

ỨNG DỤNG VI KHUẨN *CORYNEBACTERIUM* SP. CỐ ĐỊNH TRONG LÊN MEN THU NHẬN LYSINE

IMMOBILIZING *CORYNEBACTERIUM* SP. CELL AND APPLICATION FOR PRODUCING LYSINE

Nguyễn Thuý Hương, Trần Thị Minh Tâm
Trường Đại học Bách khoa - ĐHQG Tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Bài báo nghiên cứu việc ứng dụng các chế phẩm tế bào vi khuẩn *Corynebacterium* sp. cố định trên một số chất mang alginate, Bacterial Cellulose (BC) và phức Bacterial Cellulose- Alginate (BC-A) để ứng dụng lên men thu nhận lysine. Kết quả thu được như sau:

- Chất mang BC có nhiều ưu thế hơn các chất mang truyền thống alginate trong kỹ thuật cố định tế bào vi khuẩn *Corynebacterium* sp.
- BC hoàn toàn phù hợp các yêu cầu của chất mang trong kỹ thuật cố định tế bào vi khuẩn.
- Phức chất mang Bacterial Cellulose- Alginate (BC-A) phát huy được những ưu thế của chất mang Bacterial Cellulose và Alginate.
- Hiệu quả sử dụng chế phẩm *Corynebacterium* sp. cố định trên phức chất mang BC-A trong lên men thu nhận lysine khá cao: có thể tái sử dụng chế phẩm 12 lần vẫn đảm bảo về mặt thời gian lên men và sản lượng lysine so với đối chứng.

ABSTRACT

In this paper, we investigate the immobilization of *Corynebacterium* sp. in some carriers (alginate, bacterial cellulose -BC and bacterial cellulose- alginate BC-A) and apply in producing lysine. The results are given as follows:

- The bacterial cellulose (BC) showed many advantages compared with traditional carrier (alginate) in immobilization *Corynebacterium* sp.
- BC entirely satisfied the conditions required for immobilization *Corynebacterium* sp.
- The effect of using *Corynebacterium* sp., immobilized in BC-A, for producing lysine was high: it could be reused about 12 times, the quantity of lysine remained rather good against control experiments.

I. MỞ ĐẦU

L-lysine là một trong 9 acid amin thiết yếu và là acid amin không thay thế. Cơ thể người và động vật không tự tổng hợp lysine. Hai lĩnh vực lớn ứng dụng lysine là thực phẩm và dược phẩm.

Lysine được thu nhận từ dịch thủy phân protein động vật, thực vật và phương pháp lên men vi sinh vật, trong đó ưu thế thuộc về phương pháp lên men. Do nhu cầu lớn về lysine, việc sản xuất lysine ở các quốc gia Mỹ, Nhật, Nga,... đã tiến hành quy mô công nghiệp. Ở Việt Nam, lysine phải nhập khẩu hoàn toàn và chưa có một cơ sở nào sản xuất lysine ở quy mô lớn. Hơn nữa, do bất hợp lý thành phần thức

ăn nên người Việt Nam rất dễ bị thiếu hụt lysine [1,3].

Kỹ thuật cố định tế bào đang được đề cập và quan tâm nhiều, đặc biệt trong các lĩnh vực lên men sản xuất các sản phẩm trao đổi chất. Tế bào cố định có nhiều ưu điểm so với việc sử dụng tế bào tự do như: tế bào sau khi được cố định có thể sử dụng được nhiều lần, không lẫn vào sản phẩm và có thể chủ động ngừng phản ứng theo ý muốn [4,5].

Trong giới hạn bài báo này, nhằm nâng cao hiệu quả quá trình lên men thu nhận lysine, chúng tôi nghiên cứu việc ứng dụng các chế phẩm tế bào vi khuẩn *Corynebacterium* sp. cố định trên một số chất mang để lên men thu nhận lysine.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

- Chủng vi khuẩn: *Corynebacterium* sp. có nguồn gốc từ bộ sưu tập giống trường đại học Bách khoa TP.HCM.

- Các chất mang: Na-alginate (Kanta, Nhật Bản), Cellulose vi khuẩn (Bacterial Cellulose-BC) [6].

2.2 Các phương pháp cố định tế bào

Cố định trên chất mang alginate: Tế bào *Corynebacterium* sp. được cố định trên chất mang alginate bằng phương pháp nhốt: điều kiện cố định là nồng độ alginate 3%, nồng độ CaCl_2 2% và nồng độ tế bào vi khuẩn đưa vào cố định là 10^{10} tế bào/ml. [4,5,6]. Hạt alginate tạo thành dạng tròn có đường kính khoảng 3,5-4 mm.

