

Tối ưu quá trình lên men thu nhận amino acid l-lysine từ vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* VTCC-B-656

Trần Thị Minh Tâm, 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, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nhận ngày 10 tháng 3 năm 2009

Tóm tắt. Tối ưu quá trình lên men thu nhận amino acid lysine từ *C. glutamicum* VTCC-B-656 bằng phương pháp Taguchi. Chủng vi khuẩn này sinh lysine đạt năng suất cao nhất sau 72 giờ lên men với thành phần môi trường: dịch chiết bắp 20%, glucose 8,35%, Biotine 1,57 mg/l, Urease 0,74%, KH_2PO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025%, Thiamine 4mg/l. Lên men với điều kiện nhiệt độ $\sim 28^\circ\text{C}$, pH môi trường ~ 7.0 , chế độ lắc vòng 200 vòng/ phút và giống được thêm vào canh trường là 10%. Dưới những điều kiện này *C. glutamicum* VTCC-B-656 đã cho lượng lysine xấp xỉ 26,01 g/l tăng gấp 5 lần so với trước đó.

Từ khóa: lysine, *Corynebacterium* sp. , *C. glutamicum*

1. Mở đầu

Lysine là một trong chín amino acid mà cơ thể người và động vật không tự tổng hợp được. Lysine được tổng hợp từ công nghệ hóa học, tiếp đó là công nghệ tách chiết từ thực vật và phổ biến hiện nay là công nghệ lên men vi sinh vật [1]. Về công nghệ sản xuất lysine trên thế giới, lysine đã được sản xuất ở quy mô công nghiệp. Các nước như Nhật Bản, Mỹ, Đông Âu ngày càng mở rộng công nghệ lên men vi sinh vật với hiệu suất quá trình lên men cao, ưu điểm nổi trội là chủng giống [2]. Trong khi đó ở Việt nam, được nhập khẩu với số lượng thống kê hằng năm tương đối lớn, ngoài nhà máy sản xuất lysine với quy mô lớn của công ty Vedan của Đài loan [3], Việt nam còn đang bước đầu nghiên cứu ở quy mô phòng thí nghiệm, giống

vi sinh vật chưa đạt chuẩn. Về ứng dụng trên thế giới, lysine đã được ứng dụng trong công nghệ thực phẩm và công nghệ dược liệu song ở Việt nam mới dừng lại ở mảng thức ăn chăn nuôi [4]. Đó là những lý do chúng tôi tiến hành những nghiên cứu này với nội dung tối ưu quá trình lên men thu nhận amino acid lysine từ *C. glutamicum* VTCC-B-656.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Chủng vi sinh vật. Chủng *Corynebacterium glutamicum* VTCC-B-656 tại ngân hàng giống Việt nam có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* AS 1.1886, mật độ tế bào trong canh trường đạt 2.10^9 tế bào/ ml.

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

Các thí nghiệm được tiến hành tại Bộ môn Công nghệ Sinh học trường Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh.

Môi trường nuôi cấy. Môi trường giữ giống: Peptone 1%, Cao nấm men 0,5%, NaCl 0,5%, Glucose 0,5%, Agar 2%, pH ~ 7,2. Môi trường nhân giống: Glucose 2%, Dịch chiết bắp 5%, Peptone 1%, Cao nấm men 0,5%, NaCl 0,5%, pH ~ 7,2. Môi trường lên men: dung dịch (dd) A: Glucose 10%, dd B: Sucrose 10%, dd C: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 0,5%, dd D: dịch chiết bắp 200g/lít, KH_2PO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025%, dd E: Biotin 2mg/l và Thiamine 4mg/l, Hấp khử trùng dd A, dd B và dd C trong $110^\circ/10$ phút; dd D trong $121^\circ/20$ phút; dd E lọc bằng phễu vô trùng, sau đó trộn các dung dịch lại.

Hóa chất: thuốc hiện màu Ninhydrin 1% (w/v) trong Acetone 99%.

2.2. Phương pháp

Phương pháp vi sinh. Khảo sát các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến quá trình lên men bằng phương pháp tối ưu đơn yếu tố, các kết quả của thí nghiệm trước là tiền đề cho thí nghiệm tiếp theo. Tối ưu toàn phần các yếu tố môi trường bằng phương pháp Taguchi [5].

Phương pháp hóa sinh. Định tính amino acid lysine trong mẫu bằng sắc ký bản mỏng. Định lượng amino acid lysine trong mẫu bằng phương pháp so màu ở bước sóng 560nm.

