

## TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHO VI KHUẨN *Acetobacter xylinum* D<sub>9</sub>

Đinh Thị Kim Nhung\*, Nguyễn Thị Thùy Vân

Đại học Sư phạm Hà Nội 2, (\*)dtknhung@gmail.com

**TÓM TẮT:** *Acetobacter xylinum* là loại vi khuẩn gram âm có đặc tính sinh tổng hợp bacterial cellulose (BC). Nó được ứng dụng làm mạch máu nhân tạo cho vi phẫu thuật. Màng BC tạo ra từ vi khuẩn này còn được dùng làm da nhân tạo khá đẹp về mặt thẩm mỹ. Bởi vì hydrophilicity của nó được sử dụng làm vật liệu thay thế da tạm thời khi băng trên vết thương giúp cho việc lành vết thương nhanh chóng. Vải từ màng BC được dùng làm màn chắn loa, cho sản xuất micro chất lượng cao. Nó còn được dùng tạo ra than hoạt tính sợi vải cho hấp thu khí độc. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã kiểm tra một số các đặc tính sinh học của chủng *A. xylinum* D<sub>9</sub>; lựa chọn điều kiện thích hợp cho chúng ở nhiệt độ 30°C; thời gian 7 ngày; pH 5,0. Từ chủng *A. xylinum* D<sub>9</sub> thu được màng có đặc tính trong trắng, không mùi, có giá trị về mặt cảm quan. Màng BC này có bản chất cellulose có thể dùng làm màng trị bỏng.

*Từ khóa:* *Acetobacter xylinum*, bacterial cellulose, điều kiện, môi trường, vi khuẩn.

### MỞ ĐẦU

Vi khuẩn *Acetobacter* có khả năng tạo màng bacterial cellulose (BC) có giá trị cao có thể dùng làm sợi tơ nhân tạo, sản xuất micro chất lượng cao, da nhân tạo, bao bì polymer có bản chất sinh học... Đặc biệt từ sản phẩm của *A. xylinum* mang chất tái sinh mô, tẩm dầu mù u hoặc một số sản phẩm chiết suất từ thực vật có thể dùng để điều trị bỏng rất tốt. Màng BC tẩm dầu mù u còn có tác dụng ngăn không cho vi khuẩn gây nhiễm trùng và làm mau lành vết thương [4]. Trong công bố này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu một số đặc tính sinh học và khả năng phát triển, tạo chế phẩm màng BC từ chủng vi khuẩn *A. xylinum* D<sub>9</sub>; tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy cho chủng vi khuẩn này. Nghiên cứu này có ý nghĩa là cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về màng BC, mở ra nhiều hướng ứng dụng trong thực tế từ chủng vi khuẩn *A. xylinum*.

### PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Vật liệu

Chủng *A. xylinum* D<sub>9</sub> do phòng thí nghiệm Vi sinh, Khoa Sinh học, Đại học Sư phạm Hà Nội 2 cung cấp.

#### Phương pháp

Khảo sát một số đặc tính sinh học, kiểm tra khả năng phát triển của chủng *A. xylinum* D<sub>9</sub>: làm mẫu tế bào, nhuộm Gram, quan sát hình thái tế bào vi khuẩn; nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy tiêu chuẩn; nghiên cứu một số đặc tính sinh học của chủng *A. xylinum* D<sub>9</sub>.

Môi trường tiêu chuẩn gồm: 20 w/v glucose; 2,0 w/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,0 w/v KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,0 w/v MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; nước dừa: 1000 ml; pH 5,0; S/V = 0,38.

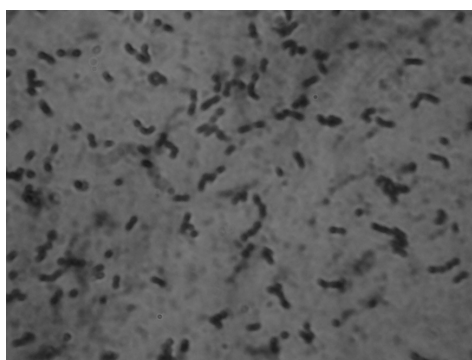
Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy cho vi khuẩn *A. xylinum* D<sub>9</sub> trên môi trường tiêu chuẩn bằng phương pháp Box-Willson.

