

KHẢO SÁT MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG ĐỂ SẢN XUẤT CELLULOSE VI KHUẨN TỪ *ACETOBACTER XYLINUM*

INVESTIGATION OF SOME MEDIUMS TO PRODUCE BACTERIAL CELLULOSE
BY *ACETOBACTER XYLINUM*

Hồ Lê Hân, Nguyễn Hữu Phước Trang
Trường Cao đẳng Công nghệ, Đại học Đà Nẵng
Email: lehan5@yahoo.com.vn

Đặng Đức Long
Trường Đại học Bách khoa
Đại học Đà Nẵng

TÓM TẮT

Cellulose vi khuẩn có những tính chất đặc biệt như: độ tinh khiết cao, trong suốt và có sự tương thích sinh học tốt. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số môi trường để sản xuất cellulose vi khuẩn. Kết quả thu được như sau:

Môi trường nước chiết thơm cho sản lượng cellulose cao nhất là 20 g/l sau thời gian lên men 8 ngày. Sau khi quá trình lên men kết thúc, lượng cellulose tạo ra dày bằng thể tích dịch lên men thì thu được sản lượng cellulose cao nhất: 21,3 g/l trên môi trường nước chiết thơm. Ở các môi trường nước dừa già, cao bắp và nước giá đỗ thì sản lượng cellulose thu được nằm trong khoảng từ 10 đến 14 g/l, và khi lên men kết thúc thì đạt xấp xỉ 18 g/l.

Độ pH có ảnh hưởng lớn đến sản lượng cellulose tạo ra, trên môi trường có bổ sung đệm acetat thì cho sản lượng cellulose cao hơn môi trường không bổ sung đệm. Cụ thể trên môi trường CH₃COONa 0,05 M và 0,1 M cho sản lượng lần lượt là 14,7 và 14 g/l.

Từ khóa: cellulose vi khuẩn; môi trường đệm; môi trường cao bắp; môi trường giá đỗ; môi trường nước chiết thơm; môi trường nước dừa già

ABSTRACT

Bacterial cellulose produced by the gram negative, aerobic bacterium of *Acetobacter xylinum* is chemically pure, free of lignin and hemicelluloses and has a high polymer crystallinity and a high degree of polymerization, thus it has special properties and applications compared to cellulose from other sources. It has many potential applications in biomedical biosensor, food, textile and other industries. We investigated the possibility of using agricultural products as a feedstock for the economical production of microbial cellulose.

In this study the performance of four different mediums: mature coconut broth (10g/l), pineapple extract (20g/l), bean sprout extract (14g/l), corn broth (11,3 g/l) were evaluated, for all the medium after 8 days of fermentation. The results indicate that substantial amounts of cellulose were obtained from 18 g/l to 21,3 g/l after the fermentation finished.

The pH of media affects the production of cellulose. During the fermentation, *Acetobacter xylinum* creates acetic acid, makes the pH value reduce. We also investigated the influence of pH on the production of cellulose, the mature coconut medium which have CH₃COONa 0,05 M and 0,1 M, have 14,7 g/l and 14 g/l respectively.

Key words: Bacterial cellulose; buffer broth; Coconut broth; corn broth; bean sprout extract broth; pineapple broth

1. Đặt vấn đề

Cellulose vi khuẩn hay còn gọi là bacterial cellulose là một loại polime được tổng hợp bởi vi khuẩn *Acetobacter xylinum*. Đây là loại trực khuẩn gram âm, hiếu khí bắt buộc, và không có khả năng di động [4]. Vi khuẩn này sinh trưởng ở pH tối thích từ 5 đến 6, nhưng có thể chịu được độ pH thấp, nhiệt độ sinh trưởng thích hợp từ 28 đến 32°C, và có thể tích lũy 4,5% acid acetic. Acid được sinh ra trong quá

trình hoạt động của vi khuẩn, nhưng khi nồng độ acid vượt quá mức cho phép, thì nó sẽ kìm hãm sự hoạt động của vi khuẩn. Trong điều kiện nuôi cấy tĩnh, thì vi khuẩn tạo ra lớp màng cellulose trên bề mặt môi trường, đây là một phần của hoạt động trao đổi chất thông thường của vi khuẩn *Acetobacter xylinum* [2,5].