2.3. Bố trí thí nghiệm

2.3.1. Khảo sát các điều kiện lên men ảnh hưởng đến quá trình lên men

Tiến hành khảo sát các yếu tố nhiệt độ (20°C , 25°C , 30°C , 35°C , 40°C), pH (6,5, 7,0, 7,5, 8,0), chế độ lắc (tĩnh, 100rpm, 150rpm, 200rpm, 250rpm), tỷ lệ giống bổ sung vào canh trường (4%, 7%, 10%, 13%). Chỉ tiêu đánh giá là lượng lysine sinh ra sau 72 h giờ lên men. Thí nghiệm trước là tiền đề cho thí nghiệm sau.

2.3.2. Khảo sát sự ảnh hưởng của hai nguồn đường glucose và sucrose

Tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của hai nồng độ đường (% w/v) glucose và sucrose ở các mức (4%, 7%, 10%, 13%) trên điều kiện nhiệt độ, pH, chế độ lắc, tỷ lệ giống đã tối ưu ở trên. Chỉ tiêu đánh giá là lượng lysine sinh ra sau 72 h giờ lên men.

2.3.3. Tối ưu toàn phần các thành phần môi trường bằng phương pháp Taguchi

Sử dụng các điều kiện tối ưu đã khảo sát, chúng tôi tiến hành tối ưu các thành phần môi trường nguồn cacbon, nguồn nitơ, dịch chiết bắp, vitamin H (biotine) bằng phương pháp tối ưu toàn phần theo Taguchi. Các mức thí nghiệm được bố trí theo bảng 1.

Bảng 1. Các mức bố trí thí nghiệm tối ưu toàn phần bốn yếu tố môi trường

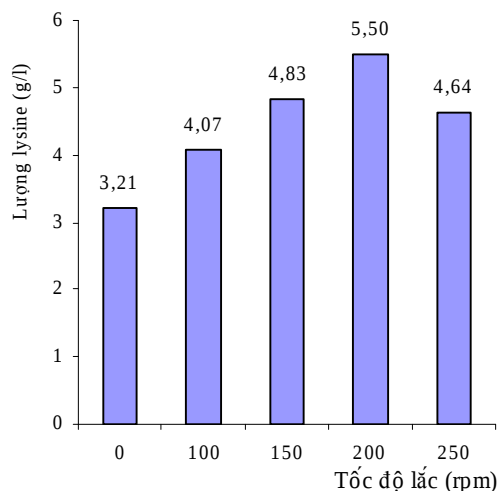
STT	Các yếu tố	Các mức		
		Mức dưới (-1)	Mức trung tâm (0)	Mức trên (+1)
01	Dịch chiết bắp (x_1)	15%	20%	25%
02	Glucose (x_2)	7%	10%	13%
03	Biotine (x_3)	1 mg/l	2 mg/l	3mg/l
04	Ure (x_4)	0,3%	0,5%	0,8%

3. Kết quả

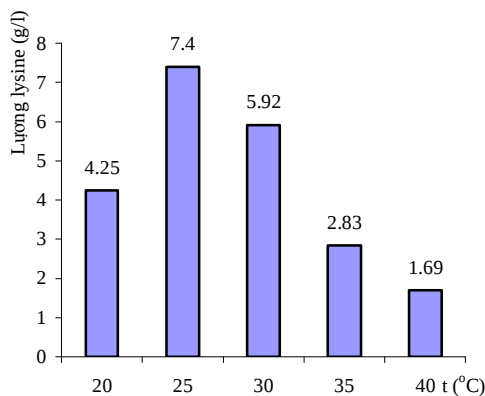
3.1. Khảo sát các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến quá trình lên men

C. glutamicum là chủng vi khuẩn hiếu khí, chúng cần oxy hòa tan để sinh trưởng và tích lũy lysine. Tuy nhiên, thừa lượng oxy hòa tan *C. glutamicum* không có khả năng sản sinh amino acid lysine [1]. Kết quả khảo sát tốc độ lắc vòng ảnh hưởng đến năng suất lysine được trình bày ở biểu đồ 1. *C. glutamicum* cũng là vi khuẩn có giới hạn nhiệt rộng từ 20°C đến 40°C , thích hợp nhất ở $28 \sim 30^\circ\text{C}$. Chúng tôi tiến hành thí nghiệm ở các mức 25°C , 30°C , 35° , 40°C thì

