

ĐIỀU KHIỂN LÊN MEN ĐỂ TĂNG CƯỜNG SINH TỔNG HỢP NISIN Ở VI KHUẨN *Lactococcus lactis*

HOA THỊ MINH TÚ, NGUYỄN TIỀN THÀNH, LÊ THANH MAI, LÊ THANH BÌNH

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nisin là một bacteriocin duy nhất được sử dụng rộng rãi trong bảo quản thực phẩm [1 - 3]. Ngày nay bên cạnh những nghiên cứu làm sáng tỏ về cơ chế phân tử sự liên quan giữa cấu trúc và chức năng, cơ chế tác dụng của nisin, cơ chế miễn dịch của chủng sản cũng như áp dụng kỹ thuật di truyền, kỹ thuật protein nhằm cải thiện hoạt tính, độ hoà tan, tính bền vững, tăng cường tác động của nisin đối với các chủng vi sinh vật thuộc nhóm Gram âm dành được sự quan tâm đặc biệt thì những nghiên cứu để nâng cao khả năng sinh tổng hợp nisin vẫn luôn là nhiệm vụ hàng đầu để đưa vào sản xuất công nghiệp [4].

Điều khiển chế độ lên men là một cách có thể tác động để cải thiện hoạt tính sinh tổng hợp nisin của *Lactococcus lactis* [5 - 8]. *L. lactis* trong quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp ngoài nisin nó còn tạo ra một lượng đáng kể axit lactic như một đặc trưng của giống. Quá trình song hành này là kết quả của hoạt động chia xẻ nguồn năng lượng, chất dinh dưỡng (nguồn đường) dẫn đến giảm pH môi trường. Việc giảm nguồn các bon, tăng axit trong môi trường sẽ gây ra những tác động bất lợi cho quá trình sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp nisin của *L. lactis* [9 - 15].

Công trình này là kết quả nghiên cứu thiết lập mô hình lên men theo đó pH và nguồn dinh dưỡng được điều khiển sao cho tạo ra ảnh hưởng tốt cho quá trình tổng hợp nisin.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

- Chủng vi sinh vật: Chủng *L. lactis* 145 có đặc tính sử dụng sacaroza làm nguồn các bon là một đặc điểm quan trọng được lựa chọn. *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 là vi khuẩn kiểm định nhận được từ Bảo tàng giống vi sinh vật của Nhật bản (JCM).

- Môi trường: Môi trường lên men CM(g/l): Sacaroza: 20; cao nấm men: 10; pepton (soy): 10; KH_2PO_4 : 10; NaCl : 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2; nước: 1000 ml; pH = 6,5 - 6,8.

Môi trường nhân giống: là CM nhưng bỏ pepton và sacaroza giảm còn: 10 g/l.

Môi trường MRS (Man Rogosa Sharpe) (g/l): Pepton:10; cao thịt: 10; cao men: 5; glucoza: 20; CH_3COONa : 5; K_2HPO_4 : 2; amonixitrat: 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.2; MnSO_4 : 0,04; Tween 80:1 ml, nước: 1l; pH = 6,8 để nuôi cấy vi sinh vật kiểm định.

2. Phương pháp

- Phương pháp xây dựng đường cong sinh trưởng: Giá trị mật độ quang (OD, optical density) được sử dụng cho mục đích này.. Những thí nghiệm để xây dựng đường cong sinh

trường được tiến hành ở bình tam giác 50 ml, chứa 30 ml môi trường CM, nhân giống 5%, nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, lắc nhẹ để tạo sự đồng đều môi trường. Các mẫu được lấy tại các thời điểm nhất định, đo trên máy quang phổ bước sóng 600 nm.

- Phương pháp xác định đường dư: Lượng sacaroza còn dư được xác định bằng phương pháp enzym sử dụng Boehringer kit (Cat.no 139041, Boehringer Mannheim).

- Xác định hoạt tính nisin: Được xác định bằng đơn vị quốc tế IU (International Unit), 1 IU = 25 nisin tinh sạch. Việc xác định cơ bản dựa theo phương pháp của Fowler cộng sự đề xuất 1975 [16]. Chúng tôi đã cải tiến, thay vì dùng *Micrococcus flavus* chúng tôi chọn *L. plantarum*, một chủng kháng axit và nhạy cảm nisin làm chủng kiểm định [8]. Nisin chuẩn của hãng Chirisin với hoạt tính 8000 IU/mg được pha thành các nồng độ khác nhau. Xác định hoạt tính của những mẫu này bằng cách đo đường kính vùng ức chế đối với *L. plantarum*. Lập phương trình đường cong chuẩn tương quan giữa nồng độ nisin (IU) và đường kính vòng ức chế (mm) bằng phần mềm Excel của Microsoft, hệ số hồi quy R^2 càng gần 1 đường cong càng chuẩn.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Động thái sinh trưởng sinh và tổng hợp nisin trong môi trường CM