Thu chế phẩm màng BC trên môi trường lên men bề mặt.

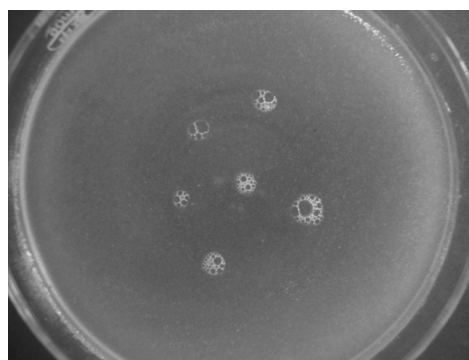
### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Khảo sát một số đặc tính sinh học, kiểm tra khả năng phát triển của chủng *A. xylinum* D<sub>9</sub>

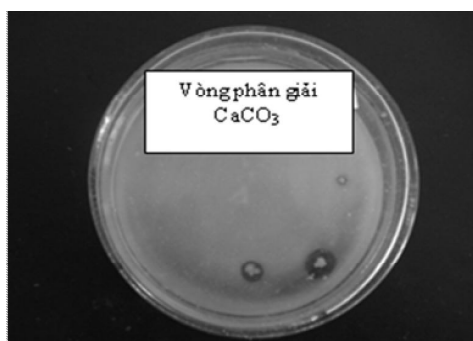
Để khảo sát một số đặc tính sinh học của chủng *A. xylinum* D<sub>9</sub>, chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng vi khuẩn nghiên cứu trên môi trường tiêu chuẩn; làm mẫu tiêu bản nhuộm Gram, quan sát trên kính hiển vi quang học có độ phóng đại 1000 lần; kiểm tra hoạt tính catalaza, khả năng oxy hóa acetat và nhuộm màng BC bằng KI. Kết quả thí nghiệm dẫn ra trên hình 1-4 và bảng 1.



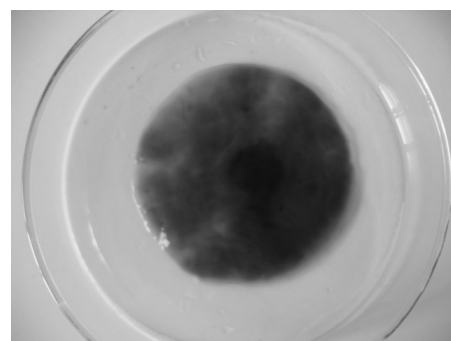
Hình 1. Kết quả nhuộm Gram



Hình 2. Hoạt tính catalase



Hình 3. Khả năng oxy hóa acetate



Hình 4. Kết quả nhuộm màng BC với KI

Bảng 1. Một số đặc tính sinh học của chủng *A. xylinum* D<sub>9</sub>

Đặc điểm sinh hóa của <i>A. xylinum</i>	Hiện tượng	Kết quả
Oxy hóa ethanol thành acid acetic	Acid acetic tạo ra sẽ kết hợp với CaCO <sub>3</sub> làm vòng sáng rộng hơn và tạo lớp cặn đục rõ	+
Catalase	Sủi bọt khí	+
Hoyer	Sinh khối không phát triển	-
Chuyển hóa glucose thành acid	Vòng sáng xung quanh khuẩn lạc	+
Chuyển hóa glycerol thành dihydroxyacetone	Vòng CuO xuất hiện xung quanh khuẩn lạc	+
Kiểm tra khả năng sinh sắc tố nâu	Không thấy sắc tố nâu	-
Kiểm tra tổng hợp cellulose	Vàng vì khuẩn xuất hiện màu lam	+
Nhuộm Gram	Bất màu hồng	Gram âm

Nghiên cứu trên hình 1-4 và bảng 1 nhận thấy, chủng vi khuẩn *A. xylinum* có dạng hình que, Gram âm, có hoạt tính catalaza, có khả năng oxy hóa acetat và là màng BC [3]. Từ kết quả nghiên cứu này, chúng tôi khẳng định, đây là chủng vi khuẩn *A. xylinum* nhưng cần có nghiên cứu tiếp về ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy tới sự phát triển của chủng nghiên cứu.