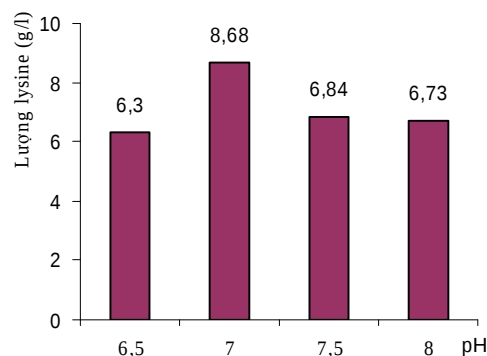
ở 35⁰- 40⁰C sinh khối phát triển rất yếu và lượng lysine sinh ra chỉ ở dạng vết. Ở giới hạn nhiệt độ 25⁰C - 30⁰C lượng lysine sinh ra nhiều hơn (biểu đồ 2). Mặt khác, *C. glutamicum* sinh trưởng ở giới hạn pH 6,5 ~ 8,0; trong quá trình sản sinh lysine lượng pH không đổi nhiều do lysine có tính kiềm nhẹ [2]. Sự biến thiên pH môi trường ảnh hưởng đến năng suất lysine được trình bày ở biểu đồ 3.



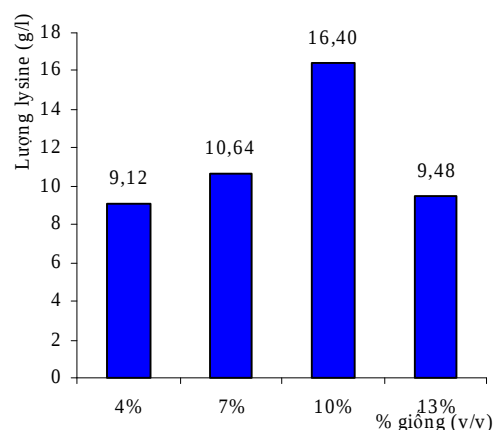
Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của tốc độ lắc vòng đến năng suất lysine.



Biểu đồ 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến năng suất lysine.



Biểu đồ 3. Ảnh hưởng của pH môi trường lên men đến năng suất lysine.



Biểu đồ 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống bổ sung vào canh trường đến năng suất lysine.

Biểu đồ 1 chỉ ra rằng khi tăng chế độ lắc thì năng suất lysine tăng nhưng chế độ lắc lớn thì năng suất lysine lại giảm. Từ những nghiên cứu lý thuyết và kết quả thực nghiệm cho thấy ở tốc độ khuấy 200 vòng/ phút là phù hợp khi lên men thu nhận amino acid lysine trong phòng thí nghiệm. Tiến hành khảo sát nhiệt độ môi trường đến năng suất lysine ở chế độ lắc vòng 200 vòng/ phút thì giới hạn nhiệt 30 – 40⁰C lượng lysine sinh ra thấp, với giới hạn nhiệt từ 20 - 30⁰C lượng lysine sinh ra cao hơn đặc biệt trong khoảng 25 -30⁰C. Bởi lý do đó, chúng tôi tiến hành chia nhỏ giới hạn nhiệt ở các mức 27⁰, 28⁰ kết quả cho thấy ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến năng suất lysine

Nhiệt độ môi trường (°C)	25°C	27°C	28°C	30°C
Lượng lysine (g/l)	7,4	7,96	8,35	4,92

Với kết quả này, cho thấy ở mức 28°C lượng lysine sinh ra đạt 8,35 g/l cao hơn các mức lân cận, do đó chúng tôi chọn nhiệt độ môi trường để lên men chủng này là 28°C.

Theo nghiên cứu của chúng tôi, ở pH ~ 7,0 là tối ưu cho quá trình lên men thu nhận amino acid lysine. Ở mức pH 7,5 ~ 8,0 lượng lysine có giảm nhưng không lớn (biểu đồ 3). Từ kết quả khảo sát chúng tôi sử dụng pH của môi trường lên men là 7,0 cho các thí nghiệm tiếp theo trong đề tài nghiên cứu quá trình lên men thu nhận lysine.