A.xylinum hấp thụ đường glucose từ môi trường lên men. Trong tế bào vi khuẩn, glucose sẽ kết hợp với acid béo tạo thành một tiền chất nằm trên màng tế bào. Sau đó tiền chất này được

polime hóa thành cellulose và được tiết ra ngoài môi trường ngoại bào nhờ phức hợp enzyme cellulose synthase [7]. Công thức phân tử của cellulose vi khuẩn là $(C_6H_{10}O_5)_n$, các đơn phân glucose liên kết với nhau bởi các liên kết β -1,4, tương tự như cấu trúc cellulose ở thực vật, nhưng những đặc tính cơ lý và hóa học là khác nhau [8]. Sự khác biệt này thể hiện ở cấu trúc của những sợi cellulose. Ở cellulose thực vật, các chuỗi phân tử cellulose gộp lại, tạo thành cấu trúc dạng vi sợi, và sau đó xếp lại tạo thành bó. Cellulose thực vật thường tồn tại ở trong những vách tế bào, kết hợp với hemicellulose, lignin và một số thành phần khác tạo thành cấu trúc khá phức tạp [6].

Ngược lại với cellulose thực vật, thì cellulose vi khuẩn được tạo bởi *A.xylinum* có cấu trúc dạng vi sợi, với bề rộng chỉ bằng 1/100 cellulose thực vật. Cellulose vi khuẩn có những tính chất đồng nhất như: độ tinh khiết cao, độ trong suốt, khả năng chịu lực kéo trong khoảng 15-30 Gpa, khả năng tương thích sinh học tốt, có thể giữ một lượng nước gấp 100 lần khối lượng của nó [7].

Do những tính chất như trên mà cellulose vi khuẩn đang được nghiên cứu để ứng dụng trong thực phẩm, công nghiệp hóa học, và trong vật liệu y học [1,3]. Tuy nhiên, giá thành sản xuất cellulose vi khuẩn vẫn còn khá cao hơn so với những vật liệu hữu cơ phổ biến khác [7].

Do đó, nhu cầu đưa ra là phải tìm được thành phần môi trường lên men có giá thành rẻ, dễ kiếm, dễ sản xuất hàng loạt, tinh khiết và hạn chế những tạp chất có thể ảnh hưởng đến chất lượng cellulose vi khuẩn. Ngoài ra, môi trường lên men phải cho sản lượng cellulose vi khuẩn cao.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Chủng vi sinh vật

Vi khuẩn *Acetobacter xylinum* được lấy từ phòng thí nghiệm công nghệ sinh học- Đại Học Bách Khoa, Đại Học Quốc Gia tp HCM.

2.1.2. Môi trường nuôi cấy

Vi khuẩn *A.xylinum* được nuôi cấy trên một số môi trường khác nhau: nước dừa già

(M₁) (saccharose 15g, (NH₄)₂SO₄ 8 g; (NH₄)₂HPO₄ 2 g; acid acetic 5ml, nước dừa già 1000 ml), môi trường nước chiết thơm (M₂), môi trường nước chiết giá đỗ (M₃), và môi trường nước chiết bắp (M₄).

- Môi trường nước chiết thơm: thơm được gọt vỏ, bỏ mắt và lõi. Sau đó tiến hành ép lấy dịch chiết.

- Môi trường nước chiết giá đỗ: giá đỗ được đem đi rửa sạch, sau đó để ráo và đem đi ép lấy dịch.

- Môi trường nước chiết bắp: hạt bắp được luộc chín, nước luộc bắp được cho theo tỉ lệ 1 kg bắp thì 2 lít dịch chiết. Sau đó đem đi lọc và lấy dịch.

- Các môi trường sau (M₂, M₃, M₄) đều được bổ sung với thành phần tương tự như môi trường nước dừa già, trừ môi trường nước chiết thơm do có độ pH thấp nên không bổ sung thêm acid acetic.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lên men

Màng cellulose vi khuẩn được tạo ra bằng cách lên men tĩnh, trong các bình tam giác 250 ml, ở nhiệt độ 30°C.