Chúng tôi lựa chọn phương pháp tìm điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng theo phương pháp Box-Willson.

**Tìm điều kiện nuôi cấy tối ưu cho vi khuẩn *A. xylinum* D<sub>9</sub> theo phương pháp Box-Willson**

Vi khuẩn được nuôi cấy theo phương pháp bề mặt với thành phần môi trường tiêu chuẩn. Với thành phần môi trường đã chọn như trên

chúng tôi tiến hành nghiên cứu tiếp điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng vi khuẩn này.

Thông thường điều kiện môi trường như các yếu tố nhiệt độ, thời gian nuôi và độ pH có mối quan hệ mật thiết và phụ thuộc lẫn nhau, chính

vì vậy, chúng tôi chọn ra một số yếu tố cần khảo sát gồm nhiệt độ, thời gian nuôi và độ pH. Khoảng xác định của các yếu tố như sau: nhiệt độ: ( $^{\circ}\text{C}$ )  $x_1$  [25 - 35]; thời gian nuôi: (ngày)  $x_2$  [4 - 10]; pH:  $x_3$  [3,5 - 6,5] (bảng 2).

Bảng 2. Khoảng xác định của ba yếu tố khảo sát

Mức thí nghiệm	$x_1$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$x_2$ (ngày)	$x_3$ (pH)
Mức gốc	30	7	5,0
Khoảng biến đổi	5	3	1,5
Mức trên	35	10	6,5
Mức dưới	25	4	3,5

Chỉ tiêu cần tối ưu khả năng tạo khối lượng màng của *Acetobacter xylinum* sp. D<sub>9</sub> biểu thị bằng  $y \rightarrow \max$ . Ma trận thực nghiệm được thiết lập theo phương pháp yếu tố đầy đủ với số thí nghiệm.  $N = 2^3 = 8$ , trong đó, 2 là số mức thí nghiệm của từng yếu tố, 3 là số yếu tố ảnh hưởng.

Quá trình thực nghiệm được tiến hành như

sau: trong quá trình khảo sát khả năng tạo màng xenlulôz của chủng nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy, màng thường bắt đầu hình thành từ ngày thứ ba, sau đó màng dày nhanh. Sau 7 ngày (168 h) thu hoạch và làm sạch cellulose trung hòa với NaOH 0,5M ở  $90^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 1 giờ và đem cân tính bằng gam (g). Ma trận thực nghiệm và kết quả được ghi trong bảng 3.

Bảng 3. Ma trận thực nghiệm và kết quả

STN	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$y_1$	$y_2$	$y_3$	$\bar{y}$	$S^2_j$
1	-	-	-	1,5	1,4	1,6	1,5	0,04
2	+	-	-	1,9	1,8	1,7	1,7	0,13
3	-	+	-	1,6	1,5	1,4	1,5	0,28
4	+	+	-	2,3	2,2	2,1	2,2	0,09
5	-	-	+	1,9	2,0	1,8	1,9	0,07
6	+	-	+	2,4	2,2	2,3	2,3	0,07
7	-	+	+	2,2	2,0	2,1	2,1	0,19
8	+	+	+	2,5	2,4	2,6	2,5	0,19
								$\Sigma S^2_j = 1,06$

Kiểm tra sự hội tụ của các số liệu theo tiêu chuẩn Cochran

Chuẩn Cochran theo tính toán:  $G_t \max / \Sigma S^2_j = 0,28 / 1,06 = 0,26$ .  $G_b$  tra bảng theo  $F_1 = n-1 = 3-1 = 2$ ;  $F_2 = N = 8$ . Chọn  $\alpha = 0,05$ ,  $G_b = 0,516$ . Như vậy,  $G_t = 0,26 < G_b = 0,516$ . Do đó, các số liệu thu được có cùng độ chính xác như nhau.