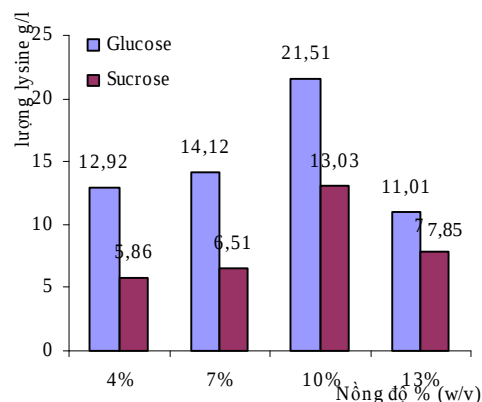
Với những nghiên cứu trên đây làm tiền đề cho thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ giống bổ sung vào canh trường lên men. Kết quả đã chỉ ra rằng, ở tỷ lệ giống 10% bổ sung vào canh trường cho năng suất thu nhận lysine là 16,4 g/l; tỷ lệ giống này tương đối lớn so với quy mô nuôi cấy trong công nghiệp đã công bố ($\leq 10\%$).

Do vậy, ở bước đầu nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến hiệu suất lên men thu nhận lysine chúng tôi đã xác định được các điều kiện tối ưu sau: chế độ lắc 200 rpm/ phút, nhiệt độ 28°C, pH ~ 7,0, phần trăm giống bổ sung là 10% lượng lysine tích lũy trong canh trường đạt 16,4 g/l sau 72 giờ lên men theo mẻ. Theo Lương Đức Phẩm, (1998) cho biết chủng giống có khả năng sinh lysine $\geq 15\text{g/l}$ là điều kiện để chọn giống [6], sau bước đầu khảo sát thì chủng giống *C.glutamicum* VTCC – B – 656 đạt 16,4g/l là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng hai nguồn cacbon glucose và sucrose đến quá trình lên men

C. glutamicum sinh trưởng trên môi trường có nồng độ đường cao, thủy phân đường tạo

amino acid lysine, chúng sử dụng nguồn cacbon chủ yếu là cacbonhydrate như glucose, sucrose.... Kết quả khảo sát cho thấy, ở hai nguồn cacbonhydrate, lượng lysine sinh ra đều tăng khi nồng độ đường trong canh trường tăng. Tuy nhiên, nồng độ đường quá cao gây ức chế sự sinh lysine (biểu đồ 5).



Biểu đồ 5. Ảnh hưởng của hai nguồn cacbon glucose và sucrose đến năng suất lysine.

Những nghiên cứu trước đây, lượng đường bổ sung vào canh trường duy trì ổn định là 2 - 3%, và lượng đường tổng từ 6-12%. Ở trên nhiều nguồn cacbon, *C. glutamicum* đều có thể sinh trưởng và sinh amino acid lysine, đặc biệt, cơ chất là glucose cho hiệu suất cao hơn các cơ chất khác [7-9]. Kết quả khảo sát đã chỉ ra rằng, ở nồng độ glucose 10% năng suất lysine được cải thiện đáng kể lên đến 21,5 g/l ở điều kiện nuôi cấy tối ưu. Mặt khác, trong nghiên cứu sản xuất quy mô lớn những cơ chất thay thế glucose có thể sử dụng hiệu quả là dịch chiết bắp, mật rỉ đường, ... Do đó, chúng tôi quyết định chọn glucose với nồng độ 10% làm cơ chất bổ sung cùng với dịch chiết bắp 200g/l thêm vào môi trường lên men để tiến hành thí nghiệm tối ưu toàn phần các thành phần môi trường trong canh trường lên men nhằm lợi ích kinh tế và hiệu suất thu lysine cao.

3.3. Tối ưu toàn phần các yếu tố môi trường lên men

Các kết quả thí nghiệm tối ưu toàn phần các yếu tố môi trường và chỉ tiêu theo dõi là lượng lysine sinh ra trong canh trường được bố trí theo ma trận đường chéo ở bảng 3.

Bảng 3. Ma trận tối ưu toàn phần và chỉ tiêu theo dõi là lượng lysine sinh ra

N	(x ₁)	(x ₂)	(x ₃)	(x ₄)	lysine (g/l)
1	+	+	+	+	3,47
2	+	+	+	-	5,53
3	+	+	-	+	6,29
4	+	+	-	-	14,01
5	+	-	+	+	22,71
6	+	-	+	-	14,99
7	+	-	-	+	24,12
8	+	-	-	-	7,49
9	-	+	+	+	17,05
10	-	+	+	-	4,01
11	-	+	-	+	23,25
12	-	+	-	-	14,77
13	-	-	+	+	13,68
14	-	-	+	-	9,66
15	-	-	-	+	7,49
16	-	-	-	-	12,82

Thí nghiệm 7 dịch ngô (+), glucose (-), biotin (-), Urease (+) lượng lysine đạt là 24,12 g/l. Tất cả bốn yếu tố ở mức (+) cho lượng lysine là thấp nhất 3,47 g/l trong cùng điều kiện nuôi cấy. Ở mức (-), lượng lysine tích lũy trong canh trường ở mức trung bình 12,82 g/l. Dựa vào số liệu thống kê ta phân tích những yếu tố ảnh hưởng đến kết quả tối ưu so với kết quả ở tâm phương án theo tiêu chuẩn Student.