2.2.2. Phương pháp thu nhận cellulose

Do cellulose vi khuẩn là có tính dẻo và dai nên được lấy ra khỏi bình tam giác bằng cách dốc ngược bình. Lốp màng cellulose sẽ tự thoát ra ngoài.

2.2.3. Phương pháp xác định độ Bx

Độ Brix (Bx) là hàm lượng các chất hòa tan có trong dung dịch, được biểu diễn theo phần trăm khối lượng các chất hòa tan trên khối lượng dung dịch.

Được xác định bằng dụng cụ đo Bx là chiết quang kế. Dùng đĩa thủy tinh khuấy dung dịch, sau đó nhỏ 1 giọt dung dịch lên mặt kính của chiết quang kế. Đặt nắp kính lại, và nhìn vào ống kính để xác định độ Bx.

2.2.4. Phương pháp xác định khối lượng cellulose tạo ra

Sau thời gian lên men 8 ngày trong các bình tam giác 250 ml, vi khuẩn tạo ra một lớp

cellulose dày nổi trên bề mặt môi trường. Thu nhận lớp cellulose vi khuẩn đó, và đem đi rửa nhiều lần bằng nước cất để loại bỏ môi trường. Tiến hành cân xác định khối lượng sinh khối ướt của vi khuẩn.

Sau đó, lấy lớp cellulose vi khuẩn đem đi sấy ở nhiệt độ 80°C cho đến khối lượng không đổi rồi đem đi cân, xác định được sinh khối khô của vi khuẩn.

Sau quá trình lên men kết thúc, lượng cellulose vi khuẩn tạo ra chiếm toàn bộ thể tích thì tiến hành thu nhận cellulose ở các môi trường. Lặp lại quá trình tương tự như trên.

2.2.5. Phương pháp xác định ảnh hưởng của đệm CH_3COONa đến quá trình lên men

Độ pH của môi trường lên men giữ một vai trò then chốt trong quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Do sản phẩm trao đổi chất của vi khuẩn *A.xylinum* là acid acetic nên trong suốt quá trình lên men thì độ pH có giảm. Ở môi trường nước dừa già thì độ pH thay đổi khá rộng. Để hạn chế sự thay đổi độ pH trong quá trình lên men, chúng tôi sử dụng dung dịch đệm CH_3COONa với nồng độ 0,05 M và 0,1 M để bổ sung vào môi trường nước dừa già. Môi trường nước dừa già có CH_3COONa với nồng độ 0,05 M kí hiệu là N_1 và môi trường có CH_3COONa với nồng độ 0,1 M kí hiệu là N_2 .

Sau quá trình lên men, tiến hành xác định các thông số như sinh khối ướt, sinh khối khô.

Các thí nghiệm đều lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khảo sát một số thông số trước khi tiến hành quá trình lên men tạo cellulose vi khuẩn trên các môi trường

Bảng 1. Kết quả khảo sát một số thông số của các môi trường trước khi tiến hành lên men.

Môi trường	Trước khi bổ sung		Sau khi bổ sung	
	pH	Bx	pH	Bx
M_1	5,5	4	4	7
M_2	4	15	4	18
M_3	5,7	5	4,2	8

M_4	6,3	3	3,9	6
--------------	-----	---	-----	---

Do trong thơm có chứa nhiều acid hữu cơ nên độ pH của nó khá thấp. Vì vậy, không cần phải bổ sung thêm acid acetic vào môi trường này. Sau khi bổ sung các thành phần môi trường vào thì pH của 3 môi trường còn lại đều giảm từ 1 đến 2 độ.

3.2. Kết quả khảo sát một số thông số ở các môi trường sau 8 ngày lên men

Bảng 2. Kết quả khảo sát một số thông số của các môi trường sau 8 ngày lên men

Môi trường	pH	Bx	Sinh khối ướt (g)	Sinh khối khô (g)
M_1	3	6	$22,5 \pm 1,5$	1,5
M_2	3,7	15	$21,3 \pm 0,3$	3
M_3	4,2	7	$30,1 \pm 2,1$	2,1
M_4	3,8	4	$35,5 \pm 1,5$	1,7

Từ kết quả thu được, cho thấy độ pH ở hầu hết các môi trường lên men đều giảm từ 0,1 đến 1 trừ môi trường nước dừa già thì pH không giảm. Môi trường nước dừa già sau khi lên men thì độ pH thay đổi nhiều. Đồng thời, nồng độ chất khô giảm từ 1 đến 3 độ Bx.

