

Cố định vi khuẩn *Oenococcus oeni* bằng phức chất mang alginate- bacterial cellulose để ứng dụng lên men malolactic

Nguyễn Thuý Hương, Thái Trinh Thượng Trí

Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh,
268 Lý Thường Kiệt, Phường 14, Quận 10, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nhận ngày 08 tháng 4 năm 2010

Tóm tắt. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu việc cố định tế bào vi khuẩn *Oenococcus oeni* S1 trên một số chất mang để lên men malolactic, ứng dụng lên men rượu vang hai giai đoạn. Kết quả thu được như sau:- Chất mang Bacterial cellulose (BC) có nhiều ưu thế hơn chất mang truyền thống alginate trong kỹ thuật cố định tế bào vi khuẩn *Oenococcus oeni* và 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 cố định trong lên men malolactic khá cao: có thể tái sử dụng 12 lần mà vẫn đảm bảo hoạt tính sinh học *Oenococcus oeni* trong giai đoạn lên men malolactic.

Từ khoá: *Oenococcus oeni*, malolactic, rượu vang.

1. Mở đầu

Lên men malolactic bởi *Oenococcus oeni* là quá trình decarboxyl hoá L-malat thành L-lactat và CO₂, làm giảm độ acid của vang [1]. Quá trình lên men malolactic là quá trình xảy ra sau giai đoạn lên men rượu, góp phần biến đổi và cải thiện các tính chất cảm quan của rượu vang. Trong giai đoạn này, *Oenococcus oeni* tạo ra các hợp chất thơm như diacetyl, acetoin, acetone, các este... góp phần tạo hương cho sản phẩm. Tác động của vi khuẩn *Oenococcus oeni* đến các hợp chất phenol còn cải thiện màu sắc và vị của rượu vang. Sự có mặt của quá trình lên men malolactic còn hạn chế vi sinh vật tạp

nh nhiễm bởi các hợp chất kháng khuẩn của *Oenococcus oeni* [1].

Kỹ thuật cố định tế bào đang được đề cập và quan tâm nhiều, đặc biệt trong các lĩnh vực lên men. 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 [2,3].

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu việc cố định tế bào vi khuẩn *Oenococcus oeni* trên chất mang truyền thống alginate, chất mang mới Bacterial cellulose (BC) và phức chất mang alginate – Bacterial Cellulose (A-BC) để ứng dụng lên men malolactic.

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-8-8639341.
E-mail: nthuong13567@yahoo.com

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

- Chủng vi khuẩn: *Oenococcus oeni* S1, S2, S3, S4 trong bộ sưu tập giống trường Đại học Bách Khoa TP HCM có nguồn gốc VTCC.

- Môi trường tuyển chọn: dịch nho-dâu tằm sau giai đoạn lên men chính có hàm lượng acid malic là 3,7 g/l, acid lactic là 0,5g/l, đã được xác định tại Trung tâm phân tích thí nghiệm TP.HCM.

2.2. Các phương pháp cố định tế bào

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

Cố định trên chất mang BC: Trên chất mang BC (kích thước 2cm x 2cm x 1 cm), tế bào *Oenococcus oeni* được cố định bằng phương pháp bẫy- hấp phụ (gồm 2 giai đoạn: hấp phụ vi khuẩn trên bề mặt BC và bẫy 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 bẫy 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 *Oenococcus oeni* 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: $1,8 \times 10^8/\text{g}$. Mật độ vi khuẩn mặt ngoài chất mang là: $4,5 \times 10^4$ tế bào/ cm^2 . Mật độ vi khuẩn bên trong chất mang là: $4,1 \times 10^4$ tế bào/ cm^2 [2,3,5].

Cố định trên phức chất mang BC-A:

Trên phức chất mang BC-A, chúng tôi kết hợp cả 2 phương pháp nhót và bẫy hấp phụ tế bào *Oenococcus oeni*.

Ưu thế của phương pháp nhót trong gel alginate là tế bào bị nhót 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 bẫy 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 *Oenococcus oeni* 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 *Oenococcus oeni* 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 [1,2].

- Bổ sung chất hỗ trợ tạo gel CaCl_2 2%.
- Thời gian ủ 2 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/ cm^2 . Mật độ vi khuẩn bên trong chất mang là: $4,6 \times 10^4$ tế bào/ cm^2 .

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Định lượng vi khuẩn cố định trên bề mặt chất mang BC: Mẫu đại diện $\rightarrow$ Dập mẫu vô trùng $\rightarrow$ Xử lý bằng cellulase $\rightarrow$ 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).

- Các phương pháp vi sinh: theo dõi sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, mật độ tế bào, các phương pháp định lượng vi khuẩn bằng phương pháp trực tiếp và gián tiếp.