Tính các hệ số của phương trình hồi qui có dạng  $y = b_0 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_3x_3^2$ ; trong đó,  $b_0 = \Sigma (\bar{y})/N = 1,96$   $b_1 = \Sigma (x_1 \bar{y})/N = 2,43$   $b_2 = \Sigma (\bar{y})/N = 1,74$   $b_3 = \Sigma (\bar{y})/N = 2,1$ .

Kiểm tra sự có nghĩa của các phương trình hồi qui

Các hệ số có nghĩa khi  $|b_i| > S_{b.t}$ .

Tính  $S_b$ : phương sai phân phối cho từng thí nghiệm  $\Sigma S^2_j = \Sigma S^2_j / N = 1,06 / 8 = 0,132$ ; phương sai phân phối cho mỗi lần đo  $S^2_{\bar{y}} = S^2_j / K = 0,132 / 3 = 0,044$ ; phương sai phân phối cho mỗi hệ số của phương trình  $S^2_b = \Sigma S^2_{\bar{y}} / b = 0,044 / 4 = 0,011$ ;  $S_b = 0,10$ . Tra bảng chuẩn Student  $f = N(n-1) = 8(3-1) = 16$ ;  $N = 8$ , chọn  $\alpha = 0,05$ , ta có  $t = 2,13$ ,  $S_{b.t} = 0,10 \times 2,13 = 0,23$ .

Vậy tất cả các hệ số của phương trình đều có nghĩa.

Phương trình hồi qui có dạng:  $y = 1,96 + 2,43x_1^2 + 1,74x_2^2 + 2,16x_3^2$ .

**Kiểm tra sự thích ứng của mô hình**

Ứng với mỗi giá trị của  $x$ , ta nhận được 2 giá trị của  $y$ , giá trị thu được bằng thực nghiệm và giá trị thu được do tính toán. Nếu sai lệch giữa hai giá trị nằm dưới mức cho phép thì mô hình đã lập được xem là thích ứng. Mô hình thích ứng khi  $F_t < F_b$ . Chuẩn Fisher theo tính toán ở mức  $\alpha = 0,05$  ta có  $F_b = 3,5$ ;  $F_t = 3,15$ . Như vậy,  $F_t = 3,15 < F_b = 3,5$ . Mô hình thiết lập được là thích ứng.

Tiếp theo cần tối ưu hoá các điều kiện nuôi cấy theo Box-Willson. Đầu tiên chọn bước nhảy của các biến số: Từ phương trình hồi qui đã xây dựng thấy hệ số của  $x_1$  có ảnh hưởng nhiều tới quá trình, chúng tôi chọn cho biến số này một bước nhảy thích hợp, khả thi trong thực nghiệm,

$\Delta_1 = 1$ . Từ đây, ta tính được bước nhảy của các biến số còn lại,  $\Delta_2 = 1$ ,  $\Delta_3 = 0,5$ .

Xây dựng ma trận tương tự - Ma trận bắt đầu từ mức  $x_0$ . Ma trận thí nghiệm được ghi ở bảng 4.

Qua thí nghiệm chúng tôi nhận thấy, ở thí nghiệm 3, khối lượng màng đạt giá trị cực đại. Ở các mức thí nghiệm khác, khối lượng màng tạo thành đều giảm. Như vậy, điều kiện tối ưu để nhận được màng đạt giá trị cực đại ở nhiệt độ 30°C, thời gian 7 ngày, ở điều kiện pH 5,0. Điều này rất hợp lý, bởi vì nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn phát triển từ 28-35°C, pH 3,5-6,5, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Hong et al. (2011) [2] cho rằng, nhiệt độ thích hợp là 30°C và pH là 5,0.