Bảng 4. Phân tích thí nghiệm ở tâm phương án

N ₀	y ₀ ^u	$\bar{y}^0$	y ⁰ - $\bar{y}^0$	(y ⁰ - $\bar{y}^0$) ²
1	12,05		0,217	0,047
2	11,51	11,84	-0,326	0,106
3	11,95		0,109	0,012

$$S_{th}^2 = \frac{\sum_{u=1}^3 (y^0 - \bar{y}^0)^2}{N_0 - 1} = 0,083 \quad S_{b_j} = \sqrt{\frac{S_{th}^2}{N}} = 0,072$$

Tra bảng Student: $t_p(f)$ với $p = 0,001$;
 $f = N_0 - 1 = 2$, $t_{0,001}(2) = 12,94$

Bảng 5. So sánh tính ý nghĩa của các hằng số hồi quy theo tiêu chuẩn Student

Các biến số hồi quy	Các hằng số hồi quy	Tính ý nghĩa	Kiểm định ý nghĩa
x ₀	12,58	175	+
x ₁	-0,258	-3,591	-
x ₂	-1,535	-21,35	+
x ₃	-1,196	-16,63	+
x ₄	2,174	30,24	+
x ₁₂	-3,465	-48,19	+
x ₁₃	0,543	7,559	-
x ₁₄	-0,353	-4,914	-
x ₂₃	-2,337	-32,5	+
x ₂₄	-0,707	-9,827	-
x ₃₄	0,666	9,26	-
x ₁₂₃	0,163	2,268	-
x ₁₂₄	-3,560	-49,51	+
x ₁₃₄	-1,073	-14,93	+
x ₂₃₄	0,611	8,504	-
x ₁₂₃₄	1,209	16,82	+

Ghi chú: +: hằng số có ý nghĩa, -: hằng số không ý nghĩa

Vậy hệ số có ý nghĩa là: $l = 9$

Phương trình hồi quy có dạng:

$$y = 12,58 - 1,535x_2 - 1,196x_3 + 2,174x_4$$

Phương trình hồi quy chỉ ra rằng khi tăng giá trị x₄ thì phải giảm giá trị x₂, x₃. Phân tích những giá trị ý nghĩa tương thích của mô hình với thực nghiệm theo tiêu chuẩn Fisher. Số liệu kiểm định sự tương thích với thực nghiệm được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Số liệu kiểm định sự tương thích với thực nghiệm

N	y _i	y' _i	y _i - y' _i	(y _i - y' _i) ²
01	3,467	2,797	0,67	0,449
02	5,533	5,297	0,236	0,056
03	6,293	9,591	-3,298	10,87
04	14,01	12,64	1,376	1,893
05	22,71	22,17	0,534	0,285
06	14,99	15,27	-0,28	0,078

07	24,12	24,46	-0,335	0,113
08	7,489	8,423	-0,934	0,872
09	17,05	16,58	0,479	0,23
10	4,011	5,379	-1,368	1,872
11	23,25	23,91	-0,663	0,44
12	14,77	12,17	2,599	6,753
13	13,68	12,69	0,998	0,996
14	9,663	10,9	-1,232	1,518
15	7,489	5,841	1,648	2,716
16	12,82	13,18	-0,362	0,131

$$S_u^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{N - l} = 4,182; F = \frac{S_u^2}{S_{th}^2} = 50,57$$