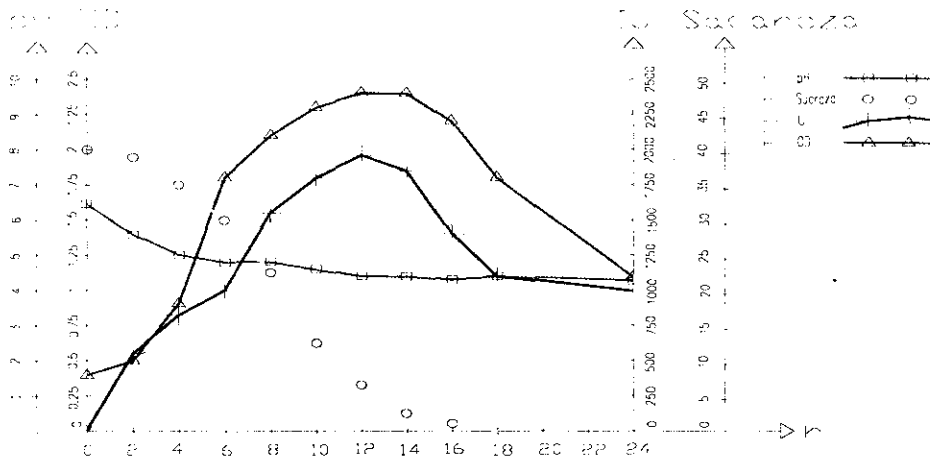
Kết quả ở bảng 1 và hình 1 cho thấy, chủng phát triển, sinh trưởng rất nhanh trong những giờ đầu thể hiện sự tăng OD, tiêu thụ đường. Sự sinh trưởng đạt cực đại đạt OD = 2,4 ở khoảng 14 - 15 giờ. Lượng đường dư còn lại rất ít vào thời điểm này (khoảng 2,5 g/l). Sự giảm pH rất đáng chú ý, tốc độ giảm khá nhanh trong những giờ đầu, từ 6,5 xuống 4,4 ở giờ thứ 12 và giảm không đáng kể trong suốt thời gian còn lại

Bảng 1. Biến diễn sinh trưởng và sinh tổng hợp nisin của chủng *L. lactis* 145 trên môi trường CM

Thời gian (h)	OD600	pH	Đường dư (g/l)	Nisin (IU/ml)
0	0,4	6,5	40,0	0
2	0,5	5,6	39,0	550
4	0,9	5,0	35,0	820
6	1,8	4,8	30,0	1000
8	2,1	4,8	22,5	1550
10	2,3	4,6	12,5	1800
12	2,4	4,4	6,5	1960
14	2,4	4,4	2,5	1850
16	2,2	4,3	1,0	1400
18	1,8	4,4	rất ít	1100
24	1,1	4,3	„	1000

Hoạt tính sinh tổng hợp nisin tăng nhanh, gần như song hành với quá trình sinh trưởng, đạt cực đại 1960 IU/ml tại thời điểm sau 12 giờ nuôi cấy. Đây cũng chính là thời điểm mà sự sinh trưởng đạt tối đa.

Đồ thị động thái còn chỉ ra sự khác biệt có thể nhận thấy. Bacterioxin, là sản phẩm cấp 1, được sinh tổng hợp ở ribosom, nó diễn ra cùng với sự sinh trưởng của tế bào, trong khi kháng sinh là sản phẩm cấp 2, chúng thường được tổng hợp muộn hơn, sau khi sự sinh trưởng đã ở trạng thái ổn định.



Hình 1. Động thái quá trình sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp nisin của chủng *L. lactis* 145