Sinh khối thu được trên 4 loại môi trường có sự chênh lệch rõ, môi trường M_2 đạt giá trị lớn nhất, còn môi trường M_1 đạt thấp nhất, chỉ bằng $\frac{1}{2}$ so với M_2 .

Bảng 3. Sản lượng cellulose thu được trên các môi trường

Môi trường	Tỉ lệ % (Sinh khối khô/ ướt)	Sản lượng cellulose khô (g/l)
M_1	6,67	10
M_2	14,08	20
M_3	7	14
M_4	4,79	11,3

Môi trường nước chiết thơm (M_2) có tỉ lệ % đạt giá trị cao 14,08%. Do vậy sản lượng cellulose khô thu được cao hơn so với các môi trường khác, đạt 20 g/l.



Hình 1. Môi trường M_1 sau 8 ngày lên men.



Hình 2. Môi trường M_2 sau 8 ngày lên men



Hình 3. Môi trường M_3 sau 8 ngày lên men



Hình 4. Môi trường M_4 sau 8 ngày lên men

3.3. Kết quả khảo sát một số thông số ở các môi trường sau khi quá trình lên men kết thúc

Bảng 4. Kết quả khảo sát một số thông số của các môi trường sau khi quá trình lên men kết thúc

Môi trường	pH	Bx	Sinh khối ướt (g)	Sinh khối khô (g)
M_1	2,5	5	$93,3 \pm 1,3$	2,8
M_2	2,4	15	$81,8 \pm 2,5$	3,2
M_3	3,8	6	$75,6 \pm 1,6$	2,7
M_4	3,2	3	$102,7 \pm 2$	2,7

Độ pH giảm khá nhiều ở các môi trường M_1 , M_2 , và M_4 . Trong khi đó, ở môi trường M_3 là môi trường nước chiết giá đỗ thì pH không giảm nhiều, sau khi lên men thì pH giảm xuống còn 3,8. Trong quá trình lên men, vi khuẩn *A.xylinum* tạo ra acid acetic, đây chính là nguyên nhân làm cho pH của dịch lên men giảm. Như vậy, trong 4 môi trường chọn để khảo sát thì môi trường giá đỗ ít làm thay đổi độ pH nhất. Có khả năng trong môi trường nước chiết giá đỗ có một số thành phần đệm, giúp cho pH ổn định trong suốt quá trình lên men.

Từ nồng độ chất khô thu được sau quá trình lên men, có thể thấy khả năng sử dụng đường của vi khuẩn khá thấp. Hàm lượng các chất hòa tan trong môi trường sau khi kết thúc quá trình lên men chỉ giảm khoảng 3 độ Bx.

Bảng 5. Sản lượng cellulose thu được sau khi quá trình lên men kết thúc.

Môi trường	Tỉ lệ % (Sinh khối khô/ướt)	Sản lượng cellulose khô (g/l)
M_1	3	18,7
M_2	5	21,3
M_3	3,6	18
M_4	2,6	18

Sau khi kết thúc quá trình lên men, sản lượng cellulose thu được trên môi trường nước chiết thơm vẫn cao nhất đạt 21,3 g/l. Lượng cellulose thu được trên môi trường M_3 , M_4 thấp nhất 18 g/l.



Hình 5. Hình ảnh cellulose chiếm toàn bộ thể tích bình sau khi quá trình lên men kết thúc.



Hình 6. Cellulose vi khuẩn sau khi được lấy ra khỏi bình nuôi cấy.

3.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng CH_3COONa làm môi trường đệm pH trong quá trình lên men

Bảng 6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của đệm đến quá trình lên men

Môi trường	pH trước khi lên men	pH sau khi lên men	Sinh khối ướt (g)	Sinh khối khô (g)
M ₁	4	3	22,5 ± 1,6	1,5
N ₁	4,6	4,4	26,9 ± 1,4	2,2
N ₂	4,9	4,8	25,6 ± 1	2,1

Từ kết quả thu được, cho thấy CH_3COONa đóng vai trò quan trọng trong việc giữ ổn định cho pH trong suốt quá trình lên men.