**Bảng 4.** Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy theo Box-Willson

Số thí nghiệm	$x_1$ (°C)	$x_2$ (ngày)	$x_3$ (pH)	Khối lượng màng Y (g/l)
1	28	5	4,0	3,1
2	29	6	4,5	3,3
<b>3</b>	<b>30</b>	<b>7</b>	<b>5,0</b>	<b>3,5</b>
4	31	8	5,5	3,4
5	32	9	6,0	3,3

**Thu chế phẩm màng BC từ *A. xylinum* D<sub>9</sub>**

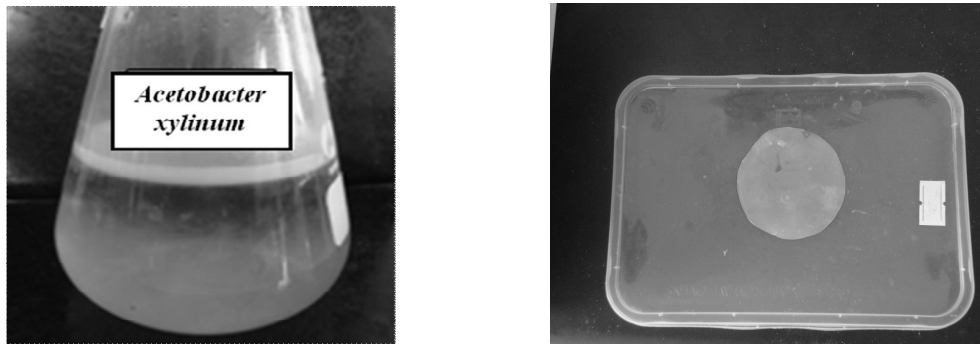
Kết quả sản phẩm lên men cho chủng vi khuẩn nghiên cứu sau 7 ngày, trong điều kiện nhiệt độ 30°C, pH 5,0 theo phương pháp nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ phòng sẽ thu được khối màng dày, kích thước tùy theo diện tích bề mặt bình nuôi, dễ dàng tách ra khỏi môi trường nuôi cấy. Màng bắt đầu hình thành từ ngày thứ ba và đạt giá trị cực đại ở ngày 7, đặc điểm của màng

BC dẻo dai và được xử lý, kết quả thu được dẫn ra ở bảng 5 và hình 5-6.

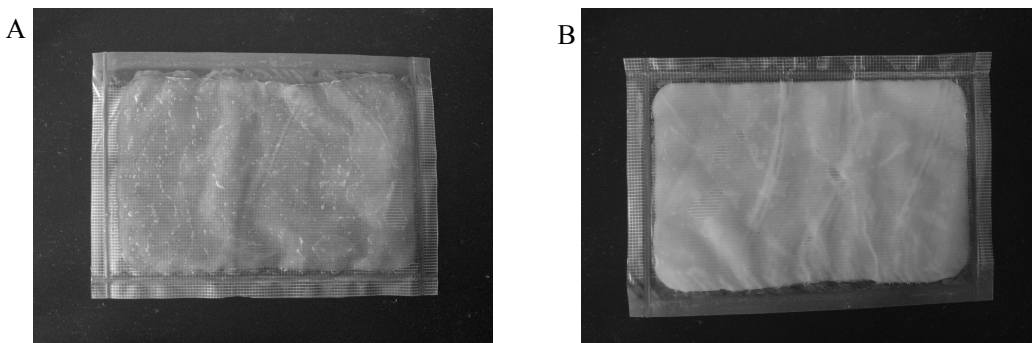
Qua kết quả nghiên cứu trên cho thấy, chủng vi khuẩn *A. xylinum* D<sub>9</sub> có khả năng tạo màng BC trên môi trường tiêu chuẩn bằng phương pháp lên men bề mặt, màng sau xử lý có đặc điểm trắng trong, không mùi, đạt giá trị cảm quan. Màng BC tẩm mật ong hoặc tẩm beclerinclohid có thể dùng đắp vết thương hở, điều trị bỏng.