- Các phương pháp hoá sinh:

Năng lực lên men malolactic đánh giá bởi lượng acid malic chuyển hóa và acid lactic tạo thành. Khảo sát biến đổi acid malic và acid lactic bằng phương pháp sắc ký HPLC –C Gaber, H.G. Maier, Z. Lebensm. Unters. Forsh., 189, 443-447 tại Trung tâm phân tích thí nghiệm TP.HCM.

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

2.4. Phương pháp lên men

Dịch vang non nho- dâu tằm thu được sau quá trình lên men rượu được sử dụng cho các mẫu thí nghiệm:

- Mẫu đối chứng (ĐC₀) hoàn toàn không sử dụng vi khuẩn *Oenococcus oeni*

- Mẫu đối chứng (ĐC) lên men malolactic với tế bào *Oenococcus oeni* tự do

- Các mẫu thí nghiệm [1,2],... lên men malolactic với chế phẩm *Oenococcus oeni* cố định sau các lần tái sử dụng tương ứng (lần 1, lần 2,...)

Một số các chỉ tiêu của rượu vang non nho- dâu tằm trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Một số các chỉ tiêu của rượu vang non nho- dâu tằm

Thông số đánh giá	Trước khi lên men rượu	Sau khi lên men rượu
pH	4,0	3,6
Đường tổng (g/l)	160	42
Chất khô ($^{\circ}\text{Bx}$)	24	9,2
Độ rượu (% v)	Không đáng kể	10,5

Phương pháp lên men malolactic theo phương pháp chu kỳ, trong bình lên men 5 lít của thiết bị lên men Bio Flo 115 Modular Fermentor ME1275-0055. Thời gian lên men malolactic được cố định là 3 ngày, là khoảng thời gian cần thiết cho quá trình chuyển hóa acid malic và tạo acid lactic [5].

3. Kết quả và thảo luận

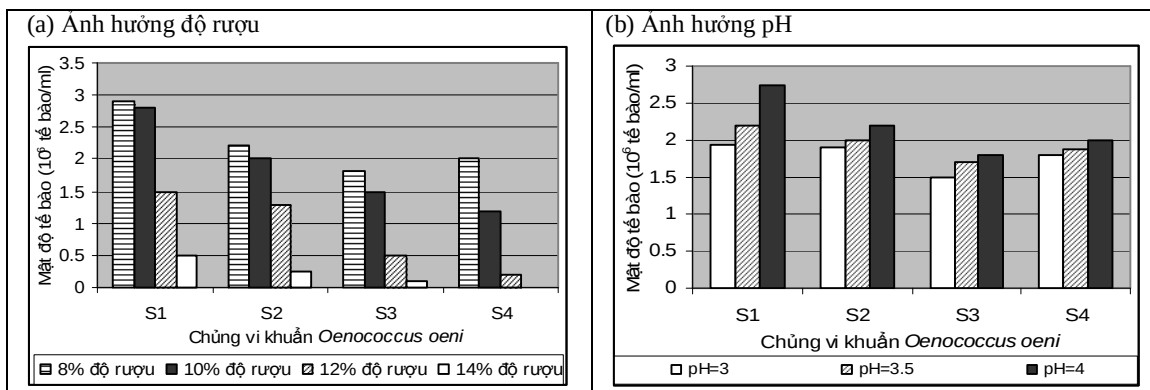
3.1. Tuyển chọn chủng *Oenococcus oeni* có ưu thế lên men malolactic

Lên men malolactic là giai đoạn lên men thứ 2, sau lên men rượu. Vì vậy các chủng vi khuẩn rượu vang phải thích nghi trong môi trường có độ rượu cao và độ acid cao. Trong 4

chủng *Oenococcus oeni*, trên môi trường sàng lọc cho thấy ưu thế thuộc về chủng S1 (đồ thị 1a). Trong môi trường có nồng độ rượu 12 % vi khuẩn phát triển yếu và gần như không phát triển ở điều kiện có nồng độ rượu 14%. Riêng về khả năng chịu acid, cả 4 chủng khảo sát đều

có khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường có pH thấp. Mật độ tế bào tương đối ổn định khi pH thay đổi từ 3-4 (đồ thị 1b).

Qua sàng lọc, chủng S1 là chủng được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Chủng S1 có nguồn gốc an toàn do VTCC cung cấp.



Đồ thị 1. Sàng lọc các chủng vi khuẩn *Oenococcus oeni*.

