

Ảnh hưởng của nguồn cơ chất và kiểu lên men đến năng suất và chất lượng cellulose vi khuẩn

Nguyễn Thúy Hương*

Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh,
268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nhận ngày 2 tháng 4 năm 2007

Tóm tắt. Nghiên cứu này nhằm khảo sát khả năng lên men BC trên nhiều loại nguyên liệu, ảnh hưởng của nguồn cơ chất và kiểu lên men đến năng suất và chất lượng cellulose vi khuẩn. Kết quả thu được như sau:

- Có thể lên men sản xuất BC từ rỉ đường, nước mía, dịch trái cây. Chủng BC16 thích hợp cho cả 2 kiểu lên men trên môi trường rỉ đường, BC17 với nước mía, BC18 với dịch trái cây.
- Khảo sát tính ổn định của giống cho thấy: Mật độ Cel^- (mật khả năng tạo BC) tăng dần sau mỗi đợt cấy chuyển và ngày càng chiếm ưu thế. Mật độ Cel^- cao hơn trong môi trường không bổ sung ethanol.
- Ngoài hình dạng bên ngoài hoàn toàn khác nhau, độ chịu lực của BC nuôi cấy bề mặt cao hơn rất nhiều so với nuôi cấy chìm. Tuy nhiên khả năng giữ nước và ẩm độ của BC nuôi cấy chìm cao hơn BC nuôi bề mặt.

Từ khóa: *Acetobacter xylinum*, Bacterial Cellulose, BC.

1. Mở đầu

Cellulose vi khuẩn (Bacterial Cellulose - BC) do *Acetobacter xylinum* tạo ra có nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau [1,2]. Ở Việt Nam, nguồn cellulose vi khuẩn này chỉ được sản xuất từ nguồn nguyên liệu duy nhất là nước dừa già. Nguồn nguyên liệu nước dừa già có số lượng hạn chế, chỉ có ở một số địa phương phía Nam. Nguyên liệu nước dừa già hoàn toàn không đáp ứng cho sản xuất BC quy mô lớn và khó ứng dụng rộng rãi.

Nghiên cứu này nhằm khảo sát khả năng lên men BC trên nhiều loại nguyên liệu, ảnh hưởng

của nguồn cơ chất và kiểu lên men đến năng suất và chất lượng cellulose vi khuẩn [3].

2. Vật liệu và phương pháp

- Giống vi sinh vật: Các chủng *A.xylinum* có trong bộ sưu tập giống [4]
- Môi trường nuôi cấy: Các môi trường được điều chế từ các nguồn nguyên liệu rỉ đường, nước mía, dịch trái cây phế thải, dịch chua đậu nành.
- Kiểu lên men: Nuôi cấy bề mặt trong các khay nhựa có kích thước 30x25x7cm, nhiệt độ phòng, pH=4,5. Nuôi cấy chìm ở 2 điều kiện lắc (250 vòng/phút) và sục khí trong bình erlen 1000 ml.

* ĐT: 84-8-8639341.

E-mail: nthuong13567@yahoo.com

- Nghiên cứu tính ổn định của giống: Tính ổn định của giống được nghiên cứu bằng phương pháp cải tiến Ben-Bassat [5]. Trong điều kiện nuôi cấy bề mặt, môi trường được ủ ở 48 giờ, thu nhận dịch huyền phù. Lớp màng cellulose dùng để cấy vào môi trường mới trong lần nuôi cấy kế tiếp. Quá trình này lặp lại 4 lần. Huyền phù tế bào sau mỗi lần chuyển được pha loãng trải trên môi trường thạch đĩa, ủ ở 30°C. Sau khoảng thời gian đó, các khuẩn lạc *A.xylinum* được khảo sát kiểm tra ở độ phóng đại 12 lần. Chọn lọc và đếm các thể đột biến Cel⁻. Quá trình này cũng được áp dụng tương tự cho nuôi cấy lỏng.