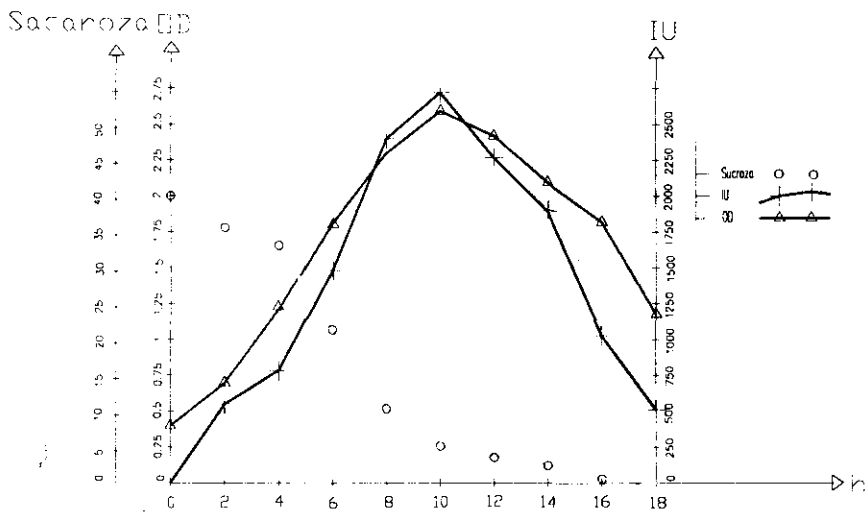
2. Mô hình lên men điều chỉnh pH

Mô hình lên men điều chỉnh pH là loài thuộc vi khuẩn lactic, *L. lactis* cũng có những đặc trưng tiêu biểu là tạo thành axit lactic. Mỗi quan hệ nội tại này rất đáng lưu ý bởi sự chia sẻ năng lượng, chia sẻ nguồn các bon để không chỉ sinh tổng hợp nisin mà còn tạo ra lượng axit lactic, làm giảm pH môi trường đáng kể. Những nghiên cứu đã được tiến hành chỉ ra tại pH = 6,5 hoạt tính tổng hợp nisin đạt cao hơn tại các giá trị pH khác [8]. Trong nghiên cứu này mô hình lên men thiết lập cho pH được cố định = 6,5 trong suốt quá trình.

Kết quả thu được trình bày tại hình 2 cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa mô hình lên men điều chỉnh pH cố định 6.5 với thông thường thể hiện ở sự sinh trưởng mạnh hơn, nhanh hơn, đạt cực đại OD = 2.6 tại 10 giờ so với OD cực đại 2.4 sau 12 giờ ở lên men thông thường. Điều quan trọng hơn là hoạt tính tổng hợp nisin không những đạt cao hơn mà còn sớm hơn, đạt 2750 IU/ml tại thời điểm 10 giờ so với 1960 IU/ml sau 12 giờ của trường hợp lên men thông thường.

Ngoài ra, trong mô hình lên men này quá trình tổng hợp nisin diễn ra trong khoảng thời gian ngắn hơn, đặc biệt thời gian mà hoạt tính tổng hợp nisin đạt cực đại rất ngắn (đường cong đánh dấu + có đỉnh nhọn, hình 2).

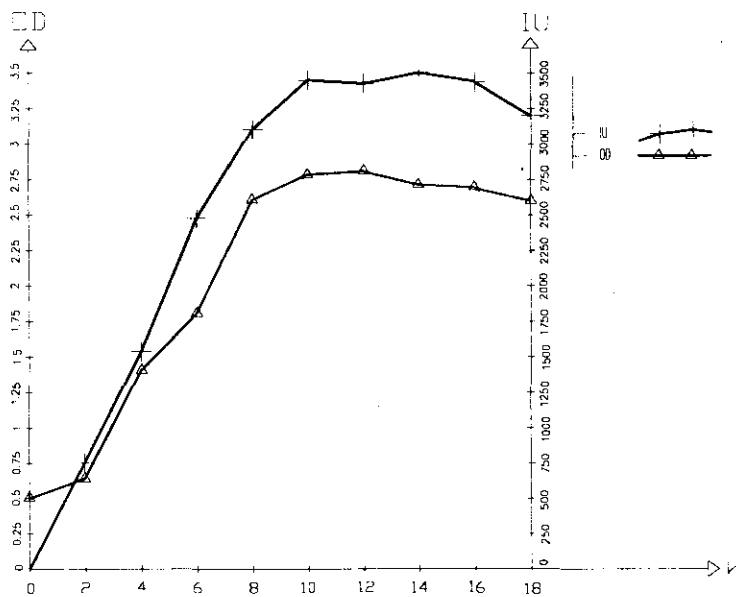
Kết quả này còn chứng tỏ trong điều kiện pH thích hợp chủng 145 có quá trình trao đổi chất tốt hơn, sử dụng năng lượng, nguồn các bon mạnh mẽ hơn, sinh trưởng tốt hơn và tổng hợp nisin cao hơn. Điều này rất có ý nghĩa bởi nó mở ra khả năng thiết lập mô hình lên men mà nếu chúng được cung cấp nguồn dinh dưỡng luôn đầy đủ thì quá trình sinh tổng hợp nisin có thể đạt được cực đại ở mức cao hơn trong khoảng thời gian dài hơn.