Tra bảng $F_{1-p}(f_1, f_2)$ với $p = 0,01$;

$$f_1 = N - l; f_2 = N_0 - 1; F_{1-0,01}(7,2) = 99,35$$

$F < F_{1-p}(f_1, f_2)$ do đó, phương trình tương thích với thực nghiệm. Kết quả làm nền tảng cho thí nghiệm tối ưu hóa thực nghiệm bằng phương pháp đường dốc nhất, bắt đầu từ mức trung tâm. Kết quả thí nghiệm dịch ngô 20%, glucose 8,35%, biotine 1,57mg/l, Urease 0,74% được bổ sung vào canh trường cho năng suất thu amino acid lysine là 26,01 g/l tăng gấp 5 lần so với chủng gốc ban đầu. Theo nghiên cứu của Ko, Chipley (1984), Kiefer và cộng sự (2004) [5,6] khi tăng nồng độ glucose và biotine vào canh trường lên men thì năng suất lysine được cải thiện. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sở dĩ hai hàm lượng này giảm là do chúng tôi sử dụng dịch chiết bắp bổ sung vào môi trường lên men. Do vậy, dịch chiết bắp là nguyên liệu phù hợp thay thế một phần glucose và biotine tinh khiết, làm giảm rất nhiều chi phí trong sản xuất nhưng năng suất vẫn đạt giá trị tối ưu. Theo Trần Thị Mai, Nguyễn Duy Lâm (2008) [10] cũng nghiên cứu trên chủng *C. glutamicum* dùng ri đường trên hệ thống lên men chìm sục khí ở nhiệt độ 30°C, pH ~ 7,0, dO₂ = 100% lên men 72h thu được sản lượng lysine và methionine là 28,1 g/l. Với những nghiên cứu đạt được tương ứng với các kết quả hiện nay đã công bố trong nước.

4. Kết luận

Điều kiện tối ưu của chủng *Corynebacterium glutamicum* VTCC-B-656 lên men theo mẻ thu nhận amino acid lysine là dịch ngô 20%, glucose 8,35%, biotine 1,57mg/l, Urease 0,74%, KH₂PO₄ 0,1%, MgSO₄ 0,025%, Thiamine 4mg/l, giống bổ sung 10%, pH 7,0, nhiệt độ nuôi cấy 28°C, lắc 200 rpm/ phút, thời gian lên men là 72 h lysine thu hồi đạt 26,01g/l tăng 5 lần so với điều kiện nuôi cấy ban đầu.

Tài liệu tham khảo

- [1] Eggeling, Sahm, The cell wall barrier of *C.glutamicum* và amino acid efflux *J.Biosci. Bioeng.* 92 (2001) 201.
- [2] Lothar Eggeling, Michael Bott, *Handbook of Corynebacterium glutamicum*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2005.
- [3] http://vedan.com.vn/en/pro_lysine.htm, 15/04/2009.
- [4] Trần Thị Thanh, *Công Nghệ Vi Sinh*, NXB Giáo Dục, Hà Nội, 2007.
- [5] Nguyễn Cảnh, *Quy hoạch thực nghiệm*, NXB Đại học Quốc gia, Hồ Chí Minh, 2004.
- [6] Lương Đức Phẩm, *Công nghệ vi sinh vật*, NXB Nông nghiệp, 1998.
- [7] T. Georgi, D. Rittmann, VF.Wendisch, Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase, *Metab Eng.* 7 (4) (2005) 291.
- [8] YT. Ko, JR.Chipley, Role of biotin in the production of lysine by *Brevibacterium lactofermentum*, *Applied And Environmental Microbiology*, 51 (4) (1986) 725.
- [9] Christoph Wittmann, Patrick Kiefer, Oskar, Metabolic Fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during Lysine Production with Sucrose as Carbon Source, *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2) (2004) 7277.
- [10] Trần Thị Mai, Nguyễn Duy Lâm, Hội thảo Ứng dụng và phát triển Công nghệ sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ sản xuất các sản phẩm nông nghiệp an toàn, *Báo cáo khoa học của Bộ khoa học và Công nghệ* 12/2008.

Optimization of fermenting process amino acid lysine by *Corynebacterium glutamicum* VTCC - B - 656

Tran Thi Minh Tam, 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 City, Vietnam

Optimization of fermenting process acid amin lysine by *C. glutamicum* VTCC-B-656 using Taguchi Methodology. The bacterium produced lysine at maximum rate after 72h with the medium (w/v): starch corn 20%, glucose 8.35%, Biotine 1.57 mg/l, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}$ 0.74%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, Thiamine 4mg/l in culture conditions incubation 37°C with of agitation speed 200rpm, medium pH 7.0 and 10% (v/v) starter culture. Under these conditions *C. glutamicum* VTCC-B-656 was found to produce acid amin lysine at a maximum rate of approximately 26.01 g/l be improved more 5 folds than before.

Keywords: lysine, *Corynebacterium* sp., *C. glutamicum*.