Ở môi trường lên men không có bổ sung môi trường đệm thì pH thay đổi 1 độ, trong khi ở môi trường N₁ và N₂ thì pH từ 0,1 đến 0,2 độ. Ngoài ra, lượng cellulose khô thu được ở N₁ cao hơn 1,5 lần ở M₁. Ở môi trường N₁ thì sinh khối

ướt và khô thu được cao hơn so với môi trường N₂. Có thể ở môi trường N₂, nồng độ Na^+ cao đã ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn.

Bảng 6. Ảnh hưởng của môi trường đệm đến sản lượng cellulose thu được.

Môi trường	Tỉ lệ % (sinh khối ướt/sinh khối khô)	Sản lượng cellulose khô (g/l)
M ₁	6,7	10
N ₁	8,2	14,7
N ₂	8,2	14

Sản lượng cellulose khô, hay sinh khối khô của vi khuẩn đạt giá trị cao nhất ở môi trường nước dừa già có bổ sung CH_3COONa 0,05 M (14,7 g/l), môi trường M₁ không bổ sung đệm pH thì sản lượng thấp hơn 1,5 lần so với N₁.

4. Kết luận

Qua khảo sát quá trình lên men tạo cellulose vi khuẩn trên 4 loại môi trường khác nhau: nước dừa già (M₁), nước chiết thơm (M₂), nước chiết giá đỗ (M₃), và nước chiết bắp (M₄) thì thu được kết quả như sau:

Độ pH của các môi trường có sự giảm mạnh sau 8 ngày và sau quá trình lên men kết thúc. Điều này có thể thấy rõ ở môi trường M₁ và M₂. Từ độ pH ban đầu là 4 giảm xuống còn 3 sau 8 ngày, và 2,5 sau khi quá trình lên men kết thúc.

Sinh khối thu được ở các môi trường lên men sau 8 ngày thì có sự khác biệt, ở môi trường nước chiết thơm thì lượng sinh khối thu được là lớn nhất 20 g/l, ở nước dừa già thì thấp nhất chỉ đạt 10 g/l. Sau khi quá trình lên men kết thúc thì sản lượng sinh khối thu được ở 3 môi trường M₁, M₃, M₄ gần bằng nhau. Do đó, môi trường nước chiết thơm là thích hợp để lên men sản xuất cellulose vi khuẩn.

Môi trường đệm acetat ảnh hưởng tích cực đến độ pH và qua đó ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp cellulose. Ở nồng độ CH_3COONa 0,05 M cho sản lượng cellulose thu được cao nhất là 14,7 g/l sau 8 ngày nuôi cấy. Vậy, nồng độ đệm acetat thích hợp cho vào môi trường nuôi cấy là

0,05M.

đã hỗ trợ kinh phí (đề tài Đ2013-06-07) để hoàn thành công trình này.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin cảm ơn Đại học Đà Nẵng và Trường Cao đẳng Công nghệ

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hồ Lê Hân, Nguyễn Thúy Hương (2012) Thiết kế và đánh giá màng bacterial cellulose nhằm ứng dụng làm vật liệu trong y học, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, số 11 (60), quyển II.
- [2] Ishida et al (2002) Effects of acetan on production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*66:1677-1681.
- [3] Klemm Dieter, Dieter Schumann, Ulrike Udhardt, Silvia Marsch (2001) Bacterial synthesized cellulose- artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* 26:1561-1603.
- [4] Kouda T et al (1996) Characterization of non-Newtonian behavior during mixing of bacterial cellulose in bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.*82:382-386.
- [5] Lee Hei Chan, Xia Zhao (1999) Effects of mixing conditions on the production of microbial cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 4: 41-45.
- [6] Ross, P. R. Mayer and M. Benzimann (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol, Rev*, 55:35-58.
- [7] Shoda Makoto, Sugano Yasushi (2005) Recent advances in bacterial cellulose production, *Biotechnology and bioprocess Engineering* 10:1-8.
- [8] Yoshinaga et al (1997) Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Biosci, Biotech, Biochem*, 61: 219-224.

(BBT nhận bài: 21/06/2013, phản biện xong: 23/07/2013)