Cố định trên chất mang BC: Trên chất mang BC (kích thước 2cm x 2cm x 1 cm), tế bào *Corynebacterium* sp. được cố định bằng phương pháp hấp- hấp phụ (gồm 2 giai đoạn: hấp phụ vi khuẩn trên bề mặt BC và hấp tăng sinh trên và trong chất mang BC). Cụ thể gồm các bước như sau: Hoạt hoá chủng vi khuẩn → Bổ sung chất mang BC vô trùng vào dịch tế bào đã hoạt hoá → Quá trình cố định trên chất mang BC sẽ trải qua 2 giai đoạn liên tiếp:

Giai đoạn hấp phụ: trong khoảng 30 phút đầu tiên sau khi ngâm BC trong dịch tế bào, BC sẽ trương nở về trạng thái ban đầu, đồng thời sẽ hấp phụ tế bào vào hệ thống sợi bên trong cũng như trên bề mặt bên ngoài.

Giai đoạn hấp tăng sinh: kế tiếp giai đoạn hấp phụ. Sau giai đoạn hấp phụ, chất mang BC được tách khỏi huyền phù vi sinh vật và các tế bào đã được hấp phụ giai đoạn trên tiếp tục phát triển và tăng sinh trên giá đỡ BC, khi tiếp tục ở ở điều kiện tối ưu của giống vi sinh vật cố định.

Các điều kiện tối ưu cố định *Corynebacterium* sp. trên chất mang BC: hấp phụ bằng máy lắc, thời gian ủ 3 ngày, ở nhiệt độ 30°C , lượng tế bào vi khuẩn cố định trên chất mang đạt được như sau:

- Mật độ trung bình là: $8,8 \times 10^9/\text{g}$.

- Mật độ vi khuẩn mặt ngoài chất mang là: $4,9 \times 10^4$ tế bào/ cm^2 .

- Mật độ vi khuẩn bên trong chất mang là: $4,3 \times 10^4$ tế bào/ cm^2 [6,7].

Cố định trên phức chất mang BC-A:

Trên phức chất mang BC-A, chúng tôi kết hợp cả 2 phương pháp nhốt và hấp phụ tế bào *Corynebacterium* sp..

Ưu thế của phương pháp nhốt trong gel alginate là tế bào bị nhốt sẽ không khuếch tán ra môi trường xung quanh, nhưng vẫn cho cơ chất có phân tử lượng nhỏ vào và các sản phẩm trao đổi chất của tế bào ra khỏi mạng lưới gel.

Ưu thế của phương pháp hấp hấp phụ trên chất mang BC là tính chất cơ lý bền vững, dễ phù hợp với hình dạng thiết bị lên men. Tính chất cơ lý bền vững của BC giúp chế phẩm tế bào cố định chịu được các điều kiện khuấy đảo trong quá trình lên men và góp phần gia tăng số lần tái sử dụng.

Các điều kiện tối ưu cố định *Corynebacterium* sp. trên phức chất mang BC-A chính là tổng hợp các điều kiện tối ưu trên chất mang alginate và BC, gồm các bước như sau:

- Dịch alginate 3% và tế bào *Corynebacterium* sp. đồng nhất với mật độ khoảng 10^{10} tế bào/ml.

- BC (kích thước 2cm x 2cm x 1cm) hấp phụ dịch giống- alginate bằng máy lắc trong 30 phút.

- Khi cho chất mang BC vào huyền phù vi khuẩn có chứa 3% alginate, để tránh sự ảnh hưởng độ nhớt của huyền phù đến sự phân bố của vi sinh vật và chất mang trong dung dịch, cần thực hiện trên máy lắc (200 vòng/phút, thời gian 30 phút). Chế độ này đã được ghi nhận là tối ưu cho sự phân bố vi sinh vật và quá trình hấp phụ [2,6].

- Bổ sung chất hỗ trợ tạo gel CaCl_2 2%.

- Thời gian ủ 3 ngày, ở nhiệt độ 30°C .

Với các điều kiện trên, lượng tế bào vi khuẩn cố định trên phức chất mang BC-A đạt được:

- Mật độ trung bình là: $8,9 \times 10^9/\text{g}$.

- Mật độ vi khuẩn mặt ngoài chất mang là: $5,0 \times 10^4$ tế bào/cm².

- Mật độ vi khuẩn bên trong chất mang là: $4,6 \times 10^4$ tế bào/cm² [6,7].