3.2. Khả năng ứng dụng các chế phẩm vi khuẩn *Oenococcus oeni* S1 cố định trong lên men malolactic

Trong khảo sát này, chúng tôi sử dụng dịch nho-dâu tằm sau giai đoạn lên men chính có hàm lượng acid malic là 3,7 g/l, acid lactic là 0,5g/l (ĐC₀- không có quá trình lên men malolactic)

Sử dụng 3 chế phẩm *Oenococcus oeni* (được cố định bằng 3 chất mang alginate, BC và phức BC-A đã giới thiệu trong phần phương pháp) để lên men malolactic nhằm so sánh hiệu quả của các chế phẩm cố định. Tiêu chí đánh giá để xác định số lần tái sử dụng là lượng acid malic và acid lactic của các lần tái sử dụng lên men bằng các chế phẩm vi khuẩn cố định trong cùng một thời gian lên men là 24 giờ.

Các chế phẩm vi khuẩn *Oenococcus oeni* cố định trên alginate trong lên men, đã bị trương

và vỡ ra sau 4-5 lần tái sử dụng. Tỷ lệ chất mang alginate bị vỡ là 50%. Trong môi trường lên men có một lượng Na⁺ và gốc phospho 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).

Bảng 2. 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	10	14	18	25	33	x	x
BC-A	8	11	16	18	22	24	27

(x): không tiếp tục tái sử dụng

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 8 lần (đồ thị 2 và 3). Khi kết hợp với nhót 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 33%. Đối với chất mang BC-A, sau 13 lần tái sử dụng tỷ lệ rửa trôi là 27%. Kết quả khảo sát tỷ lệ rửa trôi tế bào thể hiện qua bảng 2.

Đánh giá hiệu quả cố định của các chế phẩm *Oenococcus oeni* cố định trên các chất mang thông qua quá trình lên men malolactic (hình 2 và 3) 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 (hàm lượng acid malic trong dịch lên men ban đầu từ 3,7 g/l xuống còn khoảng 0,75 - 0,90 g/l; hàm lượng acid lactic trong dịch lên men ban đầu từ 0,5 g/l tăng lên 2,5 g/l). Từ lần lên men tái sử dụng thứ 4 hiệu quả lên men malolactic có xu hướng giảm và khác biệt so với đối chứng. Trong quá trình lên men, chế phẩm *Oenococcus oeni* cố định trên alginate bị trương và vỡ ra sau 4-5 lần tái sử dụng. Tỷ lệ chất mang alginate bị vỡ là 50%.

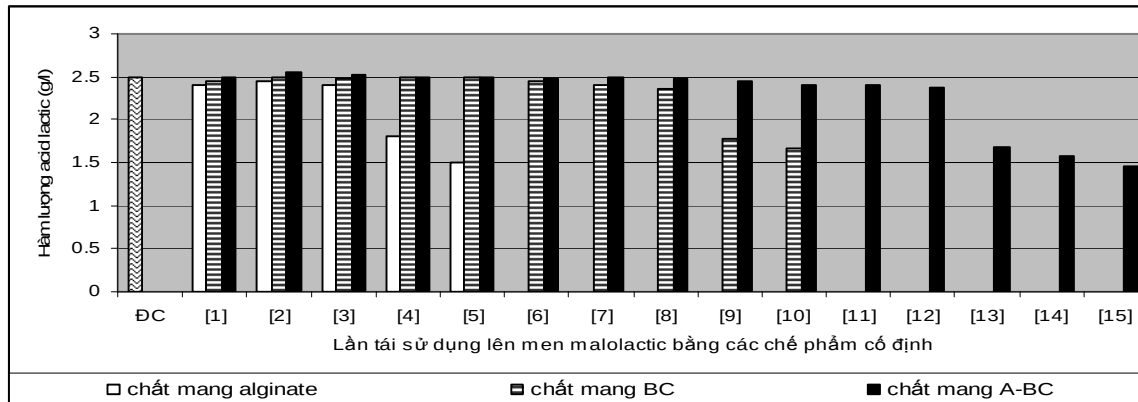
- *Đối với chất mang BC*: có thể tái sử dụng 8 lần cho hiệu quả lên men không khác biệt so với đối chứng (hàm lượng acid malic trong dịch lên men ban đầu từ 3,7 g/l xuống còn khoảng 0,75 g/l; hàm lượng acid lactic trong dịch lên

men ban đầu từ 0,5 g/l tăng lên 2,4- 2,5 g/l). Từ lần lên men tái sử dụng thứ 9, hiệu quả lên men malolactic giảm và khác biệt so với đối chứng. Chính vì sự khác biệt trên 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.

