

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM TP. HỒ CHÍ MINH**

Nguyễn Thị Hồng Sương

**THỬ NGHIỆM TẠO CHẾ PHẨM
CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM
TRÊN CHẤT MANG
KAPPA –CARRAGEENAN
ĐỂ ỨNG DỤNG THU NHẬN L- LYSINE**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh - 2014

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM TP. HỒ CHÍ MINH**

Nguyễn Thị Hồng Sương

**THỬ NGHIỆM TẠO CHẾ PHẨM
CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM
TRÊN CHẤT MANG
KAPPA -CARRAGEENAN
ĐỂ ỨNG DỤNG THU NHẬN L- LYSINE**

**Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 60 42 01 14**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC
PGS.TS. Nguyễn Thúy Hương**

Thành phố Hồ Chí Minh - 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan luận văn này là công trình nghiên cứu của riêng tôi.

Kết quả trình bày trong luận văn là trung thực và chưa được các tác giả công bố trong bất kì công trình nào.

Các trích dẫn về bảng biểu, kết quả nghiên cứu của những tác giả khác; tài liệu tham khảo trong luận văn đều có nguồn gốc rõ ràng và theo đúng quy định.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 18 tháng 10 năm 2014

TÁC GIẢ LUẬN VĂN

Nguyễn Thị Hồng Sương

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn giáo viên hướng dẫn của tôi Cô PGS.TS. Nguyễn Thúy Hương - người đã tận tình giúp đỡ và hướng dẫn tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thiện luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các Giáo sư, Phó giáo sư, Tiến sĩ trong Hội đồng các cấp đã đọc và góp ý cho luận văn của tôi.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến NCS. Trần Thị Minh Tâm, Trường Đại học Bách khoa TP. HCM đã cho tôi nhiều ý kiến quý báu trong quá trình làm luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Quý thầy cô của Trường, Phòng Sau đại học, Khoa Sinh học, bộ môn công nghệ sinh học - Trường Đại học Sư phạm TP. HCM và Trường Đại học Bách khoa TP. Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi thực hiện luận văn này.

Qua đây, tôi cũng xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc đến gia đình, người thân và bạn bè đã giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn này.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 18 tháng 10 năm 2014

TÁC GIẢ LUẬN VĂN

Nguyễn Thị Hồng Sương

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

LỜI CẢM ƠN

MỤC LỤC

DANH MỤC BẢNG

DANH MỤC HÌNH

Trang

MỞ ĐẦU.....	1
I. Lí do chọn đề tài.....	1
II. Mục đích nghiên cứu.....	2
III. Đối tượng nghiên cứu.....	2
IV. Phạm vi nghiên cứu.....	2
V. Nhiệm vụ nghiên cứu.....	2
Chương 1.TỔNG QUAN.....	3
1.1. ACID AMIN L-LYSINE.....	3
1.1.1. Giới thiệu	3
1.1.2. Bản chất của quá trình sinh tổng hợp L- lysine	4
1.2. VI KHUẨN <i>C. GLUTAMICUM</i>	9
1.2.1. Nguồn gốc của chủng giống	9
1.2.2. Hệ thống phân loại.....	10
1.2.3. Đặc điểm của vi khuẩn <i>C. glutamicum</i>	10
1.3. LÊN MEN THU NHẬN L-LYSINE.....	11
1.3.1. Ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng.....	11
1.3.2. Ảnh hưởng của một số điều kiện ngoại cảnh.....	13
1.4. CỐ ĐỊNH TẾ BÀO CHỦNG GIỐNG <i>C. GLUTAMICUM</i>	14
1.4.1. Định nghĩa cố định tế bào vi sinh vật	14
1.4.2. Kỹ thuật cố định tế bào vi sinh vật	15

1.4.3.	Yêu cầu và phân loại chất mang	16
1.4.4.	Ưu điểm và nhược điểm của tế bào cố định	17
1.4.5.	Chất mang Carrageenan.....	19
1.5.	CÁC NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC VỀ HƯỚNG CỦA ĐỀ TÀI.....	21
Chương 2.	VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	26
2.1.	ĐỊA ĐIỂM - THỜI GIAN THỰC HIỆN	26
2.2.	VẬT LIỆU	26
2.2.1.	Môi trường sử dụng trong nghiên cứu	26
2.2.2.	Hóa chất - thiết bị.....	26
2.3.	NỘI DUNG THÍ NGHIỆM.....	27
2.3.1.	Sơ đồ nghiên cứu	28
2.3.2.	Bố trí thí nghiệm.....	29
2.4.	PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH.....	35
2.4.1.	Phương pháp vi sinh	35
2.4.2.	Phương pháp hóa sinh.....	37
2.4.3.	Phương pháp phân tích số liệu.....	38
Chương 3.	KẾT QUẢ -BÀN LUẬN.....	39
3.1.	KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA CHỦNG GIỐNG.....	39
3.1.1.	Đặc điểm đại thể, vi thể, sinh lý và sinh hóa	39
3.1.2.	Biến động sinh trưởng và khả năng trao đổi chất của chủng giống	41
3.2.	TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CỐ ĐỊNH CHỦNG GIỐNG TRÊN CHẤT MANG K-CARRAGEENAN.....	43
3.2.1.	Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình cố định	43
3.2.2.	Tối ưu hóa quá trình cố định chủng <i>C. glutamicum</i> trên chất mang k-carrageenan.....	46

3.3. ỨNG DỤNG CHỦNG <i>C. GLUTAMICUM</i> CỐ ĐỊNH TRÊN CHẤT MANG K-CARRAGEENAN ĐỂ LÊN MEN THU NHẬN L-LYSINE.....	52
3.3.1. Khả năng tái sử dụng <i>C. glutamicum</i> cố định trong lên men thu nhận L- lysine.....	52
3.3.2. Ảnh hưởng của các điều kiện bảo quản chế phẩm	57
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	66
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ.....	68
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	69
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các gen mã hóa các enzym tham gia vào tổng hợp L-lysine	7
Bảng 1.2. Các ứng dụng điển hình của các dạng carrageenan trong thực phẩm	20
Bảng 2.1. Các thiết bị sử dụng trong đề tài.....	27
Bảng 2.2. Bố trí các biến, giá trị theo các mức khảo sát.....	31
Bảng 2.3. Bố trí thí nghiệm theo ma trận Plackett – Burman	31
Bảng 2.4. Bố trí thí nghiệm khởi đầu và thí nghiệm trung tâm	32
Bảng 2.5. Bảng bố trí thí nghiệm CCD (central composite Design)	33
Bảng 2.6. Bảng bố trí thí nghiệm khảo sát các điều kiện bảo quản chế phẩm cố định	34
Bảng 3.1. Đặc điểm sinh học của chủng <i>C. glutamicum</i> VTCC - B - 0632.....	39
Bảng 3.2. Hiệu suất cố định trong thí nghiệm sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng.....	44
Bảng 3.3. Các mức của các biến trong thí nghiệm và sự ảnh hưởng của các biến lên hiệu suất cố định ($R-sq = 96,4\%$; $p < 0,05$ được chấp nhận).....	45
Bảng 3. 4. Hiệu suất cố định của thí nghiệm khởi đầu	46
Bảng 3.5. Các mức ảnh hưởng của hai yếu tố khảo sát	47
Bảng 3.6. Kết quả phân tích phương sai của hai yếu tố khảo sát.....	48
Bảng 3.7. Hiệu suất cố định chủng <i>C. glutamicum</i> trên chất mang k- carrageenan trong ma trận thực nghiệm RSM - CCD	48
Bảng 3.8. Thống kê lượng L-lysine, tỷ lệ tế bào bị rửa trôi, lượng đường sử dụng trong lên men thu nhận L-lysine bằng chế phẩm cố định và tế bào tự do.	52
Bảng 3.9. So sánh lượng L-lysine thu được từ lên men sử dụng tế bào cố định và sử dụng tế bào tự do.....	55
Bảng 3.10. Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm ở các dung môi khác nhau.....	57
Bảng 3.11. Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định ở các mức pH khác nhau.....	60
Bảng 3.12. Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm ở các mức nhiệt độ khác nhau	62
Bảng 3.13. Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định theo thời gian	64

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc không gian của Lysine	4
Hình 1.2. Cơ chế điều hòa sinh tổng hợp L-lysine	5
Hình 1.3. Sơ đồ ức chế ngược trong tổng hợp L-lysine ở <i>C. glutamicum</i>	6
Hình 1.4. Con đường sinh tổng hợp L-lysine ở <i>C. glutamicum</i>	8
Hình 1.5. Vi khuẩn <i>C. glutamicum</i>	11
Hình 1.6. Sơ đồ phân loại kỹ thuật cố định tế bào	14
Hình 1.7. Công thức cấu tạo của k-carrageenan	20
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát.....	28
Hình 2.2. Quá trình tạo chế phẩm cố định trên chất mang k-carrageenan.....	30
Hình 3.1. Hình dạng khuẩn lạc của chủng giống.....	40
Hình 3.2. Hình thái của chủng giống	41
Hình 3.3. Đồ thị biểu diễn sự biến động sinh trưởng, khả năng trao đổi chất của chủng giống <i>C. glutamicum</i> theo thời gian	41
Hình 3.4. Đồ thị đường mức về hiệu suất cố định CCD (%) với X_2 , X_5	51
Hình 3.5. Đồ thị biểu diễn lượng L-lysine thu nhận từ quá trình lên men bởi chế phẩm cố định qua các lần tái sử dụng so với đối chứng (tế bào tự do).....	55
Hình 3. 6. Đồ thị thể hiện tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định ở các dung môi khác nhau	59
Hình 3.7. Đồ thị thể hiện tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm ở các mức pH khác nhau	62
Hình 3.8. Đồ thị tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm ở các mức nhiệt độ khác nhau	64
Hình 3.9. Đồ thị tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm theo thời gian.....	65

MỞ ĐẦU

I. LÍ DO CHỌN ĐỀ TÀI

L-lysine là một trong những acid amin cần thiết mà con người, động vật không tự tổng hợp được phải nhận từ thức ăn. L-lysine có tác dụng duy trì hệ miễn dịch và tăng trưởng chiều cao, kích thích ăn ngon. L-lysine có nhiều ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm, dược phẩm [25]. Trong sản xuất, người ta sử dụng nhiều phương pháp để thu nhận L-lysine như thủy phân, hóa học, hóa học kết hợp sinh học và lên men. Lên men là phương pháp phổ biến vì khắc phục được nhược điểm của các phương pháp còn lại, giá thành thấp, hiệu suất cao, đặc biệt là kiểm soát được quy trình sản xuất và có thể được ứng dụng để sản xuất theo quy mô công nghiệp [5].

Những năm 1960, thế giới đã sử dụng vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) để lên men thu nhận L-lysine với quy mô công nghiệp. Ở Việt Nam quy trình sản xuất L-lysine chưa được hoàn thiện. Việc nghiên cứu sản xuất L-lysine trong điều kiện Việt Nam là để góp phần hoàn thiện quy trình lên men L-lysine với quy mô công nghiệp. Từ mục đích chung, việc ứng dụng công nghệ lên men sản xuất L-lysine không ngừng tăng. Các chủng vi sinh vật được dùng để sản xuất L-lysine: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Micrococcus glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* [17]. Do nhu cầu L-lysine ngày càng tăng 7-8% /năm [25]. Hiện nay người ta đã nghiên cứu nhiều giải pháp để cải thiện hiệu suất lên men thu nhận L-lysine. Một trong những giải pháp cải thiện hiệu suất lên men thu L-lysine là sử dụng kỹ thuật cố định vi sinh vật. Đây là kỹ thuật bao bọc hoặc định vị vi sinh vật trong một không gian nhất định nhưng vẫn đảm bảo được hoạt tính sinh học của vi sinh vật [14], tránh được các tác động của môi trường nuôi cấy. Đặc biệt là mật độ vi sinh vật cố định ít bị thay đổi trong suốt quá trình lên men, nhờ đó hiệu suất thu được tương đối cao, ổn định. Do được chất mang bao bên ngoài nên việc thẩm thấu cơ chất từ môi trường vào tế bào và các sản phẩm từ tế bào ra môi trường còn hạn chế. Chính vì vậy, chúng tôi cần phải lựa chọn chất mang cho phù hợp với đối tượng được cố định

[14, 22]. Qua nghiên cứu kappa - carrageenan (k-carrageenan) là chất mang có các tính chất cơ lý độ dai, độ đàn hồi phù hợp cho kỹ thuật cố định vi sinh vật. Đặc biệt ở k-carrageenan là có thể tạo gel ở điều kiện ôn hòa nên rất phù hợp để cố định vi sinh vật nói chung và vi khuẩn *C. glutamicum* [14]. Với những lí do trên, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Thử nghiệm tạo chế phẩm *Corynebacterium glutamicum* trên chất mang kappa - carrageenan để ứng dụng thu nhận L-lysine”**.

II. MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU

Tạo chế phẩm *C. glutamicum* trên chất mang k-carrageenan.

Ứng dụng chế phẩm cố định để lên men thu nhận L-lysine.

III. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Chủng vi khuẩn *C. glutamicum* VTCC - B - 0632 (Vietnam Type Culture Collection - B - 0632) từ trung tâm lưu trữ giống vi sinh vật chuẩn - Đại học Quốc gia Hà Nội.

IV. PHẠM VI NGHIÊN CỨU

Thử nghiệm tạo chế phẩm *C. glutamicum* trên chất mang k - carrageenan, ứng dụng thu nhận L-lysine ở quy mô phòng thí nghiệm

V. NHIỆM VỤ NGHIÊN CỨU

Xác định các thông số tối ưu quy trình cố định *C. glutamicum* trên chất mang k-carrageenan bằng phương pháp tối ưu hóa quy hoạch thực nghiệm.

Khảo sát khả năng tái sử dụng chế phẩm *C. glutamicum* cố định.

Khảo sát một số điều kiện bảo quản chế phẩm.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. ACID AMIN L-LYSINE

1.1.1. Giới thiệu

L-lysine là một trong những acid amin cần cho nhu cầu dinh dưỡng của động vật và con người. L-lysine có trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi. Trong nhiều trường hợp cần bổ sung L-lysine vào thức ăn của vật nuôi. Tầm quan trọng cao của L-lysine về dinh dưỡng đã kích thích rất nhiều nghiên cứu tập trung vào con đường sinh tổng hợp L-lysine và vi sinh vật có khả năng sản xuất nhiều acid amin này [42].

Có nhiều chủng vi sinh vật có khả năng sản xuất L-lysine, trong số các chủng đó *C. glutamicum* là chủng được quan tâm nhiều hơn trong việc sản xuất L-lysine, vì *C. glutamicum* tương đối dễ nuôi cấy, thích nghi với điều kiện sản xuất quy mô lớn.

L-lysine là sản phẩm được *C. glutamicum* tổng hợp, bài tiết ra ngoài với mức độ cao do trong cơ thể vi khuẩn này không có enzym phân hủy L-lysine, có giai đoạn cân bằng sinh khối và thời gian thu nhận sản phẩm bậc hai dài [34].

Lịch sử xuất hiện Lysine bắt đầu từ Drechsel (1889), tác giả đã xác định có sự hiện diện của một hợp chất mới trong quá trình thủy phân casein và tác giả đặt tên cho hợp chất này là lysatin vào năm 1890. Năm 1891, dựa vào nhiều nghiên cứu sau đó tác giả lại đặt tên cho hợp chất đó là Lysine và công thức của Lysine được Ellinger đưa ra vào năm 1899:



Lysine chứa hai nhóm chức một nhóm là $(-\text{NH}_2)$, một nhóm là $(-\text{COOH})$, có hai dạng đồng phân L và D, nhưng đồng phân dạng L - lysine là dạng mà con người, động vật dễ hấp thu nhất và có ứng dụng trong nhiều lĩnh vực [5, 39].

Tên quốc tế : 2,6-diaminohexanoic acid

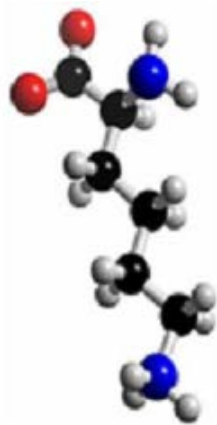
Công thức phân tử: $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$.

Khối lượng phân tử gam: 146,19 g/mol

Tên thông thường: Lysin

Chữ viết tắt: K hay Lys

Codon của Lysine là AAA và AAG



Hình 1.1. Cấu trúc không gian của Lysine [43]

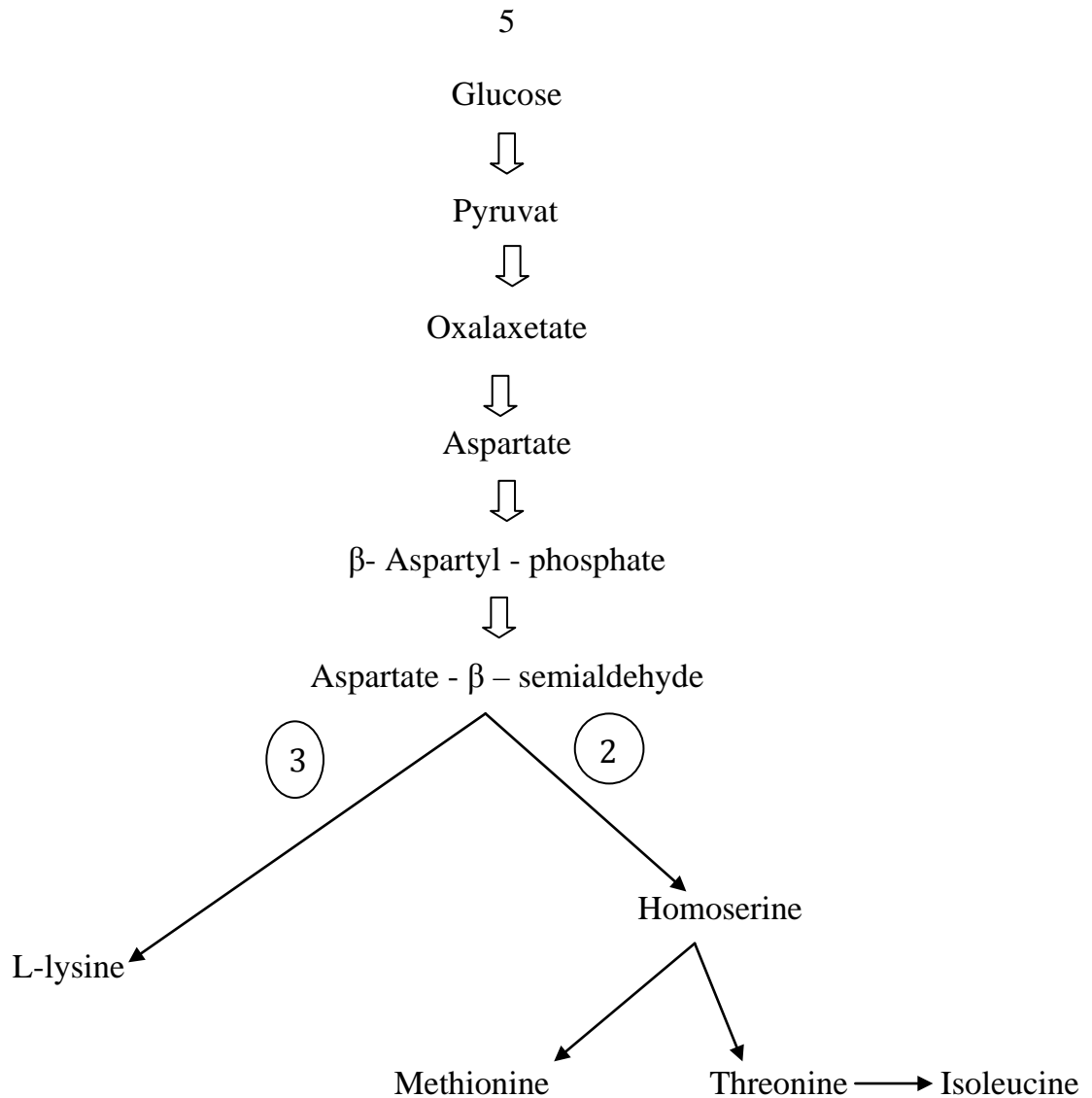
1.1.2. Bản chất của quá trình sinh tổng hợp L-lysine

Cơ chế điều hòa sinh tổng hợp L-lysine ở vi khuẩn *C. glutamicum* diễn ra hai giai đoạn qua sơ đồ hình 1.2.