2.3 Phương pháp nghiên cứu

- Định lượng vi khuẩn cố định trên bề mặt chất mang BC: Mẫu đại diện → Dập mẫu vô trùng → Xử lý bằng cellulase → Định lượng bằng phương pháp đếm gián tiếp.

- Xác định tỷ lệ rửa trôi tế bào (T) sau mỗi chu kỳ lên men:

$$T = \frac{B}{A} \times 100\%$$

(với A: mật độ tế bào ban đầu của chế phẩm, B: mật độ tế bào trong dịch lên men tại chu kỳ khảo sát).

- Lên men bởi chế phẩm tế bào cố định ở quy mô phòng thí nghiệm trong fermenter (5 lít) để

thu nhận lysine. Lượng chế phẩm được tính toán sao cho tỷ lệ giống là như nhau ở cả 4 nghiệm thức: sử dụng tế bào tự do và sử dụng 3 chế phẩm vi khuẩn cố định trên alginate, BC và BC-A. Điều kiện lên men thu nhận lysine được bố trí như nhau [1,3,6].

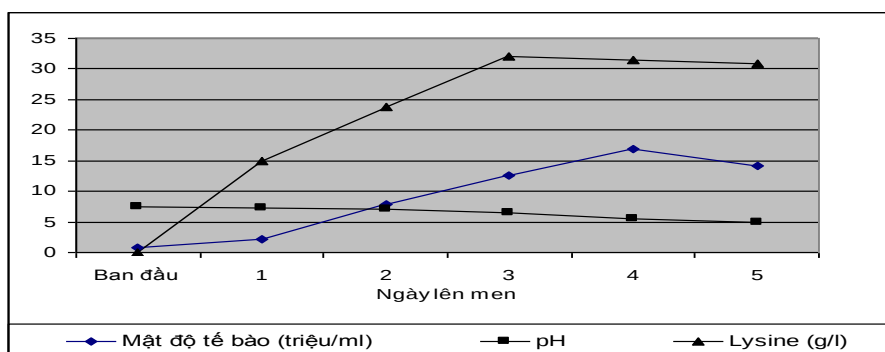
- Định tính L-lysine bằng phương pháp sắc ký giấy. Định lượng L-lysine bằng phương pháp quang phổ [1,3].

- Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng chương trình Excel, Stagraphic Version 7.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Các đặc điểm sinh học của chủng *Corynebacterium* sp. khảo sát.

Các biến động về tăng trưởng, pH môi trường và sản lượng lysine của chủng *Corynebacterium* sp. được thể hiện qua đồ thị 1.



Đồ thị 1. Biến động về tăng trưởng, pH môi trường và sản lượng lysine của chủng *Corynebacterium* sp. theo thời gian lên men

Như vậy, với chủng khảo sát, thời gian lên men cho sản lượng lysine cao nhất là 3 ngày đạt khoảng 32 g/l và mật độ tế bào đạt được cao nhất sau 3-4 ngày nuôi cấy. Xét về thời gian và hiệu suất quá trình lên men sinh tổng hợp lysine, sản lượng lysine của chủng khảo sát nằm ở mức 70-80% so với các báo cáo ngoài nước [1,3] và tương đương so với báo cáo trong nước [9]. Với mục đích nâng cao hiệu quả quá trình lên men thu nhận lysine, chúng tôi sử dụng chủng này cho các nghiên cứu tiếp theo về cố định tế bào.

3.2 Ứng dụng vi khuẩn *Corynebacterium* sp. cố định trong lên men thu nhận lysine

Sử dụng 3 chế phẩm *Corynebacterium* sp. (được cố định bằng 3 chất mang alginate, BC và phức BC-A đã giới thiệu trong phần phương pháp) để lên men thu nhận lysine nhằm so sánh hiệu quả của các chế phẩm cố định. Tiêu chí đánh giá để xác định số lần tái sử dụng là sản lượng lysine của các lần tái sử dụng lên men bằng các chế phẩm vi khuẩn cố định trong cùng một thời gian lên men là 72 giờ. Thời gian 72 giờ đã được xác định qua đồ thị 1.