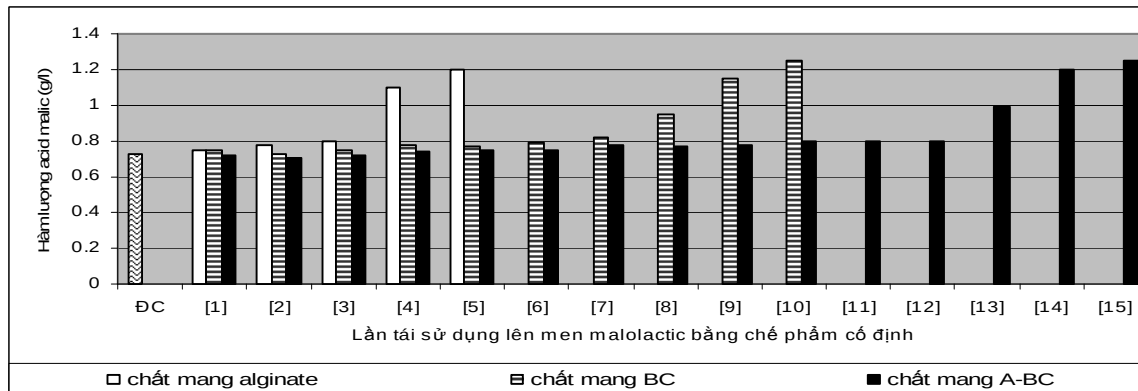
- *Đối với phức chất mang BC-A*: có thể tái sử dụng 12 lần cho hiệu quả lên men không khác biệt so với đối chứng. Từ lần lên men tái sử dụng thứ 13, hiệu quả quá trình decarboxyl hoá acid malic thành acid lactic giảm và khác biệt so với đối chứng, thể hiện qua đồ thị 2 và 3. Đối với phức chất mang BC-A, 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 [2,4,5]. Với phức BC-A, các tế bào được nhót 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 và 3).

- Các số liệu đồ thị 2 và 3 được xử lý thống kê cho thấy sự khác biệt về sự chuyển hóa acid malic thành acid lactic 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 9-10 (đối với chất mang BC) và chu kỳ 13-15 (đối với chất mang BC-A), sự khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.



Đồ thị 2. Hoạt lực lên men malolactic (hàm lượng acid lactic) qua các lần tái sử dụng chế phẩm (ĐC: Lên men malolactic với tế bào *Oenococcus oeni* tự do).



Đồ thị 3. Hoạt lực lên men malolactic (hàm lượng acid malic) qua các lần tái sử dụng chế phẩm (ĐC: Lên men malolactic với tế bào *Oenococcus oeni* tự do).

4. Kết luận

- Chủng *Oenococcus oeni* S1 có khả năng chịu độ rượu cao và pH thấp trong môi trường với sự có mặt acid malic là 0,37%.

- Chất mang BC có nhiều ưu thế hơn chất mang truyền thống alginate trong kỹ thuật cố định tế bào vi khuẩn *Oenococcus oeni*. 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 cố định trên phức chất mang BC-A trong lên men malolactic khá cao: có thể tái sử dụng 12 lần mà vẫn đảm bảo hoạt tính sinh học *Oenococcus oeni* trong lên men malolactic.

Tài liệu tham khảo

- [1] C.J. Szalka, Malolactic fermentation, *African Journal of Biotechnology* 5 (2000) 162.
- [2] Phạm Thành Hồ, Hoàn thiện quy trình sản xuất cellulose vi khuẩn quy mô pilot và bước đầu ứng

dụng trong thực phẩm, y dược và vật liệu mới, Đề tài nghiên cứu khoa học trọng điểm ĐHQG HCM 2007.

- [3] 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.
- [4] K.Y. Lee, Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in

simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 869.

- [5] A. Krystynowicz, W. Czaja, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, *Industrial Microbiology and Biotechnology* 29 (2002) 189.

Immobilizing *Oenococcus oeni* cell in bacterial cellulose-alginate and application for malolactic fermentation

Nguyen Thuy Huong, Thai Trinh Thuong Tri

*University of Technology, Vietnam National University, Ho Chi Minh City,
268 Ly Thuong Kiet, Ward 14, Dist 10, Ho Chi Minh City, Vietnam*

In this review, we investigate the immobilization of *Oenococcus oeni* S1 in some carriers (alginate and bacterial cellulose). The results are given as following:

- In immobilizing *Oenococcus oeni* S1 cell, the bacterial cellulose (BC) showed many advantages compared with traditional carrier (alginate).
- BC entirely satisfied the conditions required for immobilizing bacterial cell technology.
- The effect of using *Oenococcus oeni* S1 cell, immobilized in Bacterial Cellulose- Alginate (BC-A), for malolactic fermentation was high: it could be reused about 12 times.

Keywords: *Oenococcus oeni*, malolactic.