- Định lượng vi sinh vật bằng phương pháp đếm gián tiếp khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa

- Xác định khối lượng BC thô: sau khi thu hoạch để ráo nước hoàn toàn (30 phút) cân trọng lượng tươi hoặc sấy ở 105°C cho đến khi

trọng lượng không đổi để xác định trọng lượng BC khô.

- Xác định ẩm độ theo TCVN 4326-2001, tro theo TK.AOAC 900-02, cellulose theo TCVN 4329-93

- Xác định độ chịu lực theo TCVN 358-70.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân tích sơ bộ thành phần nguyên liệu

Thành phần hoá học cơ bản của các nguyên liệu thay thế nước dừa già sử dụng trong báo cáo này được trình bày tóm tắt qua bảng 1

Qua kết quả khảo sát sơ bộ, dựa vào nhu cầu dinh dưỡng và các đặc điểm sinh lý của *A.xylinum*, các nguồn nguyên liệu trên được sử dụng làm môi trường dinh dưỡng nuôi cấy, nhân giống và lên men thu nhận BC.

Bảng 1. Một số thành phần hoá học cơ bản của các nguyên liệu thay thế nước dừa già

Rỉ đường	Nước mía	Phụ phẩm dịch trái cây
Đường tổng: 52%	Đường tổng: 14%	Đường tổng: 8,7%
Protein: 2,5%	Độ khô, °Bx: 18,5	Độ khô, °Bx: 15
pH: 7,5	pH: 5,3	pH: 5,5

Môi trường rỉ đường

Tiến hành phân lập và nhân giống trên môi trường rỉ đường để sơ tuyển chủng vi khuẩn phù hợp nguồn nguyên liệu rỉ đường. Kết quả sau 5 ngày nuôi cấy thu được như sau: Xét 2 yếu tố mật độ tế bào và khả năng sản sinh cellulose, có 3 chủng phát triển nhanh. Đó là

các chủng *A.xylinum* BC16, BC25 và BC34. Mật độ tế bào 3 chủng này đạt hơn 45 triệu tế bào/ml và khả năng sản sinh BC cao. Trong 3 chủng trên, thì *A.xylinum* BC16 và BC 34 có ưu thế trong cả lên men bề mặt và lên men chìm (bảng 2).

Bảng 2. Tuyển chọn giống qua mật độ tế bào và sản lượng BC trên môi trường rỉ đường

Tên chủng	Mật độ tế bào (triệu tế bào/ml)	Lên men bề mặt (g/l)		Lên men chìm (g/l)	
		Sản lượng BC tươi	Sản lượng BC khô	Sản lượng BC tươi	Sản lượng BC khô
BC7	12,81	Phát triển chậm sau 5 ngày, màng mỏng			
BC8	35,60	400	3,49	128	1,09
BC16	46,90	810	7,11	515	4,59
BC17	40,54	450	3,55	Phát triển chậm	
BC18	40,07	380	3,45	210	1,78
BC25	45,65	780	7,02	Không phát triển	
BC34	45,05	800	7,10	650	5,65

Trên môi trường rỉ đường cả 3 chủng vi khuẩn *A.xylinum* BC16, BC25 và BC34 đều tạo BC tốt khi lên men bề mặt đạt trong lượng BC khô từ 7,02 đến 7,11 g BC khô/l môi trường. Trong nuôi cấy chìm chỉ có chủng BC 34 là tốt nhất đạt 5,10gBC khô /l khi nuôi cấy lắc và 5,65 g/l khi có sục khí.

Môi trường nước mía

Trên môi trường nước mía, các chủng khảo

3.2. Nghiên cứu tính ổn định của các chủng *A.xylinum* được sàng lọc trên môi trường rỉ đường theo các kiểu nuôi cấy

Trở ngại chính gặp phải trong nuôi cấy chìm, *A.xylinum*-chủng giống sản sinh cellulose có khuynh hướng trở lại dạng đột biến không sản sinh cellulose (ký hiệu Cel⁻). Các thể này là một đặc điểm sinh học của *A.xylinum* đã được nhiều tác giả đề cập đến [5]

Nuôi cấy bề mặt

Khảo sát trên môi trường rỉ đường bằng kiểu nuôi cấy bề mặt đều không có ảnh hưởng tác động nào đáng kể đến sự hình thành các thể Cel⁻. Trong toàn bộ các đợt cấy chuyển nuôi cấy bề mặt hoàn toàn không thu nhận được dạng Cel⁻ nào.