Các chế phẩm vi khuẩn *Corynebacterium* sp. cố định trên alginate dưới tác động khuấy đảo trong lên men, đã bị trương và vỡ ra sau 5 lần tái sử dụng. Tỷ lệ chất mang alginate bị vỡ

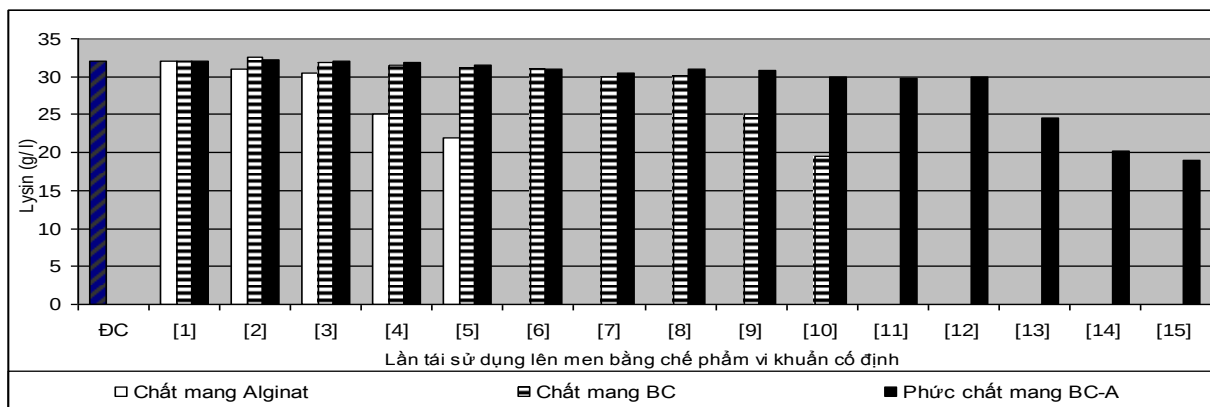
là 50%. Trong môi trường lên men có một lượng Na^+ và gốc phosphat là những tác nhân phá vỡ cấu trúc hệ gel của alginate. Trong khi đó, màng BC giữ nguyên cấu trúc rất chắc sau 10 lần theo dõi tái sử dụng (đồ thị 2).

Dựa vào các yêu cầu của chất mang trong kỹ thuật cố định tế bào, ưu điểm nổi bật của chất mang BC thể hiện qua 4 điểm: tính chất cơ lý bền vững, dễ phù hợp với hình dạng thiết bị lên men, giá thành thấp và số lần tái sử dụng cao. Nhưng kiểu cố định tế bào bằng phương pháp bẫy-hấp phụ dẫn đến hiện tượng rửa trôi tế bào sau mỗi lần tái sử dụng. Vì vậy, khi cố định tế bào bằng phương pháp bẫy hấp phụ trên BC chỉ có khả năng tái sử dụng khoảng 9 lần (đồ thị 2). Khi kết hợp với nhốt tế bào bằng alginate trên phức BC-A đã khắc phục được hiện tượng rửa trôi tế bào. Sau 10 lần tái sử dụng chế phẩm vi khuẩn cố định trên BC, tỷ lệ rửa trôi lên đến 32%, tương ứng là sản lượng lysine giảm 40% so với đối chứng. Đối với chất mang BC-A, sau 13 lần tái sử dụng tỷ lệ rửa trôi là 27%, tương ứng sản lượng lysine giảm 25% so với đối chứng. Kết quả khảo sát tỷ lệ rửa trôi tế bào thể hiện qua bảng 1.

Đánh giá hiệu quả cố định của các chế phẩm *Corynebacterium* sp. cố định trên các chất mang thông qua sản lượng lysine trong quá trình lên men và xử lý số liệu, cho kết quả như sau:

- Đối với chất mang alginate: có thể tái sử dụng 3 lần cho hiệu quả lên men không khác biệt so với đối chứng. Lần lên men tái sử dụng thứ 4, sản lượng lysine giảm khoảng 24%. Lần tái sử dụng thứ 5, sản lượng giảm 32%. Dưới tác động khuấy đảo trong quá trình lên men, chế phẩm *Corynebacterium* sp. cố định trên alginate bị trương và vỡ ra sau 5 lần tái sử dụng. Tỷ lệ chất mang alginate bị vỡ là 50%.

- Đối với chất mang BC: có thể tái sử dụng 8 lần cho hiệu quả lên men không khác biệt so với đối chứng. Lần lên men tái sử dụng thứ 9, sản lượng lysine giảm khoảng 24%. Lần tái sử dụng thứ 10, sản lượng lysine giảm 40%. Chính vì sự khác biệt của sản lượng lysine qua các lần lên men tái sử dụng, nên đối với chất mang BC, số lần tái sử dụng được xác định là 8 lần.