Giai đoạn 1: Glucose tổng hợp nên oxaloacetate (do oxaloacetate là tiền chất để tổng hợp aspartate). Để cho quá trình sinh tổng hợp diễn ra cần phải cung cấp nguồn nguyên liệu giàu carbon như glucose, thông qua chu trình đường phân, glucose sẽ được chuyển hóa thành pyruvate, một phần của pyruvate sẽ tham gia vào chu trình Krebs để tạo ra năng lượng cung cấp cho hoạt động sống của tế bào, phần còn lại sẽ chuyển hóa thành oxaloacetate chất này tổng hợp aspartate.

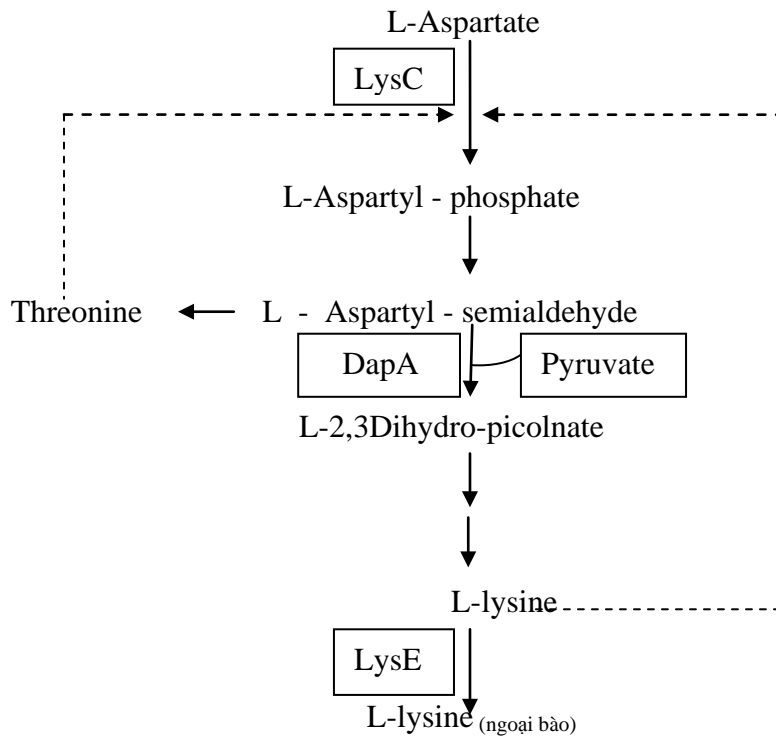
Giai đoạn 2: Tổng hợp L-lysine từ aspartate

Aspartate - β - semialdehyde được tổng hợp từ aspartate thông qua sản phẩm trung gian β - aspartyl phosphate. Aspartate - β - semialdehyde là tiền chất chung để tổng hợp L-lysine và homoserine (hình 1.2). Hoạt động của enzym homoserine dehydrogenase sẽ chuyển hóa homoserine thành methionine, threonine và isoleucine cần cho sự sinh trưởng của vi khuẩn.



Hình 1.2. Cơ chế điều hòa sinh tổng hợp L-lysine [5]

Khi threonine tạo ra dư, chất này sẽ kết hợp với L-lysine vừa được tổng hợp để ức chế hoạt động của enzym aspartate kinase, làm cho cấu trúc tâm hoạt động của enzym aspartate kinase bị thay đổi, nên enzym này không gắn được với aspartate để xúc tác quá trình phản ứng. Do đó không chuyển hóa được aspartate thành aspartate - β - semialdehyde để giảm hoặc không tổng hợp ra L-lysine cùng methionine, threonine và isoleucine. Khi lượng threonine hết thì enzym aspartate kinase hoạt động bình thường và quá trình lại tiếp tục diễn ra theo 2 giai đoạn đã nêu.



Hình 1.3. Sơ đồ ức chế ngược trong tổng hợp L-lysine ở *C. glutamicum* [42]

Vấn đề đặt ra là nếu muốn tạo ra nhiều L-lysine phải điều chỉnh làm sao cho L-aspartate - β - semialdehyde không chuyển hóa thành homoserine. Muốn vậy ta phải làm bất hoạt enzym homoserine dehydrogenase để enzym này không có khả năng chuyển hóa L-aspartate - β - semialdehyde thành homoserine. Đến đây thì con đường sinh tổng hợp L-lysine chỉ diễn ra một nhánh, khởi đầu từ aspartate nhờ enzym aspartate kinase một enzym quan trọng của quá trình biến đổi. Vậy làm thế nào để lượng L-lysine do vi khuẩn tiết ra nhiều hơn?. Nhiều tác giả đã nghiên cứu và tác động vào hệ gen của vi khuẩn để gây biến đổi gen như tác động vào gen *LysC*, đây là gen tổng hợp nên enzym aspartate kinase và đã tăng được hoạt tính hoạt động của enzym aspartate kinase và các gen khác. Để tổng hợp thành L-lysine phải có sự tham gia của rất nhiều gen, những gen này tổng hợp nên các enzym tương ứng, các enzym tạo ra sẽ có tác dụng xúc tác cho quá trình chuyển hóa để tổng hợp L-lysine thể hiện ở bảng 1.1

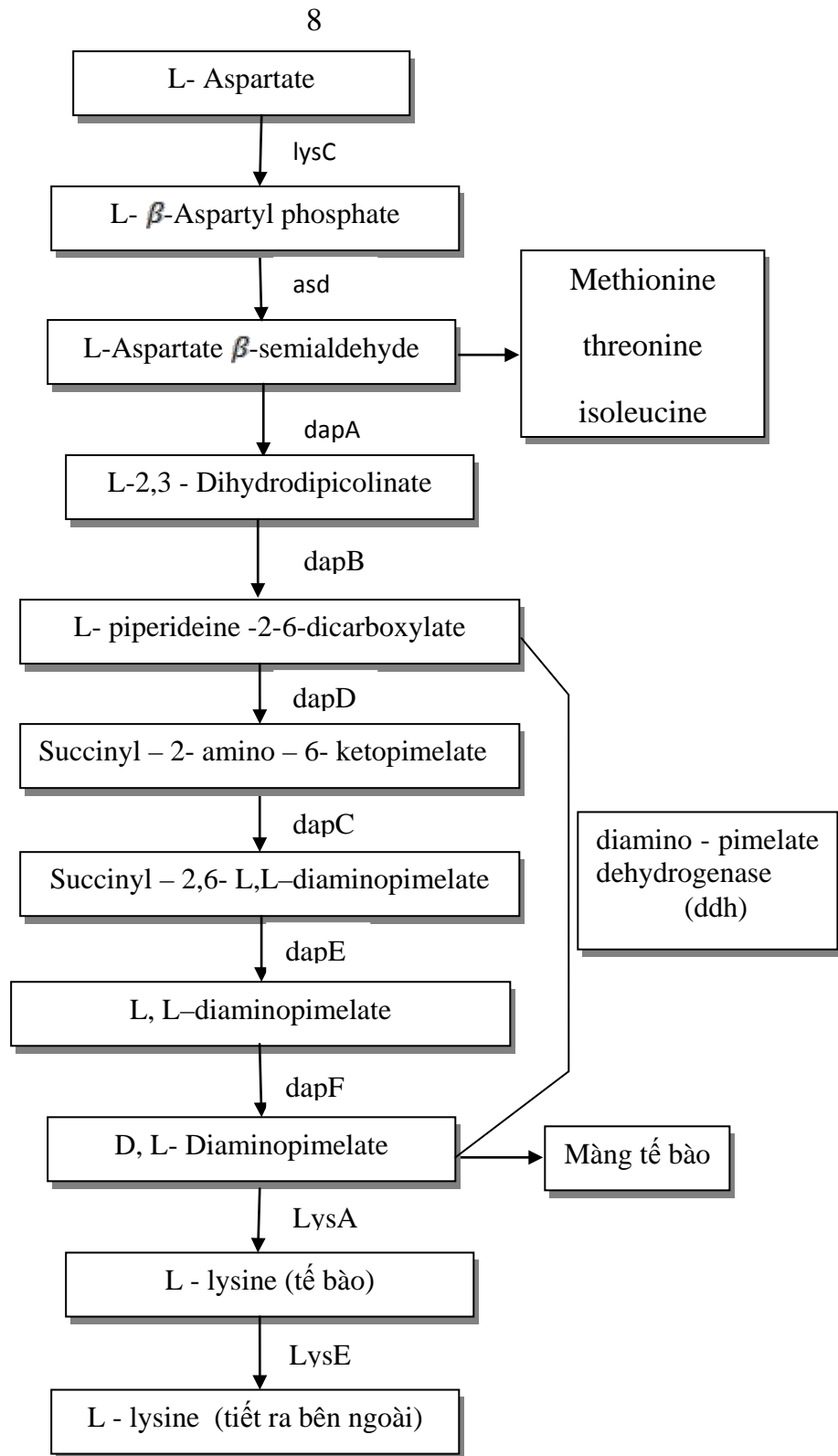
Bảng 1.1. Các gen mã hóa các enzym tham gia vào tổng hợp L-lysine

STT	Gen	Tên enzym được mã hóa
1	lysC	Aspartate kinase
2	asd	Aspartate semialdehyde dehydrogenase
3	dapA	Dihydrodi - picolinate synthase
4	dapB	Dihydrodi - picolinate reductase
5	dapD	Tetrahydrodi - picolinate succinylase
6	dapC	Succinyl - amino ketopimelate transaminase
7	dapE	Succinyl - amino pimelate succinylase
8	dapF	Diaminopimelate epimerase
9	lysA	Diaminopimelate decarboxylase
10	ddh	Diamino - pimelate dehydrogenase
11	lysE	Permease

Chú thích: STT: số thứ tự

[17]

Qua sơ đồ hình 1.4, từ L - Aspartate trải qua quá trình biến đổi dưới tác dụng của các enzym được tạo ra từ các gen LysC, asd, L - Aspartate tạo thành L - Aspartate - β -semialdehyde. Để tạo ra được nhiều L-lysine, giải pháp đặt ra cần bất hoạt enzym homoserine dehydrogenase để enzym này không có khả năng chuyển hóa L- aspartate - β - semialdehyde thành homoserine cùng threonine, isoleucine. Khi đó con đường sinh tổng hợp L-lysine ở *C. glutamicum* bắt đầu từ aspartate diễn ra theo một con đường để tạo L-lysine, với sự tham gia hoạt động của nhiều enzym được mã hóa lần lượt bởi các gen ở (bảng 1.1) và trải qua nhiều phản ứng trung gian. Cuối cùng L-lysine được xuất ra ngoài tế bào nhờ enzym permease (lysE).



Hình 1.4. Con đường sinh tổng hợp L-lysine ở *C. glutamicum* [17]

Quan sát hình 1.4, để quá trình tổng hợp L-lysine diễn ra nhanh ta sẽ tác động vào enzym diamino - pimelate dehydrogenase (ddh), để enzym (ddh) có thể sẽ chuyển L-piperideine -2,6 - dicarboxylate thành D, L - diaminopimelate và với sự tác động của enzym diaminopimelate decarboxylase (lysA), cùng với enzym permease (lysE) thì L-lysine được tiết ra ngoài [17].

Xuất phát từ cơ chế điều hòa sinh tổng hợp L-lysine ta thấy có các hướng sau để cải thiện sản lượng L-lysine:

Cải tạo giống *C. glutamicum* sao cho enzym aspartate kinase không còn bị ức chế bởi hỗn hợp L-lysine và threonine khi được tạo ra. Năm 1990, Jetten và cs., đã tạo ra đột biến kháng AEC (amino-ethyl-cysteine) của gen lysC. Các nghiên cứu cho thấy locus lysC mã hóa aspartate kinase là gồm hai gene chồng chéo lên nhau, lysC α và lysC β với lysC β có vai trò giúp cho enzym aspartate kinase kháng ức chế ngược [25].

Làm bất hoạt enzym homoserine dehydrogenase để enzym không còn khả năng chuyển hóa aspartate - β - semialdehyde thành homoserine bằng cách tác động vào gen này để tạo ra những chủng giống đột biến mất gen này hoặc có nhưng bị bất hoạt.

Tăng biểu hiện của gen dapA mã hóa enzym dihydrodipicolinate synthase có thể làm tăng khả năng sản xuất L-lysine. Kết quả này giống như việc nâng cao biểu hiện enzym aspartate kinase. Qua nghiên cứu, các tác giả thấy rằng mức độ biểu hiện của gen dapA làm giảm hoạt tính của enzym homoserine dehydrogenase [25].

1.2. VI KHUẨN *C. GLUTAMICUM*

1.2.1. Nguồn gốc của chủng giống

Năm 1950, Kinoshita và cs., đã phát hiện *C. glutamicum* có khả năng sản xuất acid amin L-glutamic. Trong nửa đầu thế kỉ 20, bột ngọt được sản xuất bằng chiết xuất từ lúa mì, đậu tương và các nguồn protein thực vật khác sau đó thủy phân bằng acid HCl đậm đặc. Một thời gian ngắn sau sự phát hiện của Kinoshita vào năm 1957, Kyowa - Hakko bắt đầu lên men sản xuất bột ngọt ứng dụng *Micrococcus glutamicus* (sau đó đổi tên *Corynebacterium glutamicum*) (Kumagai, 2000). Từ đó các quy trình

công nghệ sinh học với loài vi khuẩn *Corynebacterium* được phát triển trong sản xuất acid L-glutamic và L-lysine [37].

1.2.2. Hệ thống phân loại

Theo khóa phân loại Stackebrandt E và cs., (1997) [17], *C. glutamicum* thuộc:

Giới: *Bacteria*

Lớp: *Actinobacteria*

Phân lớp: *Actinobacteridae*

Bộ: *Actinomycetales*

Phân bộ: *Corynebacterineae*

Họ: *Corynebacteriaceae*

Giống: *Corynebacterium*

Loài: *Corynebacterium glutamicum*

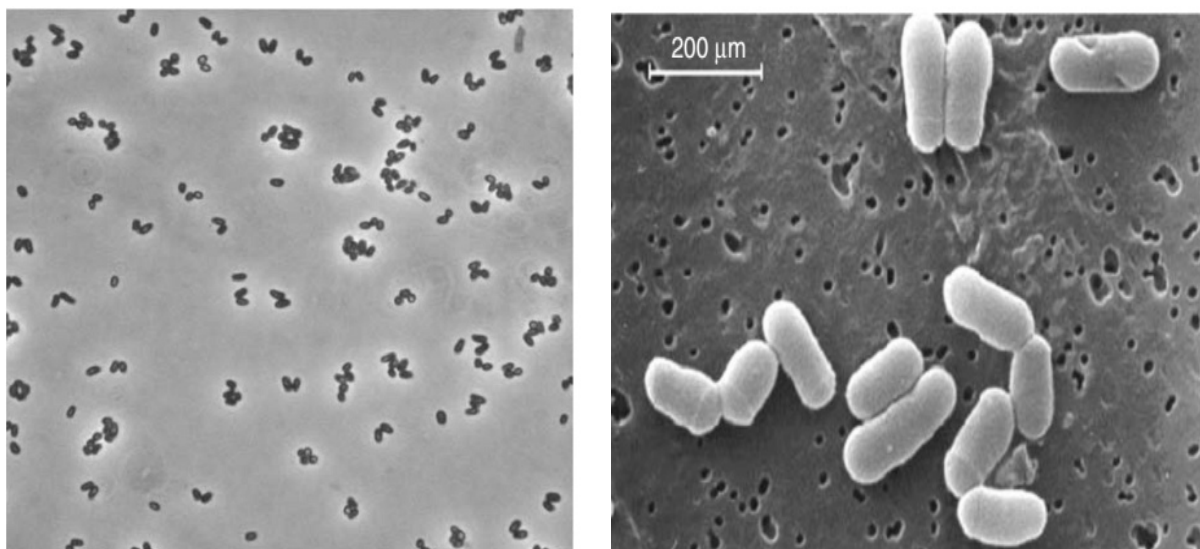
1.2.3. Đặc điểm của vi khuẩn *C. glutamicum*

Trong tự nhiên chủng *C. glutamicum* được tìm thấy ở đất, chất thải, phân bón. Hầu hết các chủng có khuẩn lạc màu vàng nhạt đến vàng, một vài có màu trắng kem [17].

Collins và Cummins (1986), đã mô tả vi khuẩn *C. glutamicum* với các đặc điểm như sau: Gram dương, không bào tử, không di động, có dạng hình que và kích thước $(0,8 - 1,2) \times (1,5 - 8) \mu m$, hoặc hình chữ V do hai tế bào xếp lại với nhau và kỵ khí không bắt buộc đến hiếu khí, có enzym catalase, vách tế bào có chứa acid mycolic và arabino – galactan chứa 26 – 36 C [17].

Điều kiện sinh trưởng của chủng *C. glutamicum* chịu được nhiệt độ trong khoảng $20^{\circ}C - 40^{\circ}C$, sinh trưởng tốt ở nhiệt độ $30^{\circ}C$, sống được ở môi trường có pH dao động khoảng 6,8 - 8,0, sinh trưởng tốt ở pH có giá trị từ 7,0 - 7,2 [17].

Trong quá trình tăng trưởng, vi khuẩn phải được cung cấp nguồn dưỡng chất như carbon, nitơ, các khoáng, vitamin biotine (vitamin H). Vi khuẩn *C. glutamicum* có thể sử dụng nhiều loại carbohydrat như glucose, fructose, sucrose, maltose,...[17].



Hình 1.5. Vi khuẩn *C. glutamicum* [17]

Trình tự gen của vi khuẩn *C. glutamicum* được xác lập bởi Kyowa Hakko - Kitasato, những nghiên cứu này của tác giả đã xác định vi khuẩn *C. glutamicum* có khoảng 3.099 gen được coi là mã hóa protein. Phân tử ADN của chủng vi khuẩn có dạng vòng, tỷ lệ GC là 53%, có 3.138 gen khác nhau [17].

1.3. LÊN MEN THU NHẬN L-LYSINE

1.3.1. Ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng

1.3.1.1. Ảnh hưởng của nguồn hydratcarbon

Trong nhiều loại carbohydrat, đường glucose là cơ chất được chủng này sử dụng hiệu quả nhất. Năm 2005, Georgi và cs., khẳng định trên cơ chất glucose khả năng phân giải của vi khuẩn là cao nhất và hiệu suất thu nhận L-lysine cao hơn các cơ chất khác [35]. Trần Thị Minh Tâm (2009), cũng đã khảo sát vi khuẩn *C. glutamicum* trên nhiều nguồn carbon khác nhau và cũng khẳng định cơ chất glucose cho hiệu suất cao hơn các cơ chất khác. Ở nồng độ glucose 10%, năng suất L-lysine được cải thiện tốt

lên đến 21,5g/L sau 72h lên men ở điều kiện nuôi cấy tối ưu (lắc vòng 200 vòng/ phút, pH =7,0, tỷ lệ giống bổ sung 3% (2.10^8 tế bào /mL), nhiệt độ lên men 30°C) [8, 32, 41].

Nồng độ đường trong môi trường lên men khoảng 10% (w/v) là thích hợp nhất việc nâng cao nồng độ đường trong lúc nuôi cấy có thể không nâng cao được hiệu suất lên men thu nhận sản phẩm vì nồng độ đường cao vi sinh vật không phát triển được qua nghiên cứu của tác giả Trần Thị Minh Tâm khi nồng độ đường quá cao (13%) (w/v) gây ức chế sự sinh L-lysine [32, 41].

1.3.1.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Vi khuẩn *C. glutamicum* sử dụng peptone, cao nấm men làm nguồn nitơ chính. Nguồn cung cấp nitơ thường dùng là các loại muối chứa NH_4^+ như: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4OH hoặc Ure [8]. Các muối amon, amoniac thay thế các nguyên liệu đắt tiền để sử dụng ở quy mô công nghiệp. Trong thí nghiệm này $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là nguồn cung cấp nitơ chủ yếu khi tiến hành lên men.

1.3.1.3. Ảnh hưởng của chất khoáng và vitamine

Chất khoáng: các muối khoáng sau được chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu là KH_2PO_4 để cung cấp nguồn phosphat.

Thêm vào đó là $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , lần lượt là nguồn cung cấp khoáng Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, cho chủng sinh trưởng, phát triển bình thường đúng với đặc điểm của vi khuẩn [8].

CaCO_3 : Trong quá trình lên men, sự tích lũy của các sản phẩm trao đổi chất như CO_2 , acid lactic, acid gluconic làm pH môi trường giảm dần kết quả là vi khuẩn sẽ ngừng phát triển, đồng thời làm giảm hiệu suất lên men. Khi pH giảm đột ngột, lượng L-lysine giảm. Năm 2002, Haleem Shah Abdul và cs., đã xác định CaCO_3 vừa có thể ổn định pH khi được bổ sung vào thời điểm bắt đầu lên men, vừa góp phần vào giảm thời gian lên men.