Nuôi cấy chìm

Bảng 5. Mật độ Cel⁻ sau các đợt cấy chuyển (%)

Lần cấy chuyển	Chủng	Nuôi cấy lắc	Nuôi cấy sục khí
1	BC16	15	5,5
	BC25	25	28
	BC34	10	15
2	BC16	20	10
	BC25	38	40
	BC34	15	17
3	BC16	28	15,5
	BC25	80	58,5
	BC34	30,5	30

Mật độ Cel⁻ tăng dần sau mỗi đợt cấy chuyển. Khi mật độ Cel⁻ tăng, dẫn đến sự sinh trưởng và phát triển của Cel⁻ chiếm ưu thế. Giữa 2 kiểu nuôi cấy lắc và sục khí cũng có sự khác nhau về mật độ Cel⁻ của cùng một chủng giống. Trong 3 chủng khảo sát, BC16 có mật độ Cel⁻ xuất hiện sau các đợt nuôi cấy là thấp nhất.

Khảo sát chủng BC16 trên môi trường rỉ đường bằng kiểu nuôi cấy lắc, giữa 2 môi trường có và không có bổ sung ethanol, xu hướng gia tăng mật độ Cel⁻ ở môi trường không có ethanol (sau lần cấy chuyển thứ 4 mật độ Cel⁻ trên môi trường có bổ sung ethanol là 18 %, trên môi trường không bổ sung ethanol là 25%). Về mặt lý thuyết các tế bào Cel⁻ thường xuất hiện ở điều kiện nuôi cấy chìm và khi nuôi cấy trên môi trường quen thuộc. Trong một số

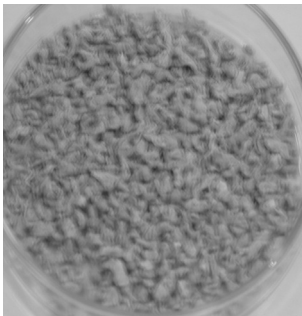
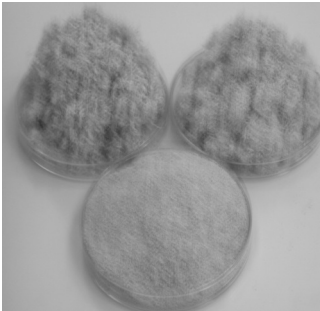
nghiên cứu của một số nhóm tác giả đều có kết luận chung về sự có mặt ethanol từ 2-5% làm tăng hiệu suất lên men cellulose vi khuẩn [6]. Mật độ Cel⁻ giảm ở môi trường có ethanol chi phối đến năng suất lên men BC.

3.3. Khảo sát một số tính chất BC

Nhằm đa dạng các sản phẩm BC phù hợp hướng ứng dụng, chúng tôi tạo 4 dạng sản phẩm BC từ 2 kiểu nuôi cấy bề mặt (S-BC) và nuôi cấy chìm (A-BC).

Một số hình ảnh và đặc tính của 4 dạng sản phẩm S-BC (BC nuôi cấy bề mặt) và A-BC (BC nuôi cấy chìm) được thể hiện qua hình 1, bảng 6.