Đồ thị 2. Sản lượng L-lysine của các lần tái sử dụng lên men bằng các chế phẩm vi khuẩn cố định (ĐC: đối chứng lên men bằng tế bào tự do)

Bảng 1. Tỷ lệ rửa trôi tế bào sau tái sử dụng lên men chế phẩm tế bào cố định (%)

Chất mang	Lần tái sử dụng						
	[2]	[4]	[6]	[8]	[10]	[12]	[13]
Alginate	8	35	x	x	x	x	x
BC	12	15	19	25	32	x	x
BC-A	9	12	17	19	22	23	27

(x): không tiếp tục tái sử dụng

- Đối với phức chất mang BC-A: có thể tái sử dụng 12 lần cho hiệu quả lên men không khác biệt so với đối chứng. Lần lên men tái sử dụng thứ 13, sản lượng lysine giảm khoảng 25%. Lần tái sử dụng thứ 14, sản lượng lysine giảm 38%. Do sự khác biệt của sản lượng lysine qua các lần lên men tái sử dụng, nên đối với phức chất mang BC-A, số lần tái sử dụng được xác định là 12 lần.

- Chất mang BC và phức BC-A, sau số lần theo dõi tái sử dụng để lên men vẫn giữ nguyên trạng thái cấu trúc ban đầu. Đây cũng là một ưu điểm, thể hiện qua tính chất vật lý của BC [2] và cũng là một yêu cầu quan trọng của chất mang trong kỹ thuật cố định tế bào vi sinh vật [2-6]. Với phức BC-A, các tế bào được nhốt bởi gel alginate trong mạng lưới BC, giúp giảm tỷ lệ rửa trôi tế bào trong quá trình tái sử dụng để lên men (bảng 1), vì vậy số lần tái sử dụng gia tăng (đồ thị 2).

- Các số liệu đồ thị 2 được xử lý thống kê cho thấy sự khác biệt về hàm lượng lysine trong các chu kỳ từ 1-8 (đối với chất mang BC) và chu kỳ

từ 1-12 (đối với phức chất mang BC-A) không có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Với chu kỳ 8-9 (đối với chất mang BC) và chu kỳ 12-13 (đối với chất mang BC-A), sự khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

IV. KẾT LUẬN

- Chất mang BC có nhiều ưu thế hơn các chất mang truyền thống alginate trong kỹ thuật cố định tế bào vi khuẩn *Corynebacterium* sp.

- BC hoàn toàn phù hợp các yêu cầu của chất mang trong kỹ thuật cố định tế bào vi khuẩn.

- Phức chất mang Bacterial Cellulose- Alginate (BC-A) phát huy được những ưu thế của chất mang Bacterial Cellulose và Alginate.

- Hiệu quả sử dụng chế phẩm *Corynebacterium* sp. cố định trên phức chất mang BC-A trong lên men thu nhận lysine khá cao: có thể tái sử dụng chế phẩm 12 lần mà vẫn đảm bảo về mặt thời gian lên men và sản lượng lysine so với đối chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gunji Y., Yasueda H.; Enhancement of L-lysine production in methylotroph *Methylophilus methylotrophus* by introducing a mutant LysE exporter; *Biotechnology* 6, 2006, 126-132.
2. Krystynowicz A., Czaja W.; Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose; *Industrial Microbiology and Biotechnology* 29, 2002, 189-195.
3. Kiefer, Elmar Heinzle, Oskar Zelder, and Christoph Wittmann; Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose; *Applied and Environmental Microbiology* 1, 2004, 229-239.
4. Lee K. Y.; Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution; *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2000, 869-873.
5. Sheu T.Y.; Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gel; *Food science* 54, 1999, 557-561.
6. Nguyễn Thúy Hương; Tuyển chọn và cải thiện các chủng *Acetobacter xylinum* tạo cellulose vi khuẩn để sản xuất và ứng dụng ở quy mô pilot; Luận án Tiến sỹ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM, 2006.
7. Nguyễn Thúy Hương; Một số ứng dụng của cellulose vi khuẩn trong lĩnh vực thực phẩm; *Tạp chí Sinh học*, tập 30, số 1, 2008, 62-69.
8. Nguyễn Thúy Hương, Trần Thị Tường An; Cố định vi khuẩn *Lactobacillus lactis* để ứng dụng lên men thu nhận bacteriocine, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ các trường Đại học kỹ thuật*, số 63, 2008, 82-86.
9. Vũ Kim Thoa; *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, trang 381-383, Hà nội - 2003: .

Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Thúy Hương - Tel: 0955.019.067, e-mail: nthuong13567@yahoo.com
Bộ môn Công nghệ Sinh học- Trường Đại học Bách khoa - ĐHQG Tp.HCM