**Bảng 5.** Kết quả xử lý màng BC

STT	Phương pháp xử lý	Màng BC thu được
1	Đun với NaOH 3% ở 100°C trong 30 phút	Vàng, mùi hơi khét
	Trung hòa bằng HCl 3%	Màng BC từ vàng chuyển sang màu trắng đục, không mùi
2	Ngâm với NaOH ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ, tiếp tục ngâm (lặp lại 2-3 lần)	Sau 2-3 lần xử lý, màng BC trở nên trắng trong, không mùi
	Trung hòa bằng HCl 3%	Trắng trong, không mùi, đạt về giá trị cảm quan



Hình 5. Khả năng tạo màng BC của *A. xylinum* D<sub>9</sub>



Hình 6. Mẫu màng BC sau xử lý tằm mật ong (A), becerinclorid (B)

## KẾT LUẬN

Đã khảo sát một số đặc tính sinh học của chủng vi khuẩn *A. xylinum* D<sub>9</sub>; tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy cho vi khuẩn *A. xylinum* D<sub>9</sub> theo phương pháp Box-Willson thu được kết quả với nhiệt độ thích hợp 30°C, thời gian thu màng 7 ngày, pH 5,0 là điều kiện thích hợp cho sự phát triển của chủng vi khuẩn *A. xylinum* D<sub>9</sub>. Có thể nuôi cấy thu sinh khối màng BC, xử lý thu màng có màu trắng trong, không mùi, đạt giá trị về mặt cảm quan.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brown R. M., Willison J. H., Richardson C. L., 1976. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process, Proceedings of the National Academy of Science, 73: 4565-4569.
2. Hong J. S., Moon S. H., Young G. K. and Sang J. L., 2011. Optimization of fermentation condition for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* A<sub>9</sub> in shaking cultures. Biotechnol Appl. Biochem., 33: 1-5.
3. Krystynowicz A., Turkiewicz M., Bielecki S., Klemenska E., Masny A., Plucienniczak A., 2005. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*, *Acta biochimica polonica*, 52: 691-698.
4. Huỳnh Thị Ngọc Lan, Nguyễn Văn Thanh, 2006. Nghiên cứu các đặc tính màng cellulose vi khuẩn từ *Acetobacter xylinum* sử dụng làm màng trị bỏng. Tạp chí Dược học, 361: 18-20.
5. Ougiya H., Watanabe K., Morinaga Y., Yoshinaga F., 1997. Emulsion-Stabilizing effect of bacterial cellulose. Biosci. Biotech. Biochem., 61(9): 1541-1545.

## CHOOSING THE BEST NUTRITION CONDITION FOR THE BACTERIA *Acetobacter xylinum* D<sub>9</sub>

Dinh Thi Kim Nhung, Nguyen Thi Thuy Van

Hanoi Pedagogical University No2

### SUMMARY

*Acetobacter xylinum* is a gram-negative bacterium, which characteristically synthesizes bacterial cellulose (BC). It is used as artificial blood vessels for microsurgery. The extremely fine filament is used to produce a new type of artificial leather with a mild touch. Thank to its hydrophilicity, it is used temporarily as a skin substitute and in wound healing bandages. It is also being used for producing activated carbon fibre sheets for absorption of toxic gas.

Our study aimed to examine some biological properties of strain *A. xylinum* D<sub>9</sub>; the optimum condition for this strain was determined at temperature 30°C; time 7 days; pH 5.0. Bacterial cellulose membrane obtained in white, odorless, valued in terms of sensory. It was also found that, the bacterial cellulose was a promising candidate for burn wound treatment.

*Keywords:* *Acetobacter xylinum*, bacterial cellulose, bacteria, condition, culture.

*Ngày nhận bài:* 15-6-2007