Bảng 6. Đặc tính sản phẩm BC

STT	Sản phẩm BC (Kích thước)	Độ chịu lực (N/cm ²)	Độ hút nước (g nước/g cellulose)	Cellulose (%)	Tro (%)	Hình 1 Hình ảnh sản phẩm BC
1	Màng S-BC (20cmx25cm)	48.10 ⁵	45	68	0,05	
2	Miếng nhỏ S-BC (5mm x3-5mm)	48.10 ⁵	36	68	0,05	
3	Hạt nhỏ A-BC (1-1,5 mm)	36.10 ⁴	120	61	0,04	
4	Bột, Sợi A-BC (4-5mm)	36.10 ⁴	115	61	0,04	

Phương pháp tạo 4 dạng sản phẩm BC như sau:

- BC dạng màng: Màng S-BC sau xử lý, sấy (ẩm độ từ 10-15%), khử trùng 121⁰C - 20 phút.
- BC dạng miếng nhỏ: Màng S-BC cắt thành miếng nhỏ kích thước 2x2cm, sau xử lý, sấy (ẩm độ từ 10-15%), khử trùng 121⁰C-20 phút.
- BC dạng hạt nhỏ: Hạt A-BC sau xử lý, sấy (ẩm độ từ 10-15%), khử trùng 121⁰C - 20 phút.
- BC dạng sợi, bột: Sợi A-BC sau xử lý, sấy phun. Quá trình sấy phun thực hiện trên máy Mini Spray Dryer – Yamoto với các thông số phù hợp qua thăm dò (Lưu lượng dịch phun: 2 cm³/s, áp suất phun: 2 kg/cm², nhiệt độ vào: 150⁰C, nhiệt độ ra: 80⁰C).

4. Kết luận

- Có thể lên men sản xuất BC từ rỉ đường, nước mía, dịch trái cây. Chủng BC16 thích hợp cho cả 2 kiểu lên men trên môi trường rỉ đường, BC17 với nước mía, BC18 với dịch trái cây.
- Khảo sát tính ổn định của giống cho thấy: Mật độ Cel' (mật khả năng tạo BC) tăng dần sau mỗi đợt cấy chuyển và ngày càng chiếm ưu thế. Mật độ Cel' cao hơn trong môi trường không bổ sung ethanol.
- Ngoài hình dạng bên ngoài khác nhau, độ chịu lực của BC nuôi cấy bề mặt (S-BC) cao hơn rất nhiều so với nuôi cấy chìm (A-BC).

Tuy nhiên khả năng giữ nước và ẩm độ của A-BC cao hơn S-BC.

Tài liệu tham khảo

- [1] E.J. Vandamme, S. De Baets, A. Vanbaelen, K. Joris, P. De Wulf, Improved production of bacterial cellulose and its application potential, *Polymer Degradation and Stability* 59 (1998) 93.
- [2] F. Yoshinaga, N. Tonouchi, K. Wanatabe, Research progress in production of bacteria cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61 (1997) 219.
- [3] T. Tsuchida, F. Yoshinaga, Production of bacterial cellulose by agitation culture systems, *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 2453.
- [4] Nguyễn Thúy Hương, Phạm Thành Hồ, Chọn lọc dòng *Acetobacter xylinum* thích hợp cho các loại môi trường dùng trong sản xuất cellulose vi khuẩn với quy mô lớn, *Tạp chí Di truyền học và ứng dụng* 3 (2003) 49.
- [5] A. Krystynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jezierska, M. Goncalves-Miskiewicz, M. Turkiewicz, S. Bielecki, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, *Industrial Microbiology and Biotechnology* 29 (2002) 189.
- [6] T. Naritomi, T. Kouda, H. Yano, F. Yoshinaga, Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture, *Fermentation and Bioengineering* 85, 6 (1998) 598.

Influences of the substrate sources and the fermentation types to the yield and quality of bacterial cellulose

Nguyen Thuy Huong

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

The bacterial cellulose (BC) produced by *Acetobacter xylinum* has many applications in different fields. This study focused on the BC production by using different raw materials, on detecting the ability of BC production and on the yield of BC strains such as BC16, BC17, BC18 by using the culture of different fermentations. We also investigated the mechano-physical characteristics of BC. The studies related to the quality of BC show that the tensile strength of BC obtained by static culture is much higher than that obtained by submerged fermentation. However, the water absorption ability and humidity of the latter is higher than that of the former.