Hình 2. Động thái sinh trưởng và tổng hợp nisin của chủng *L. lactis* 145 trong mô hình lên men điều chỉnh pH

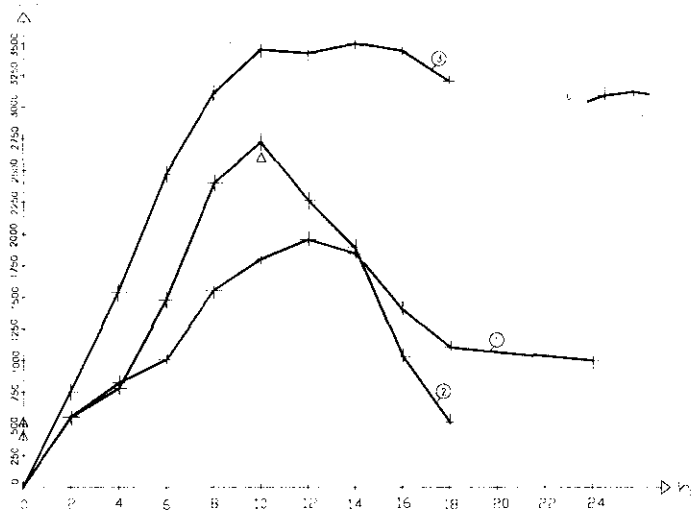
3. Mô hình lên men cố định pH và bổ sung nguồn các bon

Việc thiết lập mô hình lên men theo chế độ cố định pH và bổ sung nguồn dinh dưỡng một mặt được dựa trên những kết quả nghiên cứu đạt được ở trên. Mặt khác, những thông tin mới công bố về liên quan di truyền giữa gen sinh tổng hợp nisin và sử dụng saccharose cũng là những cơ sở lý luận cho việc thiết lập mô hình lên men này [4].



Hình 3. Động thái sinh trưởng và sinh tổng hợp nisin của *L. lactis* 145 trong mô hình lên men bổ sung nguồn saccharose

Từ kết quả ở bảng 1, hình 1 lượng đường còn dư trong môi trường tại các thời điểm được tính toán. Từ đó tính được lượng đường mà chủng đã tiêu thụ tại các thời điểm. Kết quả phân tích cho thấy lượng đường mà chủng tiêu thụ khoảng 3 g/h. Trên cơ sở đó thiết lập mô hình lên men theo đó lượng đường được bổ xung cứ mỗi 3 g/h và liên tục cho tới giờ thứ 14. Để mô hình tiến hành thuận lợi, sacaroza được pha đậm đặc, nồng độ đạt 400 g/l và mỗi lần bổ sung bao nhiêu ml dung dịch đường thì bấy nhiêu ml dịch nuôi cấy được lấy ra.



Hình 4. Động thái sinh tổng hợp nisin của *L. lactis* 145 trong 3 mô hình lên men: 1) cố định pH; 2) không điều chỉnh; 3) bổ xung nguồn sacaroza và điều chỉnh pH

Kết quả là chủng không chỉ sinh trưởng tốt hơn, đạt OD cực đại = 2.8 ở giờ thứ 10 so với OD = 2.4 ở giờ thứ 12 trong mô hình lên men thông thường và so với OD = 2.6 ở giờ thứ 10 trong mô hình lên men điều chỉnh cố định pH = 6.5. Điều quan trọng hơn là, trong mô hình lên men này, quá trình sinh tổng hợp nisin đạt cực đại ở mức cao hơn rất nhiều so với hai mô hình trước. Hoạt tính tổng hợp nisin đạt cực đại là 3450 IU/ml ở giờ thứ 10 so với 1960 IU/ml và 2750 IU/ml ở lên men thông thường và cố định pH. Không những thế, sự khác biệt còn thể hiện ở chỗ quá trình sinh tổng hợp, thời gian sinh tổng hợp nisin diễn ra trong suốt thời gian bổ xung nguồn đường. Kết quả cho thấy, thời gian tổng hợp nisin ở mức cao dao động từ 3100 đến 3500-3450-3200 IU/ml từ giờ thứ 8 đến giờ thứ 18 của quá trình lên men (hình 3).

Kết quả này chứng tỏ với việc thiết lập mô hình lên men kết hợp việc bổ xung dinh dưỡng liên tục với điều chỉnh cố định pH = 6.5 đã không chỉ nâng cao năng suất sinh tổng hợp nisin lên 179% so với lên men thông thường mà còn kéo dài thời gian tổng hợp nisin (hình 3, 4).