Biotine (vitamin H): Năm 1984, Young và Chipley đã nghiên cứu vai trò của biotine trong quá trình sinh tổng hợp L-lysine, kết quả nghiên cứu biotine giúp tế bào hấp thụ nhiều glucose hơn do biotine gây ra một vài thay đổi về thành phần cấu tạo trên màng tế bào giúp tế bào tăng hấp thụ glucose. Năm 2004, Kiefer và cs., cho rằng khi tăng nồng độ glucose và biotine vào môi trường lên men, năng suất L-lysine được cải thiện [29]. Lượng biotine thêm vào môi trường lên men $20\mu\text{g/L}$. Trong công nghệ lên men, có thể dùng rỉ đường mía để thay thế cho biotine vì đây là nguyên liệu rẻ tiền, chứa lượng đường cao, nhiều chất hữu cơ, vô cơ, các vitamine, các chất kích thích sinh trưởng trong đó có vitamine H (biotine) nhằm giảm chi phí trong quá trình sản xuất nhưng vẫn đảm bảo năng suất đạt tối ưu.

Thiamine: là một vitamine cần bổ sung vào khi lên men để vi khuẩn phát triển bình thường tạo ra L-lysine [8]. Lượng thiamine cần bổ sung $150\mu\text{g/L}$ khi lên men.

1.3.2. Ảnh hưởng của một số điều kiện ngoại cảnh

Lượng oxy hòa tan: *C. glutamicum* sinh trưởng ở điều kiện hiếu khí, nếu lượng oxy quá lớn sẽ ức chế sự sinh trưởng và sản sinh L-lysine. Nếu thiếu thì ảnh hưởng lớn đến quá trình trao đổi chất. Trong các pha sinh trưởng của vi khuẩn chú ý cung cấp đủ oxy trong pha log do tế bào tăng sinh mạnh. Những nghiên cứu trước đây trong erlen ở điều kiện 200 vòng/phút cho thấy mật độ tế bào và lượng L-lysine đạt giá trị cao hơn so với các tốc độ lắc khác [8, 32, 41].

pH: Hoạt động của enzym, màng tế bào vi khuẩn sẽ giảm hoạt tính dẫn đến hiệu quả trao đổi chất thấp, sản phẩm thu được không đạt tối đa khi trong môi trường nuôi cấy có nhiều ion H^+ . Nghiên cứu về pH, Trần Thị Minh Tâm (2009) cũng đã khảo sát ở pH=7,0 lượng L-lysine tạo ra cao nhất (8,68g/L), pH= 7,5 - 8,0 lượng L-lysine sinh ra thấp hơn mức pH=7,0 (6,73 – 6,84 g/L) và cao hơn mức pH=6,5 (6,3g/L) [13].

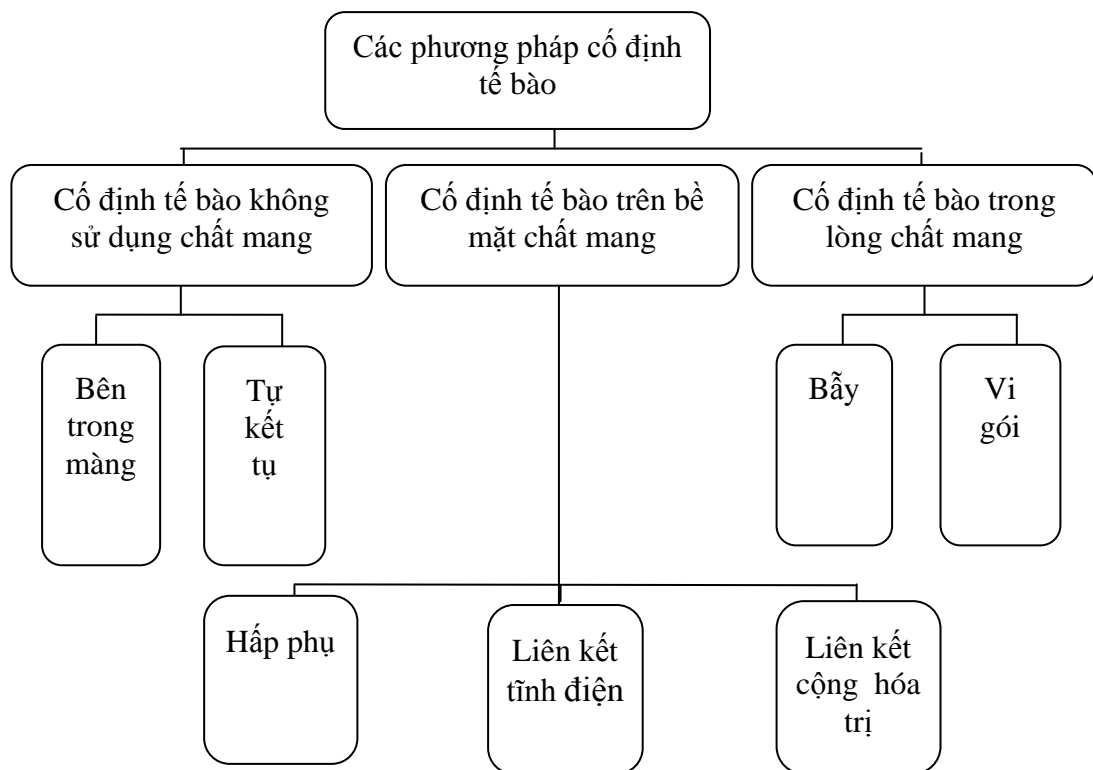
Nhiệt độ nuôi cấy: tác động lên khả năng chuyển hóa các chất, hoạt động của enzym và khả năng trao đổi chất của vi khuẩn. Theo kết quả nghiên cứu của tác giả Minh Tâm (2009), cho thấy ở giới hạn nhiệt độ $20 - 25^{\circ}\text{C}$ lượng L-lysine sinh ra cao

hơn khi chủng sống trong khoảng nhiệt độ 35 - 40⁰C. Nhiệt độ 30⁰C chủng sinh trưởng tốt nhất lượng L-lysine tạo ra nhiều nhất 15,5g/L so với các mức nhiệt độ khảo sát [13]. Nguyễn Thùy Châu và cs., (2007), cũng đã khảo sát và cho biết ở nhiệt độ 30⁰C, L-lysine thu được cao nhất [1].

1.4. CỐ ĐỊNH TẾ BÀO CHỦNG GIỐNG *C. GLUTAMICUM*

1.4.1. Định nghĩa cố định tế bào vi sinh vật

Có nhiều cách để phân loại kỹ thuật cố định tế bào, dựa vào cách phân loại của Gordon (1997), kỹ thuật cố định tế bào được phân ra các loại sau:



Hình 1.6. Sơ đồ phân loại kỹ thuật cố định tế bào [22, 36]

Năm 1985, Karel và cs., định nghĩa cố định tế bào là sự giới hạn về vật lý hoặc định vị của các tế bào nguyên vẹn ở một khu vực không gian nhất định nhưng vẫn giữ được hoạt tính xúc tác của chúng và có thể sử dụng nhiều lần [22].

1.4.2. Kỹ thuật cố định tế bào vi sinh vật

1.4.2.1. Cố định tế bào trên bề mặt chất mang

Đây là phương pháp cố định dựa vào tương tác bề mặt giữa tế bào và chất mang nhờ các lực liên kết như lực liên kết tĩnh điện, liên kết cộng hóa trị, tương tác kỵ nước. Các lực này rất yếu nhưng khi các liên kết được hình thành với số lượng lớn là cơ sở để gắn kết vi sinh vật vào chất mang.

Ưu điểm: đơn giản, dễ thực hiện, chi phí thấp, tế bào cố định sẽ phục hồi trở lại tế bào tự do và tế bào ít hoặc không bị ảnh hưởng bởi kỹ thuật cố định.

Nhược điểm: tế bào dễ bị tách khỏi chất mang, làm tăng hàm lượng tế bào tự do trong môi trường lên men. Do đó, kỹ thuật này làm hạn chế số lần tái sử dụng so với các kỹ thuật cố định khác.

Các loại chất mang sử dụng cho kỹ thuật này là: cellulose, gỗ, mùn cưa [20, 22]

1.4.2.2. Cố định tế bào trong khung mạng xốp

Kỹ thuật cố định tế bào trong khung mạng xốp là kỹ thuật cố định mà tế bào được đưa vào trong mạng xốp (tạo gel) để giảm sự khuếch tán của tế bào khi ra vào môi trường xung quanh, nhưng vẫn cho phép sự trao đổi các chất dinh dưỡng cùng các chất chuyển hóa giữa môi trường lên men và tế bào cố định.

Bấy trong cấu trúc sợi và vi gói là hai phương pháp cụ thể của kỹ thuật này. Hai phương pháp này có đặc điểm như sau:

Bấy là phương pháp mà đối tượng cố định được bấy trong màng hoặc bên trong cấu trúc sợi nên đối tượng được giữ chặt và hạn chế được sự di chuyển tự do trong màng hoặc trong cấu trúc sợi.

Ưu điểm: đối tượng được cố định có thể sẽ tránh khỏi các tác động từ điều kiện bên ngoài.

Nhược điểm: do đối tượng được giữ chặt trong chất mang nên khi cố định có thể làm cho đối tượng bị bất hoạt, dẫn đến khả năng chuyển hóa cơ chất chậm và chi phí cố định cao.

Các chất mang thích hợp thường được dùng cho phương pháp này là: alginate, carrageenan, collagen, gelatin, polyvinyl alcohol...

Khác với phương pháp này, vi gói là phương pháp mà đối tượng được cố định trong lòng chất mang nhưng đối tượng vẫn có thể di chuyển tự do trong không gian này.

Ưu điểm: đối tượng được bảo vệ tránh khỏi những ảnh hưởng của các nhân tố bên ngoài. Kỹ thuật này giúp tăng khả năng chuyển hóa cơ chất và có thể tránh làm cho đối tượng cố định bị bất hoạt.

Nhược điểm: khi sinh khối tạo ra nhiều, độ bền của màng sẽ giảm làm cho tế bào có thể thoát ra khỏi mạng gel và phát triển như tế bào tự do.

Các chất mang được dùng để vi gói: chitosan, gelatin, k-carrageenan...[20, 22]

1.4.2.3. Cố định tế bào không sử dụng chất mang

Đây là kỹ thuật có sự hiện diện của một số hóa chất, các tác động về mặt vật lý hoặc hóa học nhờ hình thành liên kết cộng hóa trị giữa tế bào dẫn đến sự tự gắn kết của nhiều tế bào lại với nhau tạo nên một cụm tế bào lớn có cấu trúc phức tạp hơn.

Ưu điểm: dễ tạo lại tế bào tự do.

Nhược điểm: đối tượng cố định có thể bị bất hoạt, biến tính, do có sự hiện diện của một số hóa chất nên sản phẩm tạo ra có thể không đảm bảo an toàn và tính ổn định không cao. Do đó phương pháp tự kết tụ ít được sử dụng trong kỹ thuật cố định [14, 20, 22].

1.4.3. Yêu cầu và phân loại chất mang

1.4.3.1. Yêu cầu về chất mang

Thứ nhất là chất mang phải có bề mặt lớn để tế bào có thể gắn vào, dễ điều khiển và tái sinh. Kế đó là chất mang phải đảm bảo khả năng sống của tế bào cũng như mọi hoạt động của tế bào được ổn định và yêu cầu tiếp theo là chất mang phải có độ xốp đồng đều cao đảm bảo cho sự trao đổi tự do của cơ chất. Một đòi hỏi quan trọng nữa là chất mang phải có tính ổn định cơ học, hóa học, nhiệt, sinh học và không dễ dàng bị

giảm giá trị bởi enzym, dung môi, sự thay đổi áp suất. Song song đó, kỹ thuật cố định trên chất mang phải dễ thực hiện và có hiệu quả về kinh tế. Những chất được sử dụng làm chất mang để cố định thường không có phản ứng với môi trường dinh dưỡng, vi sinh vật và sản phẩm tạo thành và đặc biệt là đảm bảo an toàn cho người tiêu dùng. Chất mang không ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm do dư lượng còn lại và được người tiêu dùng chấp nhận [14].

1.4.3.2. Phân loại chất mang

Chất mang hữu cơ: polymer tổng hợp như là polyvinylalcohol, polyacrylamide, polyacrylic, được dùng để cố định enzym và tế bào bằng phương pháp nhốt trong lòng chất mang [14, 22].

Polymer sinh học: gelatin, keratin, albumin dùng trong cố định tế bào bằng phương pháp vi gói trong gel. Ngoài ra, còn có nhiều vật liệu khác như tinh bột, chitin, chitosan, alginate, carrageenan cũng được dùng để cố định tế bào [14, 22].

Chất mang vô cơ: oxit kim loại (nhôm oxit, mangan oxit, magie oxit, ...), gồm. Chất mang này có đặc điểm là có cấu trúc lỗ xốp, kích thước các lỗ có thể điều chỉnh được, có khả năng cố định tốt với tế bào và enzym [14, 22].

1.4.4. Ưu điểm và nhược điểm của tế bào cố định

1.4.4.1. Ưu điểm

Chất mang dùng để cố định *C. glutamicum* có thể đóng vai trò như một chất bảo vệ chống lại ảnh hưởng hóa lý của nhiệt độ, pH, dung môi, hoặc thậm chí là kim loại nặng. Bên trong chất mang mật độ tế bào trên một đơn vị thể tích cao hơn nên thời gian phản ứng ngắn hơn và loại bỏ sự tăng trưởng của những tế bào vi sinh vật không có lợi. Khi tế bào được cố định trong chất mang thì khả năng hấp thu cơ chất tăng và năng suất được cải thiện và quá trình này có thể tiến hành liên tục. Do chất mang có khả năng chịu được nồng độ cơ chất cao, nên giảm được sự ức chế của sản phẩm cuối. Sản phẩm tạo ra dễ dàng hơn do giảm được các công đoạn tách, chiết và lọc, kéo theo giảm giá thành, giảm chi phí vốn và cũng giảm nguy cơ bị nhiễm vi sinh vật có hại bởi

vì mật độ tế bào cao, nhờ đó mà thời gian sản xuất ra sản phẩm ngắn hơn. Thêm vào đó, ta thấy tế bào cố định có thể tái sử dụng được nhiều lần. Do đó, phương pháp này giúp giảm chi phí ở giai đoạn chuẩn bị giống, năng suất tăng và quá trình bảo quản cũng như lưu thông được thuận lợi, dễ dàng hơn [14, 22].

1.4.4.2. Nhược điểm

Khi sử dụng tế bào cố định, trong môi trường sản xuất, có xảy ra hiện tượng rửa trôi tế bào ra khỏi chất mang. Một điểm nữa là tế bào cố định đòi hỏi cung cấp nhiều nguồn dinh dưỡng, năng lượng để đảm bảo sự sinh trưởng, phát triển bình thường.

Có thể xảy ra hiện tượng phân hủy sản phẩm, để cung cấp chất dinh dưỡng và năng lượng cần cho tế bào. Vì vậy, hiệu suất sử dụng tế bào cố định có thể thấp hơn hiệu suất sử dụng tế bào tự do.

Do được bao bọc bởi chất mang, thành tế bào, màng tế bào chất, có thể sẽ gây cản trở việc thẩm thấu cơ chất, sản phẩm từ môi trường ra vào tế bào, nghĩa là tế bào cố định có khả năng trao đổi chất kém hơn tế bào tự do.

Đối với những cơ chất có kích thước phân tử lớn sẽ không có điều kiện tiếp xúc với tế bào vi sinh vật cố định. Vì thế, hoạt lực của những tế bào cố định có thể sẽ thấp so với những tế bào tự do [14, 22]. Bài toán tối ưu hóa kỹ thuật cố định sẽ giải những nhược điểm này.

Từ những vấn đề trên ta thấy có các chỉ tiêu sau để đánh giá hiệu quả của tế bào cố định:

Khả năng sống của tế bào trong chất mang, lượng tế bào còn sống sót và hoạt động sau một thời gian nhất định, khả năng chuyển hóa cơ chất và thành phần dinh dưỡng đi vào, sản phẩm trao đổi chất đi ra.

Độ bền cơ học của chất mang, sức chịu đựng của chất mang ở pH, nhiệt độ, lực tác động của môi trường và của lực khuấy, lực thổi của không khí đưa vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

Khả năng bảo vệ vi sinh vật trong chất mang, tính đến yếu tố bất lợi với điều kiện ngoại cảnh.

Khả năng tái sử dụng nhiều, vi sinh vật cố định sẽ không bị rửa trôi khi sản xuất liên tục.

1.4.5. Chất mang Carrageenan

1.4.5.1. Giới thiệu về Carrageenan

Carrageenan được phát hiện vào năm 1837, có nhiều dạng khác nhau, mỗi dạng lại có nhiều ứng dụng do có cấu trúc và thành phần hóa học khác nhau.

K-carrageenan là một polysaccharide tự nhiên được tách từ rong Hồng Vân (*Eucheuma gelatinea*) của vùng biển Việt Nam thuộc chi *Eucheuma*, bộ *Gigartinales*, ngành *Rhodophyta*.

Khả năng tạo gel của carrageenan lệ thuộc vào các yếu tố như nhiệt độ, nồng độ mẫu. Đối với yếu tố nhiệt độ qua nghiên cứu ta thấy ở nhiệt độ càng thấp thì quá trình tạo gel diễn ra nhanh hơn, cứng hơn, và ngược lại. Ví dụ ở 60°C không tạo gel, nhưng ở 34°C bắt đầu xuất hiện sự tạo gel ở các nồng độ 1,5 - 2,0 % [2].

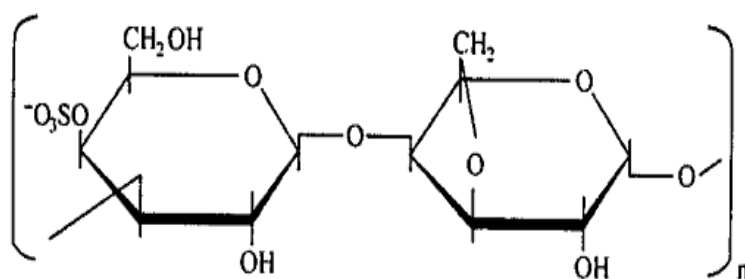
Yếu tố được nghiên cứu tiếp theo là nồng độ mẫu, khi mẫu có nồng độ càng cao thì thời gian chuyển từ dung dịch sang gel càng nhanh và ở nồng độ càng cao càng dễ tạo gel. Một mối tương quan nữa thể hiện là ở nồng độ càng cao, nhiệt độ càng thấp thì quá trình tạo gel dễ dàng hơn và gel cứng hơn [2]. Khả năng tạo gel của carrageenan phụ thuộc vào nhiệt độ, thời gian chuyển đổi từ dung dịch sang gel và nồng độ của carrageenan có trong dung dịch. Gel tạo thành có tính đàn hồi tốt hơn so với agar [2].

1.4.5.2. Cấu tạo Carrageenan

K-carrageenan có cấu trúc bao gồm hai đơn vị như sau: β -D galactose sunphate (đơn vị G) và 3,6 - anhydro - α -D galactose (đơn vị DA) xen kẽ nhau bởi hai liên kết là α (1-3) và β (1-4). K-carrageenan có khả năng tạo gel ở nhiệt độ thấp hoặc khi có mặt của một số ion kim loại kiềm và kiềm thổ. Ở dạng gel, các mạch polysaccharit xoắn vòng

như lò xo và có thể chứa nhiều phân tử nước bên trong, đó là do có sự tương tác giữa các phân tử polyme hòa tan với các phân tử dung môi.

Nhờ tương tác ấy mà gel tạo thành có độ bền cơ học đáng kể, phần xoắn vòng lò xo tạo gel lôi kéo các phân tử dung môi vào vùng liên kết. Sự có mặt của liên kết 3,6 – anhydro là điểm quan trọng của quá trình tạo gel, nó hình thành nên những đoạn xoắn kép và từ đó hình thành nên cấu trúc gel ở những điều kiện thích hợp như nồng độ muối, nhiệt độ [2].



Hình 1.7. Công thức cấu tạo của k-carrageenan [2]

1.4.5.3. Ứng dụng của Carrageenan

Trong công nghiệp sữa: carrageenan có khả năng tạo gel trong sữa nghĩa là sự tương tác giữa các ion sulfat với các đuôi mang điện của các phân tử protein và các cation Ca^{2+} , K^{+} có mặt trong sữa. Trong các dạng Carrageenan thì lamda - carrageenan được ứng dụng nhiều trong công nghệ chế biến sữa, làm bánh kẹo [7].

Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm

Bảng 1.2. Các ứng dụng điển hình của các dạng carrageenan trong thực phẩm

Sử dụng	Dạng carrageenan	Chức năng
Nước gel ngọt, sữa đậu nành	Kappa + iota	Huyền phù, tạo miếng, tạo gel
Sữa chocolate, sữa	Kappa, lambda	Huyền phù, tạo miếng, tạo nhũ tương
Kem sữa	Kappa, iota	Tạo độ bền của nhũ tương
Kem	Kappa	Ổn định nhũ tương, chống tách lỏng

[7].

Một số thực phẩm có chứa carrageenan gồm: kem, sữa, phomat, đồ uống lạnh, mứt ít đường và sữa chua.

Trong mỹ phẩm và thuốc đánh răng: carrageenan không bị phá hủy bởi các enzym cellulase, do các đặc tính tạo gel và sự tạo màng của nó nên carrageenan có thể ứng dụng làm kem đánh răng, chất dưỡng tóc, nước gội đầu, ...

Trong y dược: hạn chế u xơ, chống xơ vữa động mạch, ức chế hoạt động của virus bao gồm virus herpes,...Sử dụng trong xét nghiệm đo độ phù chân chuột, cho ra các loại thuốc mới như một số loại thuốc chống viêm.

Trong sản xuất thuốc viên, carrageenan được sử dụng như chất phủ ngoài [7].

Qua nghiên cứu đặc điểm của k-carrageenan và vi khuẩn *C. glutamicum* tôi thấy phương pháp dùng để cố định vi khuẩn *C. glutamicum* là phương pháp cố định trong lòng chất mang. Bởi vì phương pháp này đơn giản, giá thành thấp. Mật độ tế bào trong chất mang cao, điều kiện cố định ôn hòa rất thích hợp cho vi khuẩn *C. glutamicum* sinh trưởng và phát triển trong chất mang [17].

1.4.5.4. Kỹ thuật cố định vi khuẩn *C. glutamicum* trong chất mang k-carrageenan

Kỹ thuật cố định vi khuẩn *C. glutamicum* trong chất mang k-carrageenan được tiến hành theo phương pháp nhốt trong lòng chất mang.

Cho hỗn hợp huyền phù vi sinh vật (giống sau 48 giờ hoạt hóa) vào hỗn hợp k-carrageenan sau khi đã hấp khử trùng (k-carrageenan được để nguội ở nhiệt độ 37°C), khuấy đều hỗn hợp tạo thành và cho dung dịch KCl (vô trùng) vào và để một thời gian nhất định nhằm làm rắn gel tạo chế phẩm cố định [14].

1.5. CÁC NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC VỀ HƯỚNG CỦA ĐỀ TÀI

❖ Các nghiên cứu trong nước

Nghiên cứu trong nước về cố định tế bào vi khuẩn *C. glutamicum* trên chất mang k-carrageenan còn hạn chế. Tuy nhiên, việc sử dụng vi khuẩn *C. glutamicum* để cố định tế bào trên chất mang (khác chất mang k-carrageenan) cũng được nghiên cứu.

Năm 2009, Nguyễn Thúy Hương và Trần Thị Minh Tâm đã ứng dụng vi khuẩn *Corynebacterium* sp. cố định trong lên men thu nhận L-lysine. Tác giả đã nghiên cứu việc ứng dụng các chế phẩm tế bào vi khuẩn *Corynebacterium* sp. cố định trên một số chất mang alginate, bacterial cellulose (BC) và phức bacterial cellulose – alginate (BC – A) để ứng dụng lên men thu nhận L-lysine, kết quả thu được như sau: hiệu quả sử dụng chế phẩm tế bào vi khuẩn *Corynebacterium* sp. cố định trên phức chất mang bacterial cellulose – alginate (BC – A) trong lên men thu nhận L-lysine cao [11].

Năm 2014, Nguyễn Thúy Hương và Trần Thị Minh Tâm đã tiến hành tối ưu hóa quá trình cố định vi khuẩn *C. glutamicum* VTCC – B – 0632 (Vietnam Type Culture Collection - B - 0632) trên chất mang bacterial cellulose (BC) để thu nhận L-lysine. Kết quả nghiên cứu đã xác định được các thông số tối ưu của quá trình cố định gồm: mật độ tế bào trung bình đạt $6,6.10^9$ tế bào/mL, khối lượng BC 10% (w/v), thời gian hấp phụ là 6,82 giờ, tốc độ lắ 150 vòng/phút và tế bào cố định được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3 ngày. Hiệu suất cố định đạt 72,4%. Mật độ tế bào trung bình trên chất mang BC đạt $47,7 \pm 0,02$ tỷ tế bào/g. Tế bào cố định có thể tái sử dụng 8 lần và sản lượng L-lysine ở lần tái sử dụng thứ tám là 95% với lượng L-lysine thu được $26,032 \pm 0,023\text{g/L}$. Điều kiện bảo quản chế phẩm: nước cất vô trùng, pH dung môi 7,0, sau đó bảo quản ở 4°C trong vòng 30 ngày, tỷ lệ tế bào sống sót 80% [40].

Nhìn chung kỹ thuật cố định tế bào được rất nhiều tác giả quan tâm nghiên cứu trên nhiều đối tượng, sử dụng nhiều loại chất mang khác nhau trong số đó có các nghiên cứu sau:

Nghiên cứu điều kiện cố định nấm men *Saccharomyces cerevisiae* N28 bằng chất mang bacterial cellulose vi khuẩn vào năm 2008 của tác giả Nguyễn Thúy Hương, Bùi Thị Thanh Hương. Tiếp đó là nghiên cứu thu nhận kháng sinh bằng phương pháp lên

men bởi tế bào *Lactococcus lactis* cố định trên chất mang bacterial cellulose vi khuẩn của tác giả Nguyễn Thúy Hương, Trần Thị Tường An [9, 12]. Năm 2010, tác giả Nguyễn Thúy Hương và Thái Trịnh Thượng Trí đã cố định vi khuẩn *Oenococcus oeni* bằng phức chất mang alginate – bacterial cellulose để ứng dụng lên men malolactic [10]. Kết quả các nghiên cứu đạt được số lần tái sử dụng chế phẩm cố định tương đối cao, hoạt tính của đối tượng cố định không có thay đổi nhiều qua các lần tái sử dụng.

❖ Các nghiên cứu ngoài nước

Có rất nhiều nghiên cứu đã ứng dụng chất mang k-carrageenan để cố định tế bào trên nhiều đối tượng khác nhau.

Sau đây là những nghiên cứu sử dụng chất mang k-carrageenan hoặc chất mang k-carrageenan kết hợp với chất mang khác để cố định vi khuẩn, nấm.

Vào năm 2007, Ông H.Yee và cs., đã tiến hành cố định đối tượng *Pseudoalteromonas tunicata* trên chất mang k-carrageenan. Kết quả nghiên cứu này tác giả thấy khả năng sống sót của vi khuẩn cố định được giữ trong 12 tháng và hạn chế nhiễm sinh vật khác. Kết quả của nghiên cứu chứng tỏ k-carrageenan có cấu trúc gel tương đối bền [26].

Đến năm 2008, Hung và cs., đã nghiên cứu cố định đối tượng vi khuẩn *Escherichia coli novablue* γ - glutamyl transpeptidase trong phức chất mang Ca – alginate, k-carrageenan. Kết quả cho thấy có thể sử dụng lặp lại 6 lần, hoạt tính của chúng bị mất chỉ còn lại 45% so với ban đầu [21].

Cũng trong năm 2008, Chi và cs., cùng tiến hành nghiên cứu đặc điểm của *Bacillus kaustophilus leucine aminopeptidase* cố định trong hạt Ca - alginate kết hợp với k-carrageenan thì thấy enzym cố định có thể được sử dụng lặp lại đến 10 lần, không bị mất hoạt tính. Sau đó được ủ ở 4⁰C khoảng 30 ngày, hoạt tính enzym ổn định hơn enzym tự do [15].

Năm 2011, Kumar và cs., cố định bào tử *Aspergillus oryzae* trong k-carrageenan được ứng dụng để sản xuất α – galactosidase. Các tế bào cố định có thể được sử dụng

lên đến 5 lần cho chu kỳ sản xuất enzym. Các hạt k-carrageenan duy trì độ bền cơ học tốt lên 4 lần sử dụng [23].

Năm 2012, Dolui và cs., cũng đã nghiên cứu cố định tế bào vi khuẩn đất trên chất mang k-carrageenan so với tế bào tự do và kết quả thu được hàm lượng 6-Aminopenicillanic Acid (6-APA) của tế bào cố định cao hơn tế bào tự do và 6-APA giữ được hoạt tính sau 14 ngày bảo quản. Hoạt tính enzym penicillin G acylase (PGA) của tế bào cố định trong k-carrageenan thì ổn định hơn trước sự thay đổi của môi trường so với tế bào tự do. Enzym penicillin G acylase (PGA) là enzym quan trọng thường được sử dụng trong công nghiệp sản xuất 6APA [16].

Bên cạnh đó chất mang k-carrageenan cũng được các tác giả nghiên cứu để cố định các enzym.

Năm 2010, Makas và cs., đã nghiên cứu cố định enzym laccase trong k-carrageenan, qua nghiên cứu ta thấy enzym có thể giữ được 42 ngày và hoạt tính riêng của chúng được giữ hơn 80% [24].

Elnashar và cs., vào năm 2014, đã thiết kế thí nghiệm sàng lọc theo ma trận Plackett - Burman để cố định enzym Penicillin G Acylase trên phức chất mang Alginate - Carrageenan, nghiên cứu này đã chứng minh enzym cố định có thể tái sử dụng 14 lần và hoạt tính của enzym được duy trì 84% so với ban đầu [19]. Cũng trong năm này Elnashar và cs., đã tiến hành tối ưu hóa việc cố định β - Galactosidase trong hạt gel k-carrageenan sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt. Kết quả nghiên cứu, enzym cố định β - Galactosidase được sử dụng với số lần lặp lại 20 lần và hoạt tính của enzym được duy trì khoảng 60% so với ban đầu [18].

*Qua các nghiên cứu về hướng của đề tài, chúng tôi nhận thấy kỹ thuật cố định tế bào được sử dụng rất phổ biến, áp dụng cho nhiều đối tượng trên nhiều loại chất mang trong đó có vi khuẩn *C. glutamicum* và k-carrageenan. Chế phẩm thu được có số lần tái sử dụng cao, năng suất sản phẩm được cải tiến so với tế bào tự do.*

Nghiên cứu về chất mang k-carrageenan của các tác giả trong và ngoài nước chúng tôi nhận thấy, k-carrageenan dễ sử dụng và áp dụng được cho nhiều đối tượng. Đây là cơ sở cho chúng tôi tiến hành thử nghiệm tạo chế phẩm C. glutamicum trên chất mang k-carrageenan để ứng dụng lên men thu nhận L-lysine. Mong muốn trong thử nghiệm này, chúng tôi sẽ tạo được chế phẩm cố định C. glutamicum trên chất mang k-carrageenan. Qua đó, chúng tôi đánh giá khả năng sinh tổng hợp L-lysine của tế bào cố định so với tế bào tự do thông qua quá trình lên men. Chất lượng của chế phẩm cố định được chúng tôi kiểm tra qua khảo sát khả năng tái sử dụng cùng điều kiện bảo quản chế phẩm, tìm ra được thời gian tốt để bảo quản chế phẩm cố định.

Chương 2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỊA ĐIỂM - THỜI GIAN THỰC HIỆN

Các thí nghiệm được tiến hành tại phòng 117B₂ của bộ môn công nghệ sinh học, Đại học Bách khoa thành phố Hồ Chí Minh.

Thời gian tiến hành thí nghiệm kéo dài từ tháng 01/3/2014 đến tháng 20/10/2014.

2.2. VẬT LIỆU

Giống: chủng vi khuẩn *C. glutamicum* VTCC - B – 0632 (Vietnam Type Culture Collection - B - 0632) từ Trung tâm lưu trữ giống vi sinh vật chuẩn - Đại học Quốc gia Hà Nội.

K-carrageenan: có nguồn gốc từ Đại học Thủy sản Nha Trang. K- carrageenan ở dạng bột, màu vàng nhạt hay màu trắng, không mùi.

2.2.1. Môi trường sử dụng trong nghiên cứu

Vi khuẩn *C. glutamicum* được nuôi trên các môi trường:

Môi trường giữ giống với các thành phần peptone 1% (w/v), cao nấm men 0,5% (w/v), NaCl 0,5% (w/v), D - glucose 0,5% (w/v), Agar 2% (w/v), và pH = 7,2.

Môi trường nhân giống với các thành phần peptone 1% (w/v), cao nấm men 0,5% (w/v), NaCl 0,5% (w/v), D - glucose 2% (w/v), dịch bắp 5% (w/v) và pH = 7,2.

Qua nghiên cứu, chúng tôi thấy thành phần môi trường lên men ảnh hưởng lớn đến quá trình lên men. Môi trường lên men trong sản xuất L-lysine phải chứa nguồn carbon, nitơ, ion vô cơ, nguyên tố vi lượng, vitamine... Do đó môi trường lên men chúng tôi chọn có các thành phần như sau: D-glucose 20g/L; (NH₄)₂SO₄: 31,57g/L; KH₂PO₄: 1g/L; MgSO₄: 0,1g/L; FeSO₄: 10mg/L; MnSO₄: 10mg/L; ZnSO₄: 10mg/L; CuSO₄: 1mg/L; biotine: 20 μ g/L; CaCO₃: 10g/L; thiamin: 150 μ g/L; mật rỉ đường: 106ml/L; tween 40: 5mL/L; dịch bắp: 116,43mL/L; giống bổ sung 7% [5, 17, 27, 28].

2.2.2. Hóa chất - thiết bị

2.2.2.1. Hóa chất

Hóa chất hỗ trợ tạo gel: CaCl₂, KCl.

Hóa chất nhuộm mẫu: Crystal violet, lugol, fuschin.

Hóa chất định lượng L-lysine: dimethyl sulfoxide (DMSO), dung dịch A (Methyl cellosolve: 46,625mL; 50% (w/v) FeCl_3 ; 0,1KCl), dung dịch B (ninhhydrin 0,5g; 0,1M KCl 50mL), pH=1,0 được điều chỉnh bởi HCl 1N.

Hóa chất xác định đường khử: DNS (dinitrosalicylic acid), NaOH, sodium potassium tartrate ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Hóa chất khác như: KOH, H_2O_2 , ...

2.2.2.2. Thiết bị

Bảng 2.1. Các thiết bị sử dụng trong đề tài

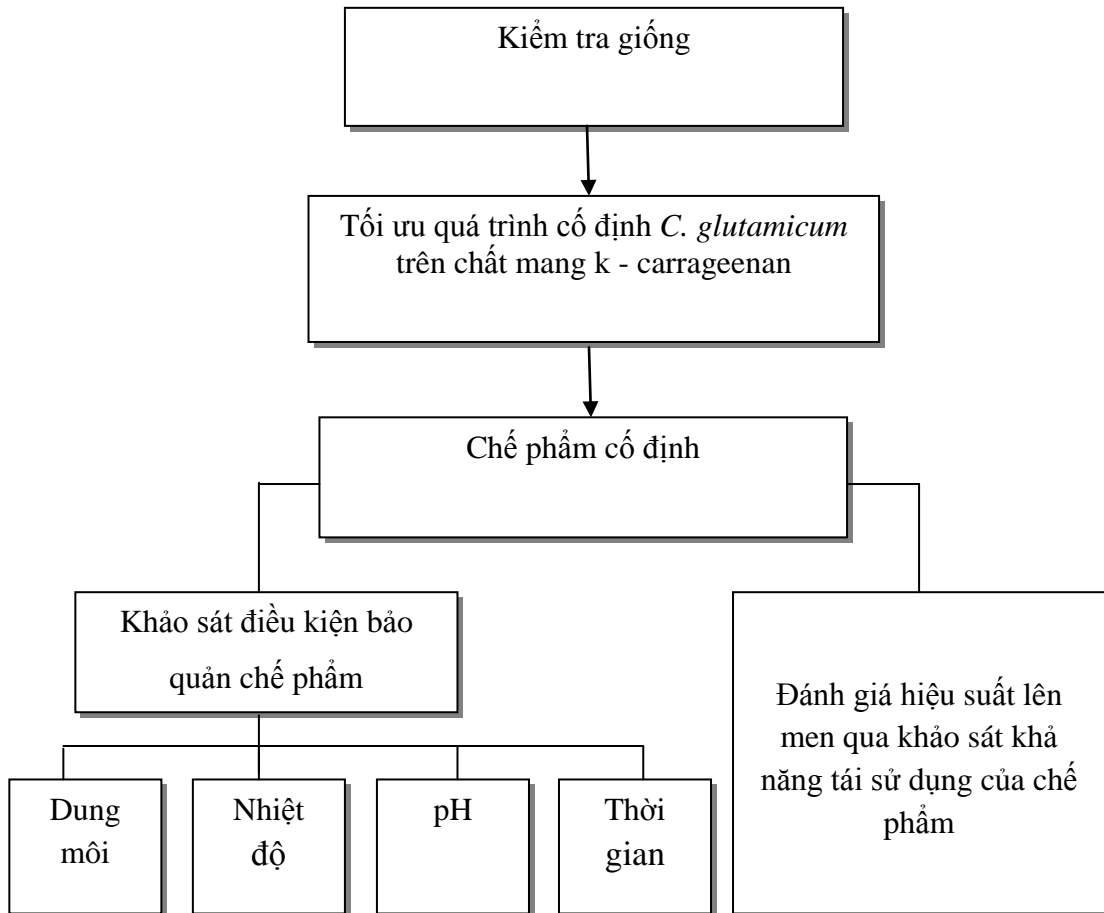
Số thứ tự	Phân loại	Tên thiết bị	Nước sản xuất
1	Thiết bị nuôi cấy	Tủ cấy vô trùng	Trung Quốc
		Tủ ẩm	Shel lab, Đức
		Tủ sấy	Trung Quốc
		Nồi hấp	Hirayama, Nhật
		Máy lắc tròn	DO6 – DAVS, Đức
		Tủ lạnh	Toshiba, Nhật
		Bếp điện	Trung Quốc
2	Thiết bị phân tích	Máy UV -vis	Geresys, Mỹ
		Máy ly tâm	HermLe Z233M 2, Đức
		Máy nghiền mẫu	Việt Nam
		Cân kỹ thuật	CP22025 Sartorius, Nhật
		Máy đo pH	Eutech pH510, Singapore
		Kính hiển vi	Trung Quốc

2.3. NỘI DUNG THÍ NGHIỆM

- Xác định các thông số tối ưu quy trình cố định *C. glutamicum* trên chất mang k-carrageenan bằng phương pháp tối ưu hóa quy hoạch thực nghiệm.
- Khảo sát khả năng tái sử dụng chế phẩm *C. glutamicum* cố định.

- Khảo sát một số điều kiện bảo quản chế phẩm

2.3.1. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

Chủng giống *C. glutamicum* VTCC - B - 0632 khi được nhận từ trung tâm lưu trữ giống. Chúng tôi tiến hành khảo sát những đặc điểm đại thể, vi thể, một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa và khả năng sinh L-lysine của chủng. Kết thúc thí nghiệm tiền đề, chúng tôi tiến hành tối ưu hóa quy trình cố định chủng *C. glutamicum* trên chất mang k - carrageenan bằng phương pháp tối ưu hóa quy hoạch thực nghiệm. Quy trình tối ưu hóa thực nghiệm được tiến hành từ thí nghiệm sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất cố định tế bào như: nồng độ carrageenan, nồng độ KCl, lượng giống bổ

sung vào, thời gian rắn gel từ bên ngoài, nhiệt độ làm rắn gel từ bên ngoài, tốc độ lắng, thời gian rắn gel từ bên trong. Sau đó, tiến hành thực nghiệm tối ưu đáp ứng bề mặt - thiết kế cấu trúc tâm xoay nhằm xác định mối quan hệ tuyến tính giữa hiệu suất cố định và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình cố định.

Kết thúc quá trình tối ưu hóa, chúng tôi ứng dụng lên men chế phẩm cố định thu L-lysine. Đánh giá hiệu quả lên men qua các lần tái sử dụng chế phẩm. Đồng thời chúng tôi khảo sát một số điều kiện bảo quản chế phẩm và xác định tỷ lệ tế bào sống sót theo thời gian.

2.3.2. *Bố trí thí nghiệm*

2.3.2.1. *Kiểm tra giống*

Kiểm tra hình thái đại thể của chủng giống qua phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa.

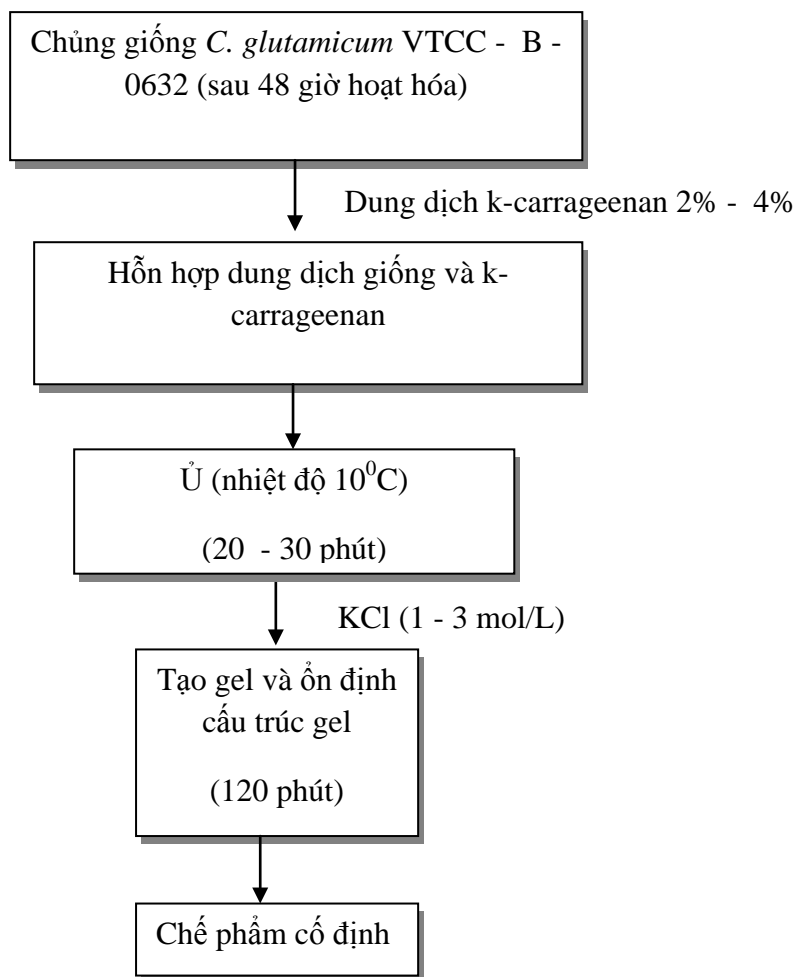
Kiểm tra một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn *C. glutamicum* như hình dạng khuẩn lạc, hình thái vi khuẩn, xác định Gram, hoạt tính enzym catalase, khả năng đồng hóa một số cơ chất.

2.3.2.2. *Cố định tế bào chủng *C. glutamicum* trên chất mang k-carrageenan*

❖ Chuẩn bị vật liệu - hóa chất

- Giống được tăng sinh 48 giờ sau đó ly tâm (4000 vòng/phút trong 15 phút).
- Chuẩn bị các đĩa thạch chứa môi trường cần cho sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn.
- K-carrageenan ở 2 nồng độ 2% (w/v) và 4% (w/v), pha 0,9g NaCl trong 1000mL nước cất.
- KCl ở 2 nồng độ 1M và 3M, pha môi trường nhân giống khoảng 500mL
- Hấp vô trùng dụng cụ ở 121⁰C trong 30 phút và hấp các môi trường đã pha ở 121⁰C trong 15 phút.

❖ Tiến hành cố định tế bào



Hình 2.2. Quá trình tạo chế phẩm cố định trên chất mang k-carrageenan

a. Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng chính đến hiệu suất cố định tế bào

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm sàng lọc được bố trí theo ma trận Plackett – Burman với 7 biến và 12 thí nghiệm. Các biến là các yếu tố khảo sát và hàm mục tiêu là hiệu suất cố định.

Bảng 2.2. Bố trí các biến, giá trị theo các mức khảo sát
trong ma trận Plackett-Burman

Các biến	Đơn vị tính	Ký hiệu	Mức thấp nhất (-1)	Mức cao nhất (+1)
Nồng độ k- carrageenan	%	X ₁	2%	4%
Giống bổ sung	triệu tb/mL	X ₂	100	300
Nhiệt độ hình thành gel	°C	X ₃	5	15
Thời gian hình thành gel	phút	X ₄	20	30
Nồng độ KCl	mol/L	X ₅	1	3
Tốc độ lắc	vòng/phút	X ₆	100	200
Thời gian lắc	phút	X ₇	60	180

Bảng 2.3. Bố trí thí nghiệm theo ma trận Plackett – Burman

TN	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Hiệu suất cố định (%)
1	1	1	1	-1	1	1	-1	
2	1	1	-1	1	1	-1	1	
3	-1	-1	1	1	1	-1	1	
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
5	1	1	-1	1	-1	-1	-1	
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	
7	-1	1	1	-1	1	-1	-1	
8	-1	1	-1	-1	-1	1	1	
9	1	1	1	1	-1	1	-1	
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	
11	-1	-1	-1	1	1	1	-1	
12	-1	1	1	1	-1	1	1	

Chú thích: TN: Thí nghiệm; X₁ khối lượng kappa-carrageenan% (w/v); X₂: giống bổ sung (triệu tế bào/mL); X₃: Nhiệt độ hình thành gel (°C); X₄: Thời gian hình thành gel (phút); X₅: nồng độ KCl (mol/L); X₆: tốc độ lắc (vòng/phút); X₇: thời gian rắn gel (phút)

Kết quả dự kiến: xác định những yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình cố định tế bào.

b. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa các thông số cố định

Chúng tôi tiến hành thực nghiệm tối ưu hóa với thí nghiệm khởi đầu và thí nghiệm trung tâm. Sau đó, tiến hành thí nghiệm bề mặt đáp ứng cấu trúc có tâm.

Bảng 2.4. Bố trí thí nghiệm khởi đầu và thí nghiệm trung tâm

TN	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Hiệu suất cố định Y (%)
1	0	-1	0	0	1	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	
3	0	-1	0	0	1	0	0	
4	0	1	0	0	-1	0	0	
5	0	1	0	0	-1	0	0	
6	0	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	
8	0	0	0	0	0	0	0	
9	0	0	0	0	0	0	0	

Chú thích: TN: Thí nghiệm; X₁: khối lượng kappa-carrageenan % (w/v); X₂: giống bổ sung (triệu tế bào/mL); X₃: Nhiệt độ hình thành gel (°C); X₄: Thời gian hình thành gel (phút); X₅: nồng độ KCl (mol/L); X₆: tốc độ lắc (vòng/phút); X₇: thời gian rắn gel (phút)

Kết quả dự kiến: xác định mối quan hệ giữa hiệu suất cố định tế bào với các yếu tố ảnh hưởng và phân tích khả năng tồn tại mô hình tuyến tính bậc cao.

c. Thí nghiệm tối ưu hóa hiệu suất cố định tế bào

Bố trí thí nghiệm: phân tích sự ảnh hưởng các yếu tố đến hàm mục tiêu, chúng tôi xác định 2 yếu tố được bố trí trong bảng 2.5 ảnh hưởng có ý nghĩa đến hiệu suất cố định tế bào.

Kết quả dự kiến: xác định mối quan hệ hiệu suất cố định tế bào với các yếu tố theo hàm số bậc cao.

Bảng 2.5. Bảng bố trí thí nghiệm CCD (central composite Design)

Thí nghiệm	Giá trị mã hóa		Giá trị thực		Hiệu suất cố định Y (%)
	X ₂	X ₅	X ₂ (triệu tế bào/mL)	X ₅ (mol/L)	
1	0,00	0,00	200,00	2,00	
2	0,00	0,00	200,00	2,00	
3	-1,40	0,00	58,58	2,00	
4	0,00	0,00	200,00	2,00	
5	-1,00	-1,00	100,00	1,00	
6	1,40	0,00	341,42	2,00	
7	-1,00	1,00	100,00	3,00	
8	1,00	1,00	300,00	3,00	
9	0,00	0,00	200,00	2,00	
10	0,00	-1.40	200,00	0,59	
11	0,00	1.40	200,00	3,41	
12	1,00	-1,00	300,00	1,00	
13	0,00	0,00	200,00	2,00	

Chú thích: X₂: giống bổ sung (triệu tế bào/mL); X₅: nồng độ KCl (mol/L)

2.3.2.3. Đánh giá chế phẩm cố định

Tiến hành đồng thời lên men chế phẩm cố định và khảo sát điều kiện bảo quản chế phẩm. Ứng dụng chế phẩm cố định để lên men thu sản phẩm và khảo sát khả năng tái sử dụng chế phẩm.

a. Lên men thu L-lysine từ chế phẩm cố định

Nguyên tắc: lên men chế phẩm cố định, tế bào trong chế phẩm sẽ bị rửa trôi theo thời gian do:

- Đặc điểm chất mang cố định, nên những yếu tố lên men như: oxy, nhiệt độ cùng tốc độ khuấy đảo sẽ tác động vào cấu trúc gel của chế phẩm cố định, làm cho chế phẩm bị vỡ theo thời gian lên men.

- Các thành phần hóa chất ảnh hưởng bất lợi đến cấu trúc chất mang.

Bố trí thí nghiệm: tiến hành lên men chế phẩm cố định và mẫu đối chứng (tế bào tự do) ở cùng điều kiện. Lấy mẫu theo thời điểm khảo sát để phân tích các chỉ tiêu sau: lượng L-lysine thu được, lượng đường sử dụng và mật độ tế bào còn lại trong chế phẩm cố định.

Kết quả dự kiến: xác định được tỷ lệ rửa trôi, số lần tái sử dụng của chế phẩm để đánh giá hiệu suất của chế phẩm cố định so với tế bào tự do.

b. Khảo sát điều kiện bảo quản chế phẩm cố định

Nguyên tắc: Chế phẩm vi sinh sẽ giảm hoạt tính theo thời gian.

Điều kiện bảo quản chế phẩm thích hợp, giúp chúng tôi xác định chính xác thời gian tốt nhất để bảo quản chế phẩm cố định. Thí nghiệm được bố trí theo bảng 2.6.

Bảng 2.6. Bảng bố trí thí nghiệm khảo sát các điều kiện bảo quản chế phẩm cố định

Thí nghiệm	Yếu tố thay đổi	Yếu tố cố định
1	Dung môi để ngâm chế phẩm: Nước vô trùng NaCl: 0,5%, 0,85%, 1,0% (w/v) KCl: 0,5%, 1,0% (w/v) CaCl ₂ : 0,5%, 1,0% (w/v) CaCl ₂ /KCl: 0,5%:0,5%; 5%:1,0%; 1,0%:1,0%; 1,0%: 0,5% (w/v)	pH của dung môi: 7,0, nhiệt độ: 4 ⁰ C, thời gian: 72 giờ
2	pH của dung môi: 5, 6, 7, 8	Nhiệt độ: 4 ⁰ C, thời gian: 72 giờ dung môi để ngâm chế phẩm chọn từ thí nghiệm 1
3	Nhiệt độ: 0 ⁰ C, 4 ⁰ C và nhiệt độ phòng (30 ⁰ C đến 32 ⁰ C)	Thời gian: 72 giờ, dung môi ngâm chế phẩm chọn từ thí nghiệm 1, pH của dung môi chọn từ thí nghiệm 2

Kết quả dự kiến: xác định được dung môi, pH, nhiệt độ thích hợp để tiến hành bảo quản chế phẩm theo thời gian.

c. Khảo sát tỷ lệ sống sót của tế bào theo thời gian

Bố trí thí nghiệm: dựa vào dung môi, pH, nhiệt độ đã xác định được ở trên, chúng tôi tiến hành thí nghiệm bảo quản chế phẩm cố định theo thời gian và khảo sát ở các thời điểm (7 ngày, 10 ngày, 14 ngày, 30 ngày, 60 ngày).

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ tế bào sống sót sau mỗi thời điểm bảo quản.

Kết quả dự kiến: xác định tỷ lệ tế bào sống sót theo thời gian bảo quản, tìm ra thời điểm bảo quản chế phẩm tốt nhất.

2.4. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

2.4.1. Phương pháp vi sinh

2.4.1.1. Kiểm tra hình thái vi sinh

- ✓ Kiểm tra đại thể chủng giống thông qua quan sát hình dạng khuẩn lạc của vi khuẩn *C. glutamicum* bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa.

Tiến hành

Chuẩn bị các đĩa thạch chứa môi trường cần cho sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Hút 0,1mL dịch huyền phù ở các độ pha loãng khác nhau cho vào từng đĩa thạch, tiếp đó sử dụng que cấy trang (vô khuẩn) để dàn đều các tế bào trên bề mặt thạch, ủ ấm ở 30⁰C để vi khuẩn phát triển tốt. Sau 24h giờ ủ, quan sát hình dạng của khuẩn lạc [6].

- ✓ Kiểm tra vi thể qua quan sát hình thái của chủng *C. glutamicum* dưới kính hiển vi bằng phương pháp nhuộm Gram

Tiến hành: lau sạch các phiến kính bằng cồn 70⁰. Tiệt trùng que cấy dưới ngọn đèn cồn, lấy một giọt nước cất cho lên phiến kính. Lấy một ít giống cho lên phiến kính đã có sẵn giọt nước. Hơ nóng nhẹ phiến kính để cố định mẫu. Nhỏ một giọt thuốc nhuộm crystal violet lên giọt huyền phù đã được hơ nóng, để yên 30 giây sau đó rửa

lại bằng nước. Sau đó, lại nhỏ giọt thuốc nhuộm iodine lên mẫu trong khoảng 30 giây, rồi rửa lại với nước tiếp đó rửa qua cồn 70⁰ và rửa lại với nước. Cuối cùng nhỏ một giọt safranin lên mẫu, để yên khoảng 30 giây và rửa lại với nước. Thấm khô phiến kính với giấy thấm, cho vào mẫu một giọt dầu và quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X [6].

2.4.1.2. Kiểm tra mật độ tế bào

Thông qua cấy trang ở các nồng độ pha loãng 10⁻¹ - 10⁻⁷ tế bào/mL, sau đó đem ủ khoảng 24h trong điều kiện nhiệt độ thích hợp ở tủ ủ ấm và lấy mẫu ra đếm tế bào.

Số tế bào được tính theo công thức: $\text{tế bào/mL} = \frac{\frac{a+b}{2}}{10^{-n}} \cdot 10$

Trong đó: a số tế bào đếm được trên đĩa thứ nhất.

b số tế bào đếm được trên đĩa thứ hai.

10⁻ⁿ : nồng độ pha loãng huyền phù tế bào [6]

Định lượng vi sinh vật bằng phương pháp trải đĩa kiểm tra mật độ tế bào

Lấy mẫu theo từng thời điểm lên men, sau đó pha loãng mẫu ở các nồng độ 10⁻⁶, 10⁻⁷ và tiến hành trải đĩa ở 2 nồng độ trên. Mỗi nồng độ lặp lại 3 đĩa. Sau đó để đĩa trong tủ ấm ở nhiệt độ 30⁰C trong khoảng thời gian 24h lấy ra đếm khuẩn lạc, ghi nhận kết quả [6].

2.4.1.3. Kiểm tra đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn

✓ Xác định vi khuẩn hiếu khí bằng catalase

Cho giọt H₂O₂ 3% lên lam kính, dùng que cấy chấm lấy khuẩn lạc rồi dàn đều lên giọt H₂O₂. Nếu có sự sủi bọt khí đó là vi khuẩn hiếu khí, ngược lại là kỵ khí [4].

✓ Xác định Gram bằng phản ứng String test

Nhỏ một giọt KOH 3% lên lam kính, sau đó dùng que cấy chấm lấy khuẩn lạc rồi dàn đều lên giọt KOH. Nếu có kéo sợi trong 60s thì đó là vi khuẩn Gram dương, ngược lại là vi khuẩn Gram âm [4].

2.4.2. Phương pháp hóa sinh

2.4.2.1. Định lượng L-lysine bằng phương pháp đo mật độ quang

Thuốc thử ninhydrin - ferric phản ứng cao và đặc biệt với L-lysine ở pH=1,0. Ion sắt sẽ hạn chế sự phản ứng của ninhydrin với proline, nithine, glycine, arginine và histidine. Chinard (1952), tìm thấy ninhydrin phản ứng cao và có khả năng chọn được L-lysine, proline, nithine ở pH=1,0. Sự thêm ion sắt hạn chế phản ứng của ninhydrin với proline, ở pH=1,0 tăng độ nhạy cảm của ninhydrin với L-lysine. Phương pháp này có thể sử dụng để định lượng mẫu L-lysine không cần pha loãng. Dimethyl sulfoxide bổ sung vào để hòa tan phức hợp ninhydrin - ferric - L-lysine, làm tăng phản ứng của thuốc thử ninhydrin - ferric với L-lysine [38].

Chuẩn bị mẫu phân tích: Sau mỗi thời điểm lên men ta lấy dịch lên men và đem ly tâm 13000 vòng/phút trong khoảng thời gian 10 phút để loại bỏ sinh khối và lấy dịch lỏng để phân tích L-lysine.

Tiến hành

Hút 20 μ L mẫu trộn hoàn toàn với 0,66mL của dung dịch A và 0,37mL dung dịch B. Hỗn hợp đã trộn được đun ở nhiệt độ 100⁰C khoảng 20 phút, sau đó làm lạnh dưới vòi nước. Tiếp theo bổ sung 4mL DMSO (Dimethyl sulfoxide), 6mL nước cất và vortex mẫu. Mẫu đối chứng cách làm tương tự nhưng thay mẫu bằng nước cất 2 lần. Dem mẫu đo ở bước sóng 470nm [38].

Từ kết quả đo kết hợp với đường chuẩn (phụ lục 1) suy ra lượng L-lysine có trong dịch lên men ở từng thời điểm khảo sát.

2.4.2.2. Phương pháp xác định đường khử bằng 3,5 – dinitrosalicylic acid (DNS)

Nguyên tắc: thuốc thử acid dinitrosalicylic (DNS) có màu vàng trong dung dịch kiềm sẽ bị khử thành acid 3 - amino -5-nitrosalicylic có màu đỏ cam. Phương pháp này dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử acid dinitrosalicylic

(DNS). Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ đường khử hiện diện trong mẫu [8, 31, 33].

Chuẩn bị mẫu phân tích: sau mỗi thời điểm lên men ta lấy dịch đó và đem ly tâm (13000vòng/phút) với thời gian khoảng 10 phút để loại bỏ sinh khối và lấy dịch lỏng để phân tích đường sót còn lại trong dịch lên men.

Tiến hành

Lấy 3mL dung dịch mẫu đã pha loãng sau ly tâm cho vào ống nghiệm và bổ sung thêm 1mL DNS (dinitrosalicylic), vortex và bịt kín mẫu đem đun 100⁰C với thời gian 5 phút. Sau đó làm lạnh tới ở nhiệt độ phòng. Mẫu đối chứng cách làm cũng tương tự nhưng thay mẫu bằng nước cất hai lần. Đo độ hấp phụ màu ở bước sóng 560nm.

Từ kết quả đo kết hợp với đường chuẩn (phụ lục 2) suy ra nồng độ đường có trong dịch lên men ở từng thời điểm khảo sát [8].

2.4.3. Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu được phân tích thống kê cơ bản và biểu diễn dưới dạng Mean \pm SD. Đánh giá sự khác biệt giữa các thông số theo mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$

Sử dụng phần mềm Minitab 17 để phân tích và thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa.

Các công thức sử dụng trong đề tài

$$\text{Hiệu suất cố định: H (\%)} = \frac{\text{Số tế bào cố định trong k-carrageenan}}{\text{Số tế bào bổ sung vào}} \times 100$$

$$\text{Mật độ tế bào trung bình (triệu tế bào/g)} = \frac{\text{Số tế bào cố định trong k-carrageenan}}{\text{Khối lượng của chế phẩm cố định}} \times 100$$

$$\text{Sản lượng L-lysine (100\%)} = \frac{\text{Lysine } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}{\text{Lượng đường sử dụng } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} \times 100$$

Chương 3. KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

3.1. KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA CHỦNG GIỐNG

3.1.1. Đặc điểm đại thể, vi thể, sinh lý và sinh hóa

Tiến hành khảo sát chủng vi khuẩn *C. glutamicum* VTCC - B - 0632 (Vietnam Type Culture Collection - B - 0632) từ trung tâm lưu trữ giống vi sinh vật chuẩn Đại học Quốc gia Hà Nội về đặc điểm đại thể, vi thể, sinh lý, sinh hóa qua quan sát khuẩn lạc, hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi 100X, thực hiện các phản ứng sinh hóa (String test, catalase) và khả năng đồng hóa một số loại đường. Chúng tôi có một số nhận xét thể hiện qua bảng 3.1 làm tiền đề cho các khảo sát về đối tượng vi sinh vật của đề tài.

Bảng 3.1. Đặc điểm sinh học của chủng *C. glutamicum* VTCC - B - 0632

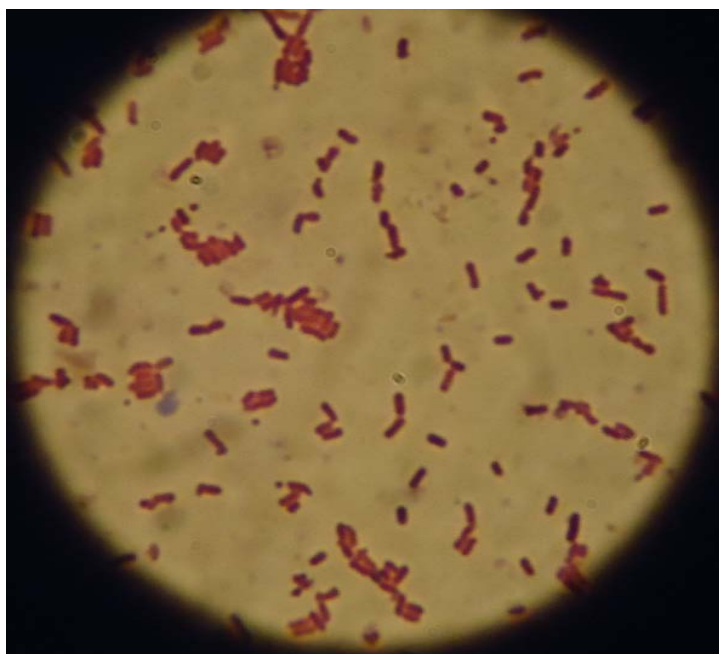
Đặc điểm đại thể	Màu sắc	Vàng nhạt, trắng kem
	Hình dạng	Có nhân, hình tròn, bóng, trơn
	Kích thước	1-2mm
Đặc điểm vi thể	Màu sắc	màu tím
	Hình dạng	Que ngắn hoặc hình chữ V
	Kích thước	1 x 1,5 μ m
	Kiểu sắp xếp tế bào	Dạng chuỗi ngắn
	Gram	dương
	Bào tử	Không có bào tử
	pH	6,5 - 8,5
	Nhiệt độ	20 ⁰ C - 40 ⁰ C
	Catalase	+

Sinh lý, sinh hóa	Glucose	+
	Sucrose	+
	Fructose	+
	Pentose	+

(+): Vi khuẩn có khả năng tiết enzym catalase và phát triển được trên các nguồn carbohydrat khảo sát



Hình 3.1. Hình dạng khuẩn lạc của chủng giống

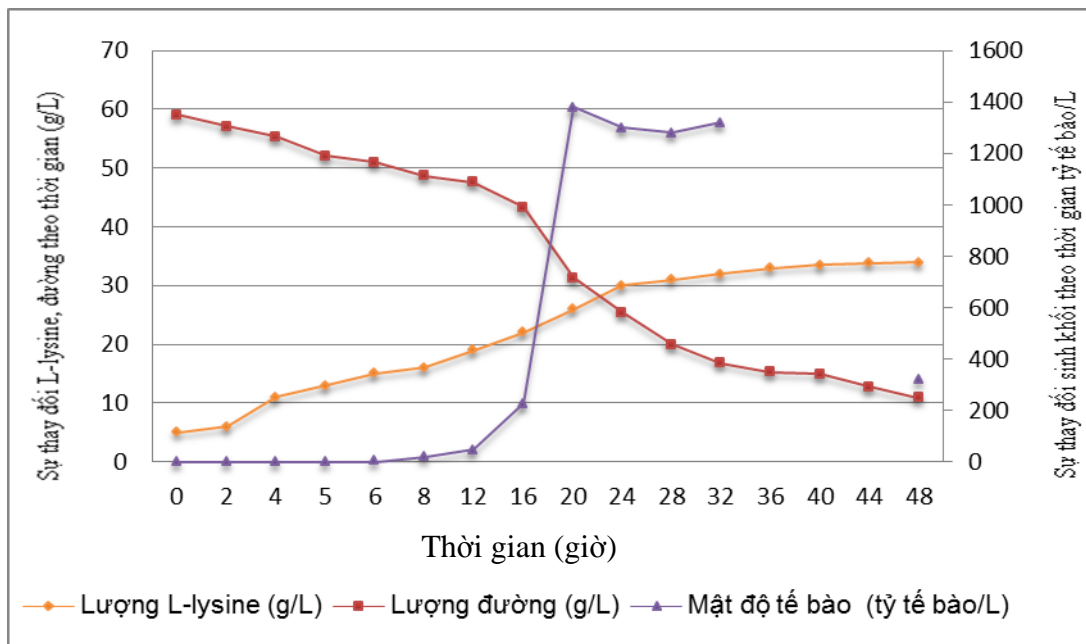


Hình 3.2. Hình thái của chủng giống

Kết quả khảo sát đặc điểm sinh học của chủng giống là cơ sở để chúng tôi tiến hành thí nghiệm tối ưu hóa.

3.1.2. *Biến động sinh trưởng và khả năng trao đổi chất của chủng giống*

Chúng tôi tiến hành lên men chủng giống VTCC - B - 0632 trong môi trường lên men và lấy mẫu theo thời gian từ 0 giờ đến 48 giờ khảo sát sự biến động sinh trưởng, khả năng sử dụng cơ chất và khả năng sinh tổng hợp L-lysine theo thời gian. Chúng tôi thấy sự biến động sinh trưởng và khả năng sinh L-lysine diễn ra đồng thời nhưng không đồng nhất với nhau. Kết quả khảo sát được trình bày ở (phụ lục 3) và đồ thị hình 3.3.



Hình 3.3. Đồ thị biểu diễn sự biến động sinh trưởng, khả năng trao đổi chất của chủng giống *C. glutamicum* theo thời gian

Quan sát đường biểu diễn sự biến động sinh trưởng (hình 3.3) thời điểm từ 0 giờ đến 20 giờ vi khuẩn đã trải qua 2 pha:

Pha lag (từ 0 giờ - 2 giờ): là giai đoạn vi khuẩn thích nghi với môi trường, lượng cơ chất (đường glucose) giảm nhẹ từ 59,1g/L xuống 57,2g/L tức vi khuẩn đã sử dụng khoảng 1,9g/L lượng cơ chất để đáp ứng cho sự tăng thể tích và khối lượng tế bào. Pha này diễn ra ngắn có thể do chủng giống gồm các tế bào đang ở pha sinh trưởng logarit và được nuôi trong cùng điều kiện nên dễ thích nghi với môi trường. Gần ở thời điểm 2 giờ sinh khối bắt đầu tăng nhẹ từ $4,6.10^5$ tế bào/mL - $8,7.10^5$ tế bào /mL.

Pha log từ 2 – 20 giờ vi khuẩn sinh trưởng và phát triển rất nhanh thể hiện ở đường biểu diễn (hình 3.3). Lượng cơ chất sử dụng trong giai đoạn này rất lớn khoảng 25,9 g/L làm lượng đường trong canh trường giảm từ 57,2 g/L xuống 31,3 g/L, đường biểu diễn lượng đường giảm mạnh ở thời điểm 20 giờ (hình 3.3) nhằm đáp ứng cho quá trình trao đổi chất diễn ra mạnh, kết quả sinh khối tăng nhanh và đạt cực đại ở thời điểm 20 giờ ($1,38.10^9$ tế bào/mL). Tiếp đó lượng cơ chất còn được sử dụng nhằm mục đích sinh tổng hợp L-lysine do quá trình phát triển và sinh tổng hợp L-lysine của chủng giống xảy ra cùng một lúc, nên lượng đường giảm mạnh. Lượng L-lysine đạt 26g/L (thời điểm 20 giờ)

Sau 20 giờ, chủng *C. glutamicum* bước vào pha cân bằng đường biểu diễn giảm và tăng, tức là có sự chết đi và sinh ra để thay thế nên mật độ tế bào trong giai đoạn này ổn định. Pha này tương đối dài (12 giờ) đây là ưu điểm của chủng giống. Lượng L-lysine trong môi trường được tích lũy ngày càng tăng 32g/L (thời điểm 32 giờ), lượng đường giảm từ 31,3g/L xuống 16,8 g/L tức vi khuẩn đã sử dụng khoảng 14,5g/L để tập trung sinh tổng hợp L-lysine.

Sau giai đoạn cân bằng, vi khuẩn ở vào giai đoạn suy vong, lượng cơ chất giảm từ 15,2g/L xuống 10,9g/L. Cơ chất giảm, chất độc trong canh trường tích tụ càng nhiều, xảy ra cạnh tranh dinh dưỡng làm mật độ tế bào giảm. Hơn nữa, vi khuẩn có thể sử dụng sản phẩm tạo ra làm cơ chất dẫn đến sản phẩm thu được giảm. Do đó, thời

điểm thích hợp dừng quá trình lên men thu nhận L-lysine là 32 giờ. So với nghiên cứu của Trần Thị Minh Tâm (2009) và Ngô Nam Luân (2012) chúng tôi thấy có một số điểm khác biệt sau:

Thời điểm ngừng lên men và thu L-lysine cực đại 32 giờ so với nghiên cứu của Trần Thị Minh Tâm (2009) và Ngô Nam Luân (2012) là 72 giờ.

Mật độ tế bào cao nhất là sau 20 giờ lên men $1,38.10^9$ tế bào/mL.

Sự khác biệt này do chúng tôi sử dụng môi trường lên men khác với môi trường của Trần Thị Minh Tâm (2009) và Ngô Nam Luân (2012).

Tóm lại, trong môi trường lên men, chủng C. glutamicum VTCC - B- 0632 có thể cho lượng L-lysine 32g/L ở thời điểm 32 giờ nuôi cấy. Kết quả này là cơ sở để chúng tôi tiến hành tối ưu hóa nhằm tạo chế phẩm cố định và sử dụng chế phẩm để lên men thu nhận L-lysine, đồng thời giúp chúng tôi đánh giá lại hiệu quả của lên men chế phẩm cố định so với lên men ở tế bào tự do.

3.2. TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CỐ ĐỊNH CHỦNG GIỐNG TRÊN CHẤT MANG K-CARRAGEENAN

3.2.1. Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình cố định

Khả năng tạo gel sẽ ảnh hưởng đến cấu trúc gel và tác động đến hiệu suất cố định tế bào. Khi nồng độ k-carrageenan thấp, gel lỏng và mềm, kích thước lỗ gel to, trong khi đó vi khuẩn *C. glutamicum* có kích thước nhỏ nên dễ bị rửa trôi trong quá trình cố định. Ngược lại khi nồng độ k-carrageenan cao, gel cứng tế bào vi khuẩn khó hòa lẫn hoàn toàn vào dung dịch k-carrageenan nên lượng tế bào cố định trong gel giảm. Sự thay đổi của nhiệt độ cũng ảnh hưởng đến quá trình tạo gel. Nhiệt độ càng thấp quá trình tạo gel diễn ra nhanh, gel cứng, khi nhiệt độ càng cao, gel mềm và lỏng. Sự tăng hoặc giảm thời gian cũng ảnh hưởng đến quá trình hình thành gel và thời gian rắn gel làm thay đổi đặc tính của gel. Nhìn chung, sự thay đổi của nồng độ chất mang và nhiệt độ, thời gian hình thành gel sẽ tác động đến tính chất của gel và ảnh hưởng đến

hiệu quả cố định tế bào, nên chúng tôi chọn ba yếu tố này để khảo sát tiếp tục mức độ ảnh hưởng của chúng đến quá trình cố định.

Gel được hình thành cứng và có độ đàn hồi khi có sự hiện diện của ion K^+ , khi thay đổi nồng độ của KCl thì độ cứng và độ đàn hồi của gel thay đổi theo. Cấu trúc gel sẽ bị thay đổi dưới tác động của tốc độ khuấy đảo. Do đó, nồng độ KCl, tốc độ lắc là hai yếu tố tiếp theo tác động đến hiệu suất cố định tế bào. Giống bổ sung cũng là một yếu tố cần quan tâm vì sự tăng hoặc giảm lượng giống bổ sung sẽ tác động trực tiếp lên hiệu suất cố định tế bào. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của các yếu tố: X_1 : khối lượng K-carrageenan % (w/v); X_2 : giống bổ sung (triệu tế bào/mL); X_3 : nhiệt độ hình thành gel ($^{\circ}C$); X_4 : thời gian hình thành gel (phút); X_5 : nồng độ KCl (mol/L); X_6 : tốc độ lắc (vòng/phút); X_7 : thời gian rắn gel (phút). Thí nghiệm sàng lọc được thiết kế dựa trên 7 yếu tố với 12 thí nghiệm được trình bày qua bảng 3.2

Bảng 3.2. Hiệu suất cố định trong thí nghiệm sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình cố định

TN	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	Hiệu suất cố định (%)
1	4	300	15	20	3	200	60	28,77
2	4	300	5	30	3	100	180	22,39
3	2	100	15	30	3	100	180	46,99
4	2	100	5	20	1	100	60	70,80
5	4	300	5	30	1	100	60	35,38
6	4	100	15	20	1	100	180	79,21
7	2	300	15	20	3	100	60	21,44
8	2	300	5	20	1	200	180	25,16
9	4	100	15	30	1	200	60	76,96
10	4	100	5	20	3	200	180	58,18

11	2	100	5	30	3	200	60	45,19
12	2	300	15	30	1	200	180	43,80

Chú thích: TN: Thí nghiệm; X₁ khối lượng kappa-carrageenan % (w/v); X₂: giống bổ sung (triệu tế bào/mL); X₃: Nhiệt độ hình thành gel (°C); X₄: Thời gian hình thành gel (phút); X₅: nồng độ KCl (mol/L); X₆: tốc độ lắc (vòng/phút); X₇: thời gian rắn gel (phút).

Trong 12 thí nghiệm khảo sát, hiệu suất cố định tế bào dao động trong khoảng 21,44% – 79,21% khi ta thay đổi các giá trị của 7 yếu tố. Hiệu suất cố định cao nhất là 79,21% (thí nghiệm 6) và thấp nhất là 21,44% (thí nghiệm 7). Thông qua các mức của các biến trong thí nghiệm và sự ảnh hưởng của chúng lên hiệu suất cố định tế bào bảng 3.3. Chúng tôi có một số nhận xét như sau:

X₁: khối lượng chất mang % (hệ số ảnh hưởng 0,792, p= 0,106); X₃: nhiệt độ hình thành gel (hệ số ảnh hưởng 3,338, p= 0,155); X₄: thời gian hình thành gel (hệ số ảnh hưởng -2,140, p=0,605); X₆: tốc độ lắc (hệ số ảnh hưởng 0,310, p=0,940); X₇: thời gian rắn gel (hệ số ảnh hưởng -0,008, p= 0,908) các yếu tố trên đều có giá trị p lớn hơn mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ nên các yếu tố này không có ảnh hưởng đến hiệu suất cố định tế bào (bảng 3.3)

Bảng 3.3. Các mức của các biến trong thí nghiệm và sự ảnh hưởng của các biến lên hiệu suất cố định (R-sq = 96,4%; p < 0,05 được chấp nhận)

Tên các yếu tố	Ký hiệu	Mức độ			Ảnh hưởng chính	Giá trị của p
		Thấp (-1)	Trung tâm (0)	Cao (+1)		
Khối lượng chất mang (%)	X ₁	2	3	4	+0,792	0,106
Giống (triệu TB/ mL)	X₂	100	200	300	-0,334	0,001
Nhiệt độ hình thành gel (°C)	X ₃	5	10	15	+3,338	0,155
Thời gian hình thành gel (phút)	X ₄	20	25	30	-2,140	0,605

Nồng độ KCl (M)	X₅	1	2	3	-18,060	0,009
Tốc độ lắc (vòng/phút)	X ₆	100	150	200	+0,310	0,940
Thời gian rắn gel (phút)	X ₇	60	120	180	-0,008	0,908

R-sq: mô hình tìm được phù hợp với thực nghiệm

Trong khi đó X₂: giống bổ sung (hệ số ảnh hưởng -0,334, $p = 0,001$) và X₅: nồng độ KCl (hệ số ảnh hưởng -18,060, $p = 0,009$) có giá trị p nhỏ hơn mức ý nghĩa

$\alpha = 0,05$ nên sự thay đổi giá trị của hai yếu tố sẽ ảnh hưởng lớn đến hiệu suất cố định tế bào (bảng 3.3). Căn cứ vào hệ số ảnh hưởng chúng tôi phải giảm lượng giống bổ sung vào (X₂), và nồng độ KCl (X₅) ở mức thấp tức dưới mức giá trị trung tâm, hiệu suất cố định tế bào đạt cao nhất 79,21% như ở thí nghiệm 6, ngược lại nếu tăng lượng giống bổ sung và nồng độ KCl ở mức cao tức trên mức giá trị trung tâm, hiệu suất cố định tế bào thấp nhất 21,44% như ở thí nghiệm 7. Sự tăng hoặc giảm 2 yếu tố so với mức giá trị trung tâm làm hiệu suất cố định tế bào dao động trong 21,44% -79,21%.

Kết quả này có giá trị $R - sq = 96,4\%$, chứng tỏ mô hình bố trí phù hợp với thực nghiệm khoảng 96,4%. Kết thúc thí nghiệm sàng lọc, chúng tôi tìm được 2 yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất cố định tế bào là giống bổ sung (X₂) và nồng độ KCl (X₅).

3.2.2. Tối ưu hóa quá trình cố định chủng *C. glutamicum* trên chất mang *k-carrageenan*

Bố trí và bổ sung thêm một số thí nghiệm giá trị trung tâm với 2 yếu tố ảnh hưởng đến quá trình cố định. Thí nghiệm khởi đầu được tiến hành 9 thí nghiệm trong đó có 4 thí nghiệm được bố trí ở 2 mức (-1,1) và 5 thí nghiệm trung tâm. Được trình bày qua bảng 3.4

Bảng 3. 4. Hiệu suất cố định của thí nghiệm khởi đầu

TN	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Hiệu suất cố định Y (%)
1	0	-1	0	0	1	0	0	44,59

2	0	0	0	0	0	0	0	26,92
3	0	-1	0	0	1	0	0	70,56
4	0	1	0	0	-1	0	0	21,11
5	0	1	0	0	-1	0	0	41,40
6	0	0	0	0	0	0	0	27,11
7	0	0	0	0	0	0	0	28,55
8	0	0	0	0	0	0	0	26,14
9	0	0	0	0	0	0	0	27,11

Chú thích: TN: Thí nghiệm; X_1 : khối lượng kappa-carrageenan % (w/v); X_2 : giống bổ sung (triệu tế bào/mL); X_3 : Nhiệt độ hình thành gel ($^{\circ}\text{C}$); X_4 : Thời gian hình thành gel (phút); X_5 : nồng độ KCl (mol/L); X_6 : tốc độ lắc (vòng/phút); X_7 : thời gian rắn gel (phút)

Trong 9 thí nghiệm khảo sát, hiệu suất cố định tế bào dao động trong khoảng 21,11% đến 70,56%. Khi ta thay đổi các giá trị của 2 yếu tố ở 2 mức (-1,1). Hiệu suất cố định cao nhất 70,56% (thí nghiệm 3) và thấp nhất 21,11% (thí nghiệm 4). Thông qua các mức của hai biến trong thí nghiệm và sự ảnh hưởng của chúng lên hiệu suất cố định tế bào (bảng 3.5), chúng tôi có nhận xét sau:

Bảng 3.5. Các mức ảnh hưởng của hai yếu tố khảo sát

Tên yếu tố	Ký hiệu	Mức độ			Ảnh hưởng chính	Giá trị của p
		Thấp (-1)	Trung tâm (0)	Cao (+1)		
Giống bổ sung (triệu tế bào/mL)	X_2	1	2	3	-35,53	0,000
Nồng độ KCl (mol/L)	X_5	1	2	3	-9,24	0,01
R-sq = 98,85%; p < 0,05 được chấp nhận.						

R-sq: mô hình tìm được phù hợp với thực nghiệm

Chúng tôi nhận thấy, giống được bổ sung vào có ảnh hưởng lớn nhất đến hiệu suất cố định tế bào, sau đó là nồng độ chất rắn gel KCl. Cụ thể: X_2 (giống được bổ sung vào (triệu tế bào/mL) có hệ số ảnh hưởng: -35,53, p= 0,000), X_5 (nồng độ KCl (mol/L) có hệ số ảnh hưởng: -9,24, p= 0,01).

Bảng 3.6. Kết quả phân tích phương sai của hai yếu tố khảo sát

Thành phần	DF	Giá trị F	Giá trị P
X ₂	1	245,42	0,000
X ₅	1	16,58	0,010
Curvature	1	167,06	0,000
Lack of fit	1	30,06	0,005

Chú thích: DF: số bậc tự do của từng thành phần; X₂: giống bổ sung (triệu tế bào/mL); X₅: nồng độ KCl (mol/L); Curvature: dạng đường cong; lack of fit: mức độ phù hợp của mô hình với dữ liệu

Kết quả phân tích (bảng 3.6), chúng tôi thấy khả năng mô hình xuất hiện dạng đường cong lớn (giá trị p nhỏ hơn 0,001, tức có xác suất trên 99,9% khả năng mô hình biểu diễn ở dạng đường cong). Giá trị xác suất p= 0,005 nhỏ hơn mức ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$, nên mô hình dữ liệu dự đoán ban đầu không còn phù hợp nữa. Thông qua hệ số quyết định r^2 (ký hiệu R-sq =98,85%) có nghĩa là số liệu thực nghiệm tương thích với mô hình dự đoán dạng đường cong là 98,85%. Do đó, chúng tôi tiến hành thiết kế tiếp thí nghiệm bề mặt đáp ứng có cấu trúc tâm xoay (RSM – CCD: Response Surface Methods - Central Composite Designs). Thí nghiệm được bố trí và khảo sát ở 5 mức ($-\alpha$; -1; 0; 1; $+\alpha$) với 13 thí nghiệm. Hiệu suất cố định tế bào cao nhất ở thí nghiệm 5 (X₂= -1; X₅= -1) là: $91,6 \pm 2,95\%$ và hiệu suất cố định tế bào thấp nhất ở thí nghiệm 11 (X₂= 200; X₅= 3,41) là: $47,01 \pm 1,25\%$ được trình bày bảng 3.7

Bảng 3.7. Hiệu suất cố định chủng *C. glutamicum* trên chất mang k- carrageenan trong ma trận thực nghiệm RSM - CCD

Thí nghiệm	Giá trị mã hóa		Giá trị thực		Hiệu suất cố định Y (%)
	X ₂	X ₅	X ₂	X ₅	
			(triệu tế bào /mL)	(mol/L)	
1	0,00	0,00	200,00	2,00	58,55±1,82
2	0,00	0,00	200,00	2,00	57,11±1,96
3	-1,40	0,00	58,58	2,00	87,57±2,32

4	0,00	0,00	200,00	2,00	56,14±2,21
5	-1,00	-1,00	100,00	1,00	91,60±2,95
6	1,40	0,00	341,42	2,00	49,50±0,75
7	-1,00	1,00	100,00	3,00	77,60±4,12
8	1,00	1,00	300,00	3,00	56,83±2,05
9	0,00	0,00	200,00	2,00	56,92±2,10
10	0,00	-1,40	200,00	0,59	64,50±3,12
11	0,00	1,40	200,00	3,41	47,01±1,25
12	1,00	-1,00	300,00	1,00	61,30±2,81
13	0,00	0,00	200,00	2,00	57,11±1,81

X_2 : giống bổ sung (triệu tế bào /mL); X_5 : nồng độ KCl (mol/L)

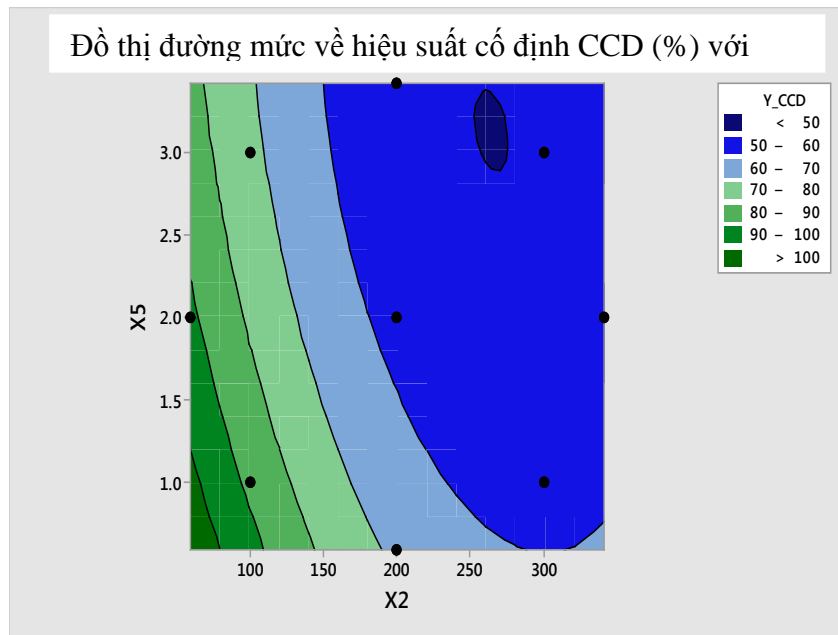
Điều này chứng tỏ khi giống bổ sung vào và nồng độ KCl giảm (dưới mức trung tâm) thì hiệu suất cố định tế bào là cao hơn các thí nghiệm khác. Ngược lại, khi giống bổ sung vào và nồng độ KCl tăng từ mức trung tâm trở lên thì hiệu suất cố định tế bào giảm và đạt giá trị thấp hơn các thí nghiệm còn lại. Do đó, khi tăng mật độ giống, nồng độ KCl thì hiệu suất cố định giảm. Hiệu suất cố định tăng khi giảm mật độ giống và nồng độ KCl trong giới hạn không nằm vào giá trị biên ($-\alpha$, $+\alpha$).

Phân tích ANOVA thí nghiệm đáp ứng bề mặt cấu trúc tâm xoay, mối quan hệ giữa hiệu suất cố định tế bào với các biến ảnh hưởng, hàm mục tiêu được xác định:

$$Y (\%) = 135,1 - 0,613X_2 - 22,0X_5 - 0,0009X_2^2 + 2,97X_5^2 + 0,0238X_2X_5 \quad (3. 1)$$

$R - sq = 91,41\%$. Trong đó, $Y(\%)$: hiệu suất cố định tế bào, X_2 : mật độ giống ban đầu (triệu tế bào/mL), X_5 : nồng độ KCl (mol/L). Hệ số quyết định r^2 (ký hiệu $R - sq$) là 91,41% thể hiện số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu mô hình dự đoán. Phương trình hồi quy cho thấy yếu tố giống ảnh hưởng lớn đến hiệu suất cố định tế bào sau đó là nồng độ KCl. Phân tích phương trình hồi quy cho thấy: giống bổ sung vào (X_2) tỷ lệ nghịch với hàm mục tiêu Y theo dạng hàm bậc một và bậc hai với hệ số ảnh hưởng âm. Mức độ ảnh hưởng theo hàm bậc một là 0,613 và hàm bậc hai là 0,0009. Điều này cho thấy hiệu suất cố định tế bào càng cao khi giảm giống bổ sung

vào vì nếu tăng lượng giống bổ sung vào (X_2) dẫn đến hiện tượng cạnh tranh dinh dưỡng và sự định vị, tế bào sẽ vào giai đoạn pha suy vong và mật độ tế bào trong chế phẩm giảm dần. Hơn nữa, các sản phẩm trao đổi chất tạo ra tăng, vừa tác động vào màng tế bào làm thay đổi tính thấm của màng ảnh hưởng đến quá trình thẩm thấu các chất, vừa gây ức chế sự sinh tổng hợp các hệ enzym và ức chế hoạt động của các hệ enzym. Do đó mật độ tế bào trong chất mang giảm làm hiệu suất cố định giảm. Nồng độ KCl cũng ảnh hưởng đến hiệu suất cố định tế bào. Nồng độ KCl tỷ lệ nghịch với hiệu suất cố định thu được theo dạng hàm bậc nhất với hệ số ảnh hưởng âm và tỷ lệ thuận theo dạng hàm bậc hai với hệ số ảnh hưởng dương. Mức độ ảnh hưởng theo hàm bậc nhất là 22,0 và hàm bậc hai là 2,97. Kết quả cho thấy, khi nồng độ KCl thấp, hiệu suất cố định tế bào tăng vì nếu tăng nồng độ KCl thì có nhiều ion K^+ trong dung dịch k-carrageenan. Các ion này, sẽ kết hợp với gốc SO_3^- do đó làm giảm số lượng gốc SO_3^- tự do có trong k-carrageenan tức giảm được lực đẩy tĩnh điện do gốc này sinh ra dẫn đến hình thành các liên kết hydro giúp cho các phân tử k-carrageenan liên kết chặt nhau. Gel k-carrageenan trở nên cứng và giòn dễ bị vỡ, làm tăng tỷ lệ tế bào tự do và giảm mật độ tế bào trong chế phẩm. Mặc khác, khi nồng độ KCl tăng gel cứng ảnh hưởng đến khả năng thẩm thấu các chất qua màng tác động đến quá trình trao đổi chất gây ức chế sinh trưởng vi khuẩn. Hơn nữa, khi gel cứng vi khuẩn khó hòa lẫn hoàn toàn vào trong dung dịch k-carrageenan. Chính những lí do trên, làm cho hiệu suất cố định tế bào giảm. Cặp yếu tố giống bổ sung (X_2) và nồng độ KCl (X_5) tỷ lệ thuận với hiệu suất cố định tế bào theo hệ số ảnh hưởng dương, mức độ ảnh hưởng là 0,0238. Hình 3.4 thể hiện sự tương tác giữa giống bổ sung và nồng độ KCl với hiệu suất cố định tế bào như sau:



Hình 3.4. Đồ thị đường mức về hiệu suất cố định CCD (%) với X_2 , X_5

Khi giống bổ sung vào (X_2) tăng từ 300 đến 341,42 triệu tế bào/mL và nồng độ KCl cũng tăng từ 1 đến 3,41mol/L thì hiệu suất cố định giảm 50% - 60% (hình 3.4). Quan sát vùng tiếp theo (hình 3.4) hiệu suất cố định đạt từ 60 đến 70% khi giống bổ sung (X_2) ở mức 200 đến 250 triệu tế bào/mL và nồng độ KCl (X_5) ở mức dưới 1mol/L. Xét vùng tiếp theo (hình 3.4) nếu giống bổ sung ở mức 150 - 200 triệu tế bào/mL và nồng độ KCl 3mol/L thì hiệu suất cố định tế bào trong khoảng 70 - 80%, còn giống bổ sung 100 - 150 triệu tế bào/mL và nồng độ KCl 1 mol/L tức giảm ở mức thấp hiệu suất cố định tế bào 80 - 90%. Hiệu suất cố định tăng 90% - 100% khi giảm giống bổ sung ở mức 100 triệu tế bào/mL, nồng độ KCl ở mức 2 mol/L

Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm, chúng tôi đã xác định được các yếu tố không ảnh hưởng đến hiệu suất cố định tế bào như: khối lượng chất mang, nhiệt độ hình thành gel, thời gian hình thành gel, tốc độ lắc, thời gian rắn gel. Các yếu tố này được giữ ở mức giá trị trung tâm. Đồng thời, chúng tôi cũng tìm ra được thông số tối ưu của hai yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất cố định tế bào là giống bổ sung 58,58 triệu tế bào/mL và nồng độ KCl là 0,58 mol/L, hiệu suất cố định đạt 91,6%. Tuy nhiên,

trong thực nghiệm với các thông số tối ưu, hiệu suất cố định tế bào đạt $78\% \pm 2\%$ và mật độ tế bào trong chất mang $50 \pm 0,07$ triệu tế bào/g chế phẩm cố định.

Kết quả này là cơ sở để chúng tôi tạo chế phẩm để ứng dụng lên men chế phẩm cố định nhằm thu nhận L-lysine.

3.3. ỨNG DỤNG CHỦNG *C. GLUTAMICUM* CỐ ĐỊNH TRÊN CHẤT MANG K-CARRAGEENAN ĐỂ LÊN MEN THU NHẬN L-LYSINE

3.3.1. Khả năng tái sử dụng *C. glutamicum* cố định trong lên men thu nhận L-lysine

3.3.1.1. Lượng L-lysine thu nhận từ quá trình lên men bởi chế phẩm cố định qua các lần tái sử dụng

Sau khi tạo được chế phẩm cố định, chúng tôi sử dụng chế phẩm để lên men thu nhận L-lysine và mẫu đối chứng chúng tôi sử dụng tế bào tự do để lên men. Thí nghiệm được thực hiện trong cùng điều kiện. Kết quả được chúng tôi trình bày ở bảng 3.8. Qua kết quả phân tích, chúng tôi nhận thấy lượng L-lysine thu nhận từ quá trình lên men bởi chế phẩm cố định qua các lần tái sử dụng như sau: lần tái sử dụng thứ nhất lượng L-lysine thu được $30,94 \pm 0,22\text{g/L}$ thấp hơn so với đối chứng 32g/L . Mặc dù ở lần tái sử dụng này, tỷ lệ tế bào bị rửa trôi thấp $13,15 \pm 2,01\%$ có nghĩa là mật độ tế bào còn lại trong chế phẩm tương đối cao. Điều này có thể giải thích là do các tế bào trong chế phẩm ở lần tái sử dụng này chưa phát triển đồng nhất với nhau, một số đang trong giai đoạn sinh trưởng và phát triển, số còn lại đang trong giai đoạn sinh tổng hợp L-lysine nên các tế bào còn lại trong chế phẩm cố định đã sử dụng lượng lớn cơ chất $39,76 \pm 0,03\text{g/L}$ để đáp ứng cho cả hai nhu cầu trên, dẫn đến lượng L-lysine tạo ra chưa đạt tối đa. Nguyên nhân tiếp theo là do trong quá trình sinh trưởng và phát triển, vi khuẩn có thể sử dụng lượng L-lysine tạo ra để đáp ứng cho nhu cầu của chúng khi lượng cơ chất gần cạn kiệt.

Bảng 3.8. Thống kê lượng L-lysine, tỷ lệ tế bào bị rửa trôi, lượng đường sử dụng trong lên men thu nhận L-lysine bằng chế phẩm cố định và tế bào tự do.

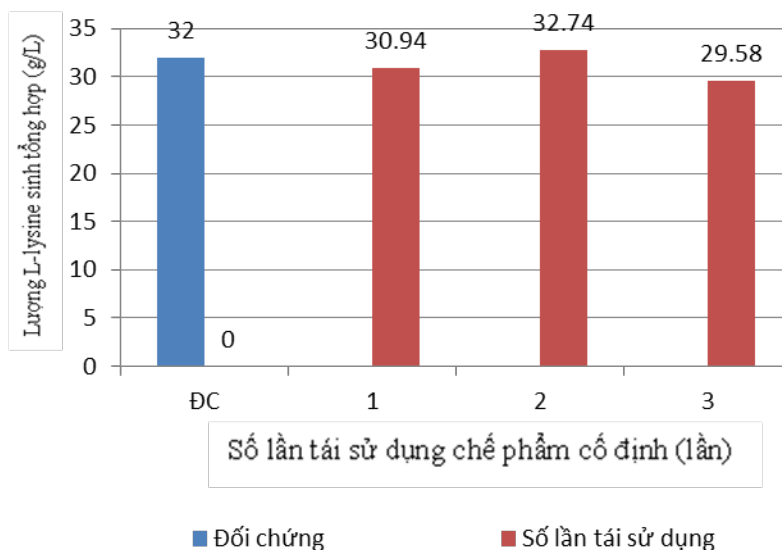
Chỉ tiêu khảo sát	Số lần tái sử dụng chế phẩm cố định				Đối chứng (tế bào tự do)
	1	2	3	4	
Lượng L-lysine (g/L)	$30,94 \pm 0,22^a$	$32,74 \pm 0,18^a$	$29,58 \pm 0,44^a$	$23,39 \pm 0,36^b$	Lượng L-lysine thu được ở 32 giờ lên men 32g/L
Tỷ lệ tế bào bị rửa trôi (%)	$13,15 \pm 2,01^a$	$29,39 \pm 1,05^b$	$37,72 \pm 2,43^c$	$53,88 \pm 1,90^d$	
Lượng đường sử dụng (g/L)	$39,76 \pm 0,03^a$	$35,76 \pm 0,72^b$	$35,3 \pm 0,06^b$	$35,3 \pm 0,09^b$	

(Chú thích: a, b, c, d,: kí hiệu khác thể hiện giá trị có sự khác nhau so với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$)

Lần tái sử dụng thứ hai lượng L-lysine thu được $32,74 \pm 0,18\text{g/L}$ cao so với đối chứng và ba lần tái sử dụng còn lại. Thông qua tỷ lệ tế bào bị rửa trôi $29,39 \pm 1,05\%$, chúng tôi nhận thấy mật độ tế bào còn lại trong chế phẩm lần này có xu hướng giảm so với lần tái sử dụng thứ nhất nhưng lượng L-lysine tạo ra tăng. Vấn đề này được giải thích là do các tế bào trong chế phẩm ở lần tái sử dụng thứ hai không còn trải qua giai đoạn sinh trưởng và phát triển mà chủ yếu trong giai đoạn này vi khuẩn sử dụng cơ chất cho sự sinh tổng hợp L-lysine nên lượng L-lysine tạo ra đạt tối đa và cao so với đối chứng. Lượng cơ chất vi khuẩn sử dụng giảm $35,76 \pm 0,72\text{g/L}$ so với lần tái sử dụng thứ nhất $39,76 \pm 0,03\text{g/L}$. Lần tái sử dụng thứ ba và thứ tư lượng L-lysine giảm dần và thấp nhất ở lần tái sử dụng thứ tư $23,39 \pm 0,36\text{g/L}$, nguyên nhân do tỷ lệ tế bào bị rửa trôi ở lần tái sử dụng này có xu hướng gia tăng $53,88 \pm 1,90\%$ nên số lượng tế bào còn lại trong chế phẩm có xu hướng giảm, các tế bào này cũng chuyển hóa cơ chất với lượng tương đương lần tái sử dụng thứ hai và thứ ba để cung cấp cho quá trình sinh tổng hợp L-lysine nhưng do số lượng tế bào còn lại trong chế phẩm có xu hướng giảm nên lượng L-lysine tạo ra có chiều hướng giảm và ở mức thấp nhất so với ba lần tái sử dụng trước và so với đối chứng 32g/L. Nguyên nhân làm cho tỷ lệ tế bào bị rửa trôi tăng dần và cao nhất ở lần tái sử dụng thứ tư là do trong khoảng thời gian tái sử dụng, chế phẩm cố định luôn chịu sự tác động của môi trường nuôi cấy: nhiệt độ, oxy, tốc độ khuấy đảo và thành phần của các chất trong môi trường làm cho cấu trúc gel của chất mang k-carrageenan kém bền, dễ bị vỡ nên làm tăng tỷ lệ tế bào bị rửa trôi,

giảm số lần tái sử dụng của chế phẩm cố định. Theo nguyên tắc, chế phẩm được sử dụng lại khi hoạt tính sản xuất L-lysine của vi khuẩn đảm bảo ổn định, lượng L-lysine thu được ở mỗi lần tái sử dụng không có sự sai khác nhiều so với đối chứng, tỷ lệ tế bào bị rửa trôi không vượt quá 50%. Căn cứ vào kết quả khảo sát, chúng tôi quyết định chỉ tính lượng L-lysine ở lần tái sử dụng thứ nhất, thứ hai, thứ ba vì ở ba lần tái sử dụng này hoạt tính sản xuất L-lysine của vi khuẩn còn tốt, cấu trúc chất mang tương đối vững chắc, mặc dù tỷ lệ tế bào bị rửa trôi vẫn có nhưng ở mức cho phép ta chấp nhận được. Còn ở lần tái sử dụng thứ tư, hoạt tính sản xuất L-lysine của sinh vật giảm mạnh, cấu trúc của chất mang đã bị phá hủy trên 50%. Cụ thể tỷ lệ tế bào bị rửa trôi ở lần tái sử dụng này cao khoảng $53,88 \pm 1,90\%$ dẫn đến số lượng vi khuẩn có mặt trong chất mang thấp. Kết quả lượng L-lysine sai khác nhiều so với đối chứng và ba lần tái sử dụng còn lại. Do đó, chúng tôi không tính lượng L-lysine thu được ở lần tái sử dụng thứ tư. Vậy chế phẩm tái sử dụng 3 lần để đảm bảo hoạt tính sinh vật không thay đổi so với ban đầu, lượng L-lysine thu được không có sự khác biệt so với đối chứng 32g/L. Khả năng tái sử dụng của chế phẩm cố định vẫn còn sau lần tái sử dụng thứ tư nhưng do giới hạn về thời gian nên chúng tôi sẽ đưa vào phần kiến nghị để tiếp tục theo dõi.

Kết quả khảo sát cho thấy lượng L-lysine qua ba lần tái sử dụng không có sự khác biệt nhiều so với đối chứng. Kết quả này được chúng tôi thể hiện hình 3.5



Hình 3.5. Đồ thị biểu diễn lượng L-lysine thu nhận từ quá trình lên men bởi chế phẩm cố định qua các lần tái sử dụng so với đối chứng (tế bào tự do)

Kết quả của nghiên cứu cho thấy lượng L-lysine trung bình sau ba lần tái sử dụng (31g/L) cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thúy Hương, Trần Thị Minh Tâm (2009), lượng L-lysine tạo ra 28g/L và của Ngô Nam Luân (2012) trên chất mang alginate là 28,08g/L.

Tóm lại: lượng L-lysine thu nhận từ quá trình lên men bởi chế phẩm cố định tương đương so với đối chứng. Qua ba lần tái sử dụng chế phẩm, lượng L-lysine thu được dao động trong khoảng $29,58 \pm 0,44$ g/L đến $32,74 \pm 0,18$ g/L. Lượng L-lysine cao nhất ở lần tái sử dụng thứ hai $32,74 \pm 0,18$ g/L và thấp nhất ở lần tái sử dụng thứ ba $29,58 \pm 0,44$ g/L.

3.3.1.2. So sánh lượng L-lysine thu được từ lên men sử dụng tế bào cố định và sử dụng tế bào tự do

Qua kết quả khảo sát, chúng tôi xác định không có sự khác biệt đáng kể về lượng L-lysine thu được từ lên men sử dụng tế bào tự do và sử dụng tế bào cố định. Kết quả được chúng tôi trình bày ở bảng 3.9

Bảng 3.9. So sánh lượng L-lysine thu được từ lên men sử dụng tế bào cố định và sử dụng tế bào tự do

Đối tượng	Thời gian lên men tái sử dụng (giờ)	Số lần tái sử dụng (lần)	Tổng số giờ lên men (giờ)	Tổng sản lượng L-lysine (g.L^{-1})	Sản lượng L-lysine trung bình (g.L^{-1})	Hiệu suất L-lysine ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Tế bào cố định trên k-carrageenan	32	3	96	93	31	0,969
Tế bào tự do	48	1	48	32	32	0,667

Kết quả phân tích (bảng 3.9) cho thấy: thời gian lên men tái sử dụng chế phẩm là 32 giờ ngắn hơn so với thời gian lên men ở tế bào tự do (48 giờ). Điều này có thể giải thích là do các tế bào trong chế phẩm cố định đã thích nghi với môi trường nên không qua giai đoạn pha lag ở mỗi lần tái sử dụng chế phẩm, dẫn đến thời gian lên men chế phẩm cố định sau mỗi lần tái sử dụng rút ngắn lại so với lên men ở tế bào tự do. Chế phẩm cố định có thể tái sử dụng ba lần với tổng thời gian lên men là 96 giờ trong khi đó tế bào tự do chỉ sử dụng 1 lần với thời gian 48 giờ. Do được tái sử dụng ba lần nên tổng lượng L-lysine đạt 93g/L. Nhưng lượng L-lysine trung bình thu được từ lên men tái sử dụng tế bào cố định (31g/L) thấp hơn tế bào tự do (32g/L) và sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê. Đặc biệt là hiệu suất L-lysine thu được từ lên men sử dụng tế bào cố định ($0,969 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) cao hơn tế bào tự do ($0,667 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Kết quả khảo sát đã cải thiện hiệu suất thu nhận L-lysine bằng giải pháp sử dụng kỹ thuật cố định chủng *C. glutamicum* trên chất mang k-carrageenan.

Việc sử dụng vi khuẩn cố định trên chất mang k-carrageenan còn đem lại nhiều ưu điểm như: bảo quản thuận lợi, giảm nhiễm các vi sinh vật từ ngoài vào vì phương pháp cố định tế bào có thể tái sử dụng cho chu kỳ lên men tiếp theo mà không cần tách chúng ra khỏi bình lên men. Phương pháp này, giúp hạn chế chi phí chuẩn bị giống. Vấn đề tiếp theo là chất mang có khả năng bảo vệ vi khuẩn tránh khỏi các tác động của môi trường và tái sử dụng ba lần. Tuy nhiên, lượng L-lysine thu nhận chưa được cải thiện nhiều do độ bền của chế phẩm cố định giảm dưới tác động của môi trường và thời gian nuôi cấy dẫn đến tỷ lệ tế bào rửa trôi cao.

3.3.2. Ảnh hưởng của các điều kiện bảo quản chế phẩm

3.3.2.1. Ảnh hưởng của dung môi bảo quản

Cấu trúc gel thay đổi dẫn đến sự biến đổi của mật độ tế bào trong chất mang khi tiến hành bảo quản chế phẩm. Cấu trúc của gel bền khi có mặt của một số ion kim loại kiềm, kiềm thổ theo thứ tự $\text{Ca}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ theo nghiên cứu của Ohashi và cs., (1990) [2, 30]. Do đó để bảo quản chế phẩm cố định, chúng tôi cần xác định được dung môi phù hợp để hạn chế đến mức thấp nhất tỷ lệ tế bào rửa trôi trong quá trình bảo quản chế phẩm cố định. Vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát bảo quản chế phẩm cố định trong các dung môi KCl, CaCl_2 , NaCl. Bên cạnh đó, chúng tôi nhận thấy gel của k-carrageenan khi bảo quản trong dung môi CaCl_2 cứng và dễ bị vỡ, khi bổ sung thêm ion K^+ gel rắn chắc và có độ đàn hồi. Nên dung môi CaCl_2/KCl được chúng tôi chọn để nghiên cứu tiếp theo. Tất cả các dung môi trên được chúng tôi khảo sát đồng thời với các tỷ lệ như sau: dung môi KCl 0,5-1,0% (w/v), dung môi NaCl 0,5 - 0,85 -1,0% (w/v), dung môi CaCl_2 0,5-1,0% (w/v) và hỗn hợp CaCl_2 với KCl với các tỷ lệ khác nhau như CaCl_2 0,5%: KCl 0,5% (w/v), CaCl_2 0,5%: KCl 1,0% (w/v), CaCl_2 1,0%: KCl 0,5% (w/v), CaCl_2 1,0%: KCl 1,0% (w/v) và mẫu đối chứng là dung môi nước cất đã vô trùng, để kiểm tra tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định sau 72 giờ.

Kết quả khảo sát chúng tôi thấy, tỷ lệ tế bào sống sót cao 98,72% (w/v) khi bảo quản chế phẩm cố định trong dung môi CaCl_2/KCl với tỷ lệ CaCl_2 0,5% : KCl 0,5% (w/v) và trong dung môi nước cất vô trùng tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm là thấp nhất 23,04% (w/v) (bảng 3.10).

Bảng 3.10. Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm ở các dung môi khác nhau

Thí nghiệm	Dung môi	Tỷ lệ tế bào sống sót (%)
1	Nước vô trùng	$23,04 \pm 0,17^a$
2	NaCl 0,5% (w/v)	$37,63 \pm 2,99^b$
3	NaCl 0,85% (w/v)	$39,24 \pm 2,19^b$
4	NaCl 1,0% (w/v)	$44,67 \pm 7,54^c$

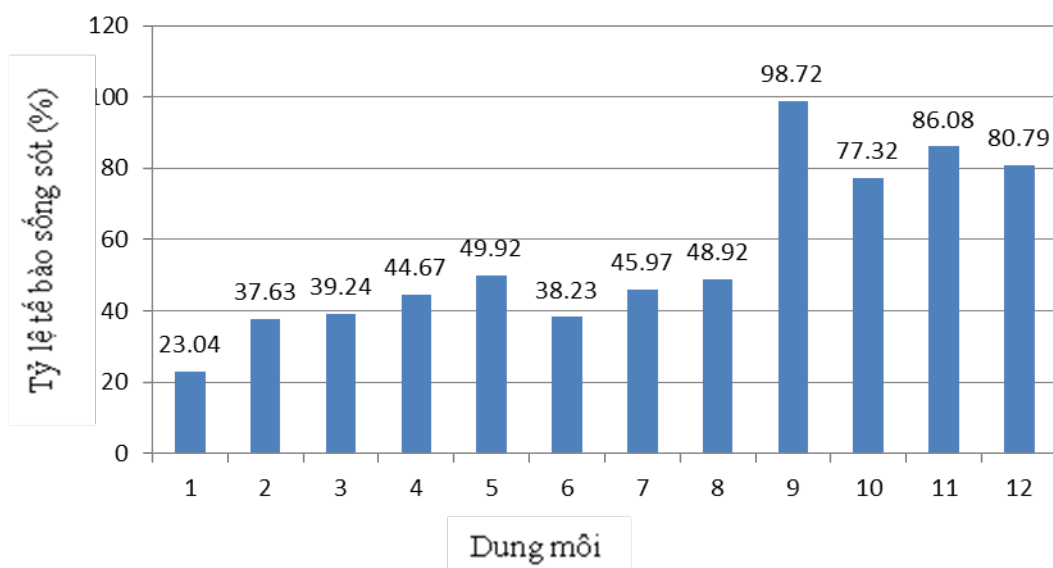
5	KCl 0,5% (w/v)	49,92 \pm 3,51 ^d
6	KCl 1,0% (w/v)	38,23 \pm 4,19 ^b
7	CaCl ₂ 0,5% (w/v)	45,97 \pm 3,83 ^c
8	CaCl ₂ 1,0% (w/v)	48,92 \pm 4,77 ^d
9	CaCl₂:KCl 0,5%:0,5% (w/v)	98,72 \pm 2,18^e
10	CaCl ₂ :KCl 0,5%:1,0% (w/v)	77,32 \pm 3,99 ^f
11	CaCl ₂ :KCl 1,0%:1,0% (w/v)	86,08 \pm 4,65 ^g
12	CaCl ₂ :KCl 1,0%:0,5% (w/v)	80,79 \pm 3,47 ^h

(Chú thích: a, b, c, d, e, f, g, h: thể hiện giá trị có sự khác nhau so với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$)

Tỷ lệ tế bào sống sót trong dung môi nước cất vô trùng là thấp so với bốn dung môi còn lại vì trong thành phần của nước cất vô trùng không có sự hiện diện của các ion kim loại kiềm và kiềm thổ nên khi bảo quản chế phẩm, những gốc tự do SO_3^- có trong cấu trúc của k-carrageenan tăng lên sinh ra lực đẩy tĩnh điện làm cấu trúc gel liên kết không chặt, kích thước lỗ gel to, tế bào dễ bị rửa trôi trong lúc bảo quản làm giảm tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm. Phân tích kết quả tỷ lệ tế bào sống sót trong bốn dung môi còn lại, chúng tôi có một số nhận xét sau:

Khi bảo quản chế phẩm trong ba dung môi NaCl, KCl, CaCl₂, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm khi bảo quản ở dung môi KCl là cao hơn so với hai dung môi còn lại. Tỷ lệ tế bào sống sót tăng từ 38,23% đến 49,92%. Kết quả này là do độ bền của gel tăng lên khi có mặt của ion K^+ , trong cơ chế tạo gel ion này sẽ kết hợp với gốc SO_3^- tự do trong cấu trúc của k-carrageenan, do đó làm giảm số lượng gốc SO_3^- tự do tạo điều kiện cho các phân tử carrageenan liên kết chặt với nhau (vì không còn chịu ảnh hưởng bởi lực đẩy tĩnh điện do gốc SO_3^- sinh ra) giữa các phân tử carrageenan, hình thành liên kết hydro làm tăng độ bền và chắc của cấu trúc gel. Tuy nhiên khi nồng độ KCl cao sẽ làm gel cứng và giòn ít đàn hồi nên gel dễ bị vỡ dưới tác động của thời gian bảo quản. Vì vậy ở nồng độ KCl 1,0%, tỷ lệ tế bào sống sót 38,23% còn nồng độ KCl 0,5%, tỷ lệ tế bào sống sót 49,92%. Bên cạnh dung môi KCl, khi bảo quản chế phẩm trong dung môi NaCl và CaCl₂ độ bền của gel giảm do ion Ca^{2+} làm

gel cứng và giòn, còn ion Na^+ làm gel mềm và co lại. Chính vì vậy, tỷ lệ tế bào còn lại trong chế phẩm khi bảo quản trong dung môi CaCl_2 thấp hơn dung môi KCl nhưng cao hơn so với dung môi NaCl (đồ thị 3.6).



Hình 3. 6. Đồ thị thể hiện tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định ở các dung môi khác nhau

Chú thích: (1): nước cất vô trùng; (2): NaCl 0,5% (w/v); (3): NaCl 0,85% (w/v); (4): NaCl 1,0% (w/v); (5): KCl 0,5% (w/v); (6): KCl 1,0% (w/v); (7): CaCl_2 0,5% (w/v); (8): CaCl_2 1,0% (w/v); (9): CaCl_2 :KCl 0,5%:0,5% (w/v); (10): CaCl_2 :KCl 0,5%:1,0% (w/v); (11): CaCl_2 :KCl 1,0%:1,0% (w/v); (12): CaCl_2 :KCl 1,0%:0,5% (w/v)

Tỷ lệ tế bào sống sót cao hơn, khi bảo quản chế phẩm trong dung môi CaCl_2/KCl với các tỷ lệ như đã bố trí. Trong đó, chúng tôi thấy tỷ lệ tế bào sống sót cao nhất là 98,72% khi bảo quản chế phẩm trong dung môi CaCl_2 0,5%: KCl 0,5% (w/v). Vì sự hiện diện đồng thời của hai ion Ca^{2+} trong muối CaCl_2 0,5% và ion K^+ trong muối KCl 0,5% làm cho gel k-carrageenan hình thành rắn chắc, có độ đàn hồi theo thời gian. Chính vì vậy, khi bảo quản chế phẩm trong dung môi CaCl_2 0,5%: KCl 0,5% (w/v), sẽ hạn chế tỷ lệ thoát bào làm cho tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm đạt cao nhất.

Cấu trúc gel bị thay đổi khi nồng độ một trong hai ion K^+ và Ca^{2+} cao hoặc cả hai đều cao do đó tỷ lệ tế bào sống sót giảm dần ở dung môi CaCl_2/KCl với các tỷ lệ còn

lại. Vì thế, chúng tôi chọn dung môi CaCl_2 0,5%: KCl 0,5% (w/v) để bảo quản chế phẩm cố định.

Kết quả dung môi phù hợp để tiến hành bảo quản chế phẩm cố định là CaCl_2 0,5% : KCl 0,5% (w/v), từ dung môi tìm được chúng tôi sẽ tiến hành khảo sát điều kiện ảnh hưởng tiếp theo đến quá trình bảo quản.

3.3.2.2. Ảnh hưởng của pH dung môi

Sự thay đổi của hàm lượng ion H^+ , OH^- dẫn đến sự thay đổi điện tích màng tế bào, khả năng thẩm thấu của màng đối với một số ion nhất định và gây ức chế hoạt động của một số enzym, ảnh hưởng đến khả năng chuyển hóa cơ chất và sự sinh trưởng, phát triển của tế bào trong chế phẩm cố định. Do đó để bảo quản chế phẩm cố định, chúng tôi cần xác định pH tối ưu nghĩa là ở mức pH này tỷ lệ tế bào sống sót là cao nhất. Vì lý do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát dung môi CaCl_2 0,5%: KCl 0,5% có pH ở các mức 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; và dùng dung dịch HCl 1N và NH_3 25% để điều chỉnh pH về các mức đã bố trí. Sau 72 giờ nuôi cấy, chúng tôi xác định được tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm tăng dần 54,24% - 98,78%. Khi dung môi bảo quản có pH dao động trong khoảng 5,0 - 8,0.

Bảng 3.11. Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định ở các mức pH khác nhau

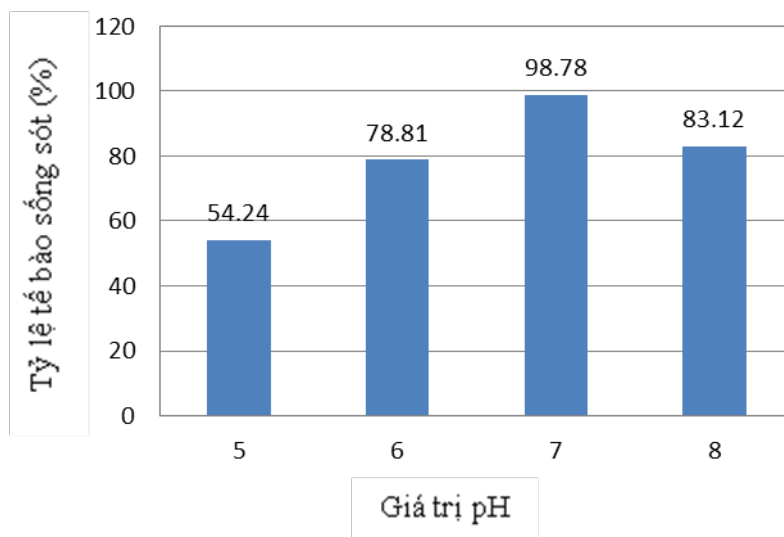
pH	5,0	6,0	7,0	8,0
Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm sau 72 giờ nuôi cấy (%)	54,24 \pm 2,27 ^a	78,81 \pm 2,38 ^b	98,78 \pm 0,56 ^c	83,12 \pm 1,2 ^b

(Chú thích: a, b, c: thể hiện giá trị có sự khác nhau so với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$)

Tỷ lệ tế bào sống sót cao nhất 98,78% khi dung môi bảo quản có (pH = 7,0), vì trong điều kiện pH=7,0 không xảy ra sự chênh lệch điện tích màng nên khả năng thẩm thấu các chất qua màng cũng như hoạt động của enzym diễn ra bình thường, không ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển tế bào trong chế phẩm dẫn đến tỷ lệ tế bào sống sót cao. Mặt khác, đây cũng là điều kiện rất thích hợp với đặc điểm sinh lý của vi khuẩn nên vi khuẩn phát triển rất tốt. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Trần Thị Minh Tâm (2009), tác giả đã khảo sát sự ảnh hưởng của các mức pH khác nhau đến mật độ tế bào trong môi trường nuôi cấy. Kết quả pH=7,0 cho mật độ tế bào cao so với các mức pH khác.

Tỷ lệ tế bào sống sót thấp nhất 54,24% khi môi trường lên men càng có nhiều ion H^+ (pH=5,0), điều này có thể giải thích do sự có mặt càng nhiều của ion H^+ dẫn đến sự chênh lệch điện tích màng, ức chế hoạt động của một số enzym chuyển hóa cơ chất làm thay đổi khả năng thẩm thấu các chất qua màng, gây khó khăn trong quá trình trao đổi chất và tác động lớn đến sự sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn.

Tỷ lệ tế bào sống sót 83,12% khi pH=8,0, tỷ lệ này cao hơn so với pH dao động trong khoảng 5,0-6,0, nhưng thấp hơn so với pH=7,0, điều này có thể giải thích do ở mức pH = 8,0, môi trường không có nhiều ion H^+ , nên hoạt động của enzym, khả năng thẩm thấu các chất qua màng không bị ảnh hưởng nhiều, thêm vào đó vi khuẩn có thể sinh trưởng và phát triển được ở pH=8,5 nên trong trường hợp này tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định vẫn ở mức cao. Đồ thị tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm ở các mức pH khác nhau thể hiện như sau:



Hình 3.7. Đồ thị thể hiện tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm ở các mức pH khác nhau

Kết quả khi bảo quản chế phẩm trong dung môi (CaCl_2 0,5% : KCl 0,5%) ở mức $\text{pH} = 7,0$, tỷ lệ tế bào còn lại trong chế phẩm là cao nhất. Căn cứ vào kết quả này, chúng tôi tiếp tục tiến hành khảo sát yếu tố ảnh hưởng tiếp theo.

3.3.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản

Nhiệt độ bảo quản cũng ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định. Để biết được ở nhiệt độ bảo quản nào tế bào trong chế phẩm cố định có tỷ lệ sống sót cao, chúng tôi tiến hành thí nghiệm khảo sát bảo quản chế phẩm cố định ở nhiệt độ 0°C , 4°C , nhiệt độ phòