifidum* là 1 vi khuẩn không di động và có tính bám dính bề mặt giá thể tốt.

Bảng 1 Kết quả đánh giá tác động của hạt gel CaCO_3 -alginate trong quá trình lên men

Mẫu (n = 3)	Thời gian (giờ)	pH môi trường	Mật độ tế bào đếm sống (10^{10} CFU/mL)
Thử	24	4,59 ± 0,14	1,95 ± 0,03
	48	4,48 ± 0,18	5,36 ± 0,69
Đôi chứng	24	4,28 ± 0,23	0,67 ± 0,22
	48	4,05 ± 0,03	< 10^7

Trong thử nghiệm, kết quả cho thấy sau 24 giờ lên men, mật độ tế bào sống của mẫu thử với môi trường MRS bổ sung hạt gel CaCO_3 -alginate đều tăng đáng kể so với mẫu chứng chỉ sử dụng môi trường MRS. Sau khi tiếp tục nuôi cấy trong 48 giờ, mẫu thử với môi trường MRS bổ sung hạt gel CaCO_3 -alginate vẫn cho thấy khả năng tăng trưởng trong khi với mẫu chứng, khi kiểm tra tại cấp pha loãng thứ 7 đã không còn thấy sự hiện diện của khóm tế bào *B. bifidum*. Điều này chứng minh rằng hạt gel CaCO_3 -alginate có tác động rõ rệt trong việc thúc đẩy quá trình tăng trưởng sinh khối của chủng *B. bifidum*, từ đó tối ưu được khả năng lên men ở mật độ cao của chủng probiotic này.

Bên cạnh đó, sự khác biệt về pH môi trường giữa hai mẫu càng khẳng định vai trò của hạt gel trong việc ổn định hệ pH. Trong khi pH của mẫu chứng giảm liên tục và vượt qua ngưỡng sinh trưởng của *B. bifidum*. Trong khi đó, pH của mẫu thử chỉ giảm nhẹ và duy trì pH nằm gần giới hạn dưới của khoảng pH cần cho sự phát triển của *B. bifidum*. Điều này cho thấy hạt gel CaCO_3 -alginat đã đóng vai trò như một hệ đệm pH hiệu quả, giúp ngăn chặn tình trạng pH môi trường vượt ngoài pH sinh trưởng, tránh gây ức chế *B. bifidum* trong quá trình nuôi cấy kéo dài.

Ngoài ra, việc cung cấp CO₂ nhờ vào phản ứng giữa H⁺ và CaCO₃ cũng là tác nhân đảm bảo cho môi trường lên men kỵ khí, giúp nâng cao khả năng sinh tồn và giảm các yếu tố nguy cơ do môi trường hiếu khí gây ra.

4 Kết luận và đề xuất

Nghiên cứu đã chứng minh rằng, việc sử dụng hạt gel CaCO₃-alginate trong lên men mật độ cao chủng *B. bifidum* có hiệu quả rõ rệt trong việc cải thiện điều kiện môi trường và thúc đẩy tăng sinh vi khuẩn. Hạt gel không chỉ đóng vai trò như một hệ đệm pH, giúp duy trì pH ổn định trong quá trình lên men, là 1 yếu tố đặc biệt quan trọng đối với vi khuẩn kỵ khí bắt buộc như

B. bifidum, mà còn tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển và nhân đôi tế bào, nhờ vào khả năng tạo môi trường vi mô kỵ khí. Từ những kết quả trên, có thể kết luận rằng hạt gel CaCO₃-alginate là một giải pháp hiệu quả, đơn giản và tiềm năng trong việc cải thiện hiệu suất nuôi cấy probiotic kỵ khí như *B. bifidum*, và có thể mở rộng ứng dụng trong công nghệ lên men vi sinh vật quy mô lớn.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 239/2025/HĐ-ĐHYD, ngày 28/4/2025.

Tài liệu tham khảo

1. Boulangé, C. L., Neves, A. L., Chilloux, J., Nicholson, J. K., & Dumas, M. E. (2016). Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome medicine*, 8(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0303-2>.
2. Yang, J., Tan, Q., Fu, Q., Zhou, Y., Hu, Y., Tang, S., ... & Lv, Q. (2017). Gastrointestinal microbiome and breast cancer: correlations, mechanisms and potential clinical implications. *Breast Cancer*, 24(2), 220-228. <https://doi.org/10.1007/s12282-016-0734-z>.
3. Borre, Y. E., O'Keefe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in molecular medicine*, 20(9), 509-518. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.05.002>.
4. Arboleya, S., Stanton, C., Ryan, C. A., Dempsey, E., & Ross, P. R. (2016). Bosom buddies: the symbiotic relationship between infants and *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and ssp. *infantis*. Genetic and probiotic features. *Annual review of food science and technology*, 7(1), 1-21. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033151>.
5. Rahimi, S., Grimes, J. L., Fletcher, O., Oviedo, E., & Sheldon, B. W. (2009). Effect of a direct-fed microbial (Primalac) on structure and ultrastructure of small intestine in turkey poults. *Poultry Science*, 88(3), 491-503. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00272>.
6. Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C. (2005). bifidobacteria as probiotic agents-physiological effects and clinical benefits. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22(6), 495-512.
7. Collado, M. C., Gueimonde, M., Sanz, Y., & Salminen, S. (2006). Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. *Journal of Food Protection*, 69(7), 1675-1679. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.7.1675>.
8. Turrone, F., Duranti, S., Bottacini, F., Guglielmetti, S., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2014). *Bifidobacterium bifidum* as an example of a specialized human gut commensal. *Frontiers in Microbiology*, 5, 437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00437>.

9. Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (1999). Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 139-157. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00033-3).
10. Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., & Madsen, K. L. (2008). Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(5), G1025-G1034. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90227.2008>.
11. Schöpping, M., Zeidan, A. A., & Franzén, C. J. (2022). Stress response in bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(4), e00170-21.
12. Shuler, M. L., Kargi, F., & DeLisa, M. (2002). *Bioprocess engineering: Basic Concepts* (Vol. 2, pp. 155-184). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.
13. Machida-Sano, I., Koizumi, H., & Yoshitake, S. (2025). A novel scaffold for biofilm formation by soil microbes using iron-cross-linked alginate gels. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 89(3), 473-479.
14. Wang, Y., Zang, B., Gong, X., Liu, Y., & Li, G. (2017). Effects of pH buffering agents on the anaerobic hydrolysis acidification stage of kitchen waste. *Waste Management*, 68, 603-609.

Enhancing high-density cultivation of *Bifidobacterium bifidum* with calcium carbonate-alginate immobilized beads

Bui Quoc Huy, Nguyen Minh Thai*

School of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Viet Nam

*minhthai2511@ump.edu.vn

Abstract *Bifidobacterium bifidum* is a strictly anaerobic bacterium with high potential in supporting host health. However, high cell-density cultivation of *B. bifidum* remains challenging due to the accumulation of organic acids, leading to decreasing medium pH and negatively affecting cell growth performance. This study evaluated the pH-buffering capacity of calcium carbonate–alginate gel beads in high-density cultivation of *B. bifidum*. Cell numbers were determined using the colony-forming unit (CFU) counting method. Results showed that after 48 hours of fermentation, the pH of the treatment containing CaCO₃–alginate gel beads was more stably decreased (from 5.87 ± 0.14 to 4.48 ± 0.18) than the control sample. After 24 hours of fermentation, the cell density in the treatment group increased significantly compared to the control. These findings demonstrate the effectiveness of CaCO₃–alginate gel beads as a pH-buffering system to support high-cell-density growth of *B. bifidum*.

Keywords Calcium carbonate-alginate beads; *Bifidobacterium bifidum*; High cell-density fermentation