4. KẾT LUẬN

Quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp nisin ở chủng *Lactococcus lactis* 145 bị ảnh hưởng rất nhiều bởi sự thay đổi pH, giảm nguồn dinh dưỡng và nguồn năng lượng trong môi trường. Lên men theo mẻ (batch fermentation) là mô hình thường được lựa chọn để sản xuất nisin. Tuy nhiên mô hình này bị tác động do sự biến đổi pH cũng như suy giảm dinh dưỡng. Thiết lập mô hình lên men theo đó pH được điều khiển cố định tại 6.5 và nguồn cac bon sacaroza được cung cấp liên tục đạt nồng độ 40 g/l trong suốt quá trình đã cải thiện đáng kể hoạt tính tổng hợp nisin của chủng. Trong mô hình lên men điều khiển này năng suất tổng hợp nisin đã tăng lên

179% và thời gian đạt năng suất cực đại cũng kéo dài hơn so với mô hình lên men thông thường.

Lời cảm ơn. Công trình được hỗ trợ một phần kinh phí từ đề tài mã số 611906 thuộc chương trình NCCB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen H., and D. Hoover - Bacteriocins and their Food Applications, Comprehensive reviews in food science and food safety **2** (2003) 82-100.
2. Lê Thanh Bình - Vi khuẩn Lactic - Kỹ thuật gien, những vấn đề và triển vọng trong sản xuất thực phẩm, Unesco National Workshop on application of microbiology on food processing and beverage, Hanoi 20 - 25, Oct., 1997, p. 11.
3. Cleveland J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas - Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, Int. J. Food Microbiol **71** (2001) 1-20.
4. Dodd H.M and M.J. Gasson - A gene replacement strategy for engineering nisin, Microbiol **142** (1996) 47-55
5. Kim W.S. - Nisin production by *Lactococcus lactis* using two- phase batch culture, Letts. Appl. Microbiol **25** (1997) 169-171.
6. Delves - Broughton J. Friis - Nisin preparation- production, specifications and assay procedures, Bull. Int. Dairy Fed. **329** (1998) 18-19.
7. Matsusaki H., Endo Ishisaki A. - Lantibiotic nisin Z fermentative production by by *Lactococcus lactis* IO-1: Relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth, Appl. Microbiol. Biotechnol **45** (1996b) 36-40.
8. Phan Thị Khánh Hoa, Nguyễn Việt Cường, Lê Thanh Bình. Ảnh hưởng của một số nguồn khoáng và nitơ lên sinh trưởng và sinh tổng hợp nisin của *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, tập 39, số 5 (2001): 37-43.
9. de Vuyst I. Nutrient factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 221866 in a synthetic medium. J. Appl. Bacteriol. **78** (1995): 28-33
10. Yoo J. Y Chung K.S. Process kinetics of nisin production in batch and continuous culture. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. **17** (1989): 504-509
11. Chinanoti N Ishizaki A. Nisin Z production by *Lactococcus lactis* IO-1 using xylose as a carbon source. Bioscience biotechnol. Biochem. **62** (1998): 1022-1024
12. Parente E., A. Ricciardi. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. **52** (1999): 628-638
13. de Vuyst L. Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* strains. Biotechnol. Lett. **16** (1994): 287-292
14. Kim W. S and Dunn N. W.. The effects of concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **48** (1997): 449-453
15. Egorov N.S, Volkov A.G, Sidorenko A.T. A new nutrient medium for *Streptococcus lactis* producing nisin. Antibiotiki **25** (1980): 260-263 (in Russian)
16. Fowler G.G., Jarvis B and Tramer. J. The assay of nisin in foods. Society of Applied Bacteriology Technology Ser. **8** (1975.): 91-105

SUMMARY

FERMENTATION CONTROLLED FOR INCREASING NISIN BIOSYNTHESIS IN *LACTOCOCCUS LACTIS*

The control of fermentation is considered the way by that it influences strongly on microbial growth and biosynthesis. There are papers published on batch fermentation selection for nisin production. *L.lactic* 145 is recently found that it could use sucrose as carbon source and metabolizes sharply in the exponential phase. That result the pH changes to acid range in between 4.5 after 12 h cultivation. The nutrition depletion and pH in acid is known influence negatively on nisin synthesis. That's why the establishment of fermentation model in which pH is regulated and sucrose is added is the way by that nisin biosynthesis in *L.lactic* 145 being improved.

The fermentation was set up to run at regime of pH controlled at 6.5 and sucrose was added 40 g/l as final concentration. By that way of fed-batch fermentation the activity of nisin biosynthesis of *L.lactis* 145 increased very highly, nearly two folds than normal one.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 12 tháng 1 năm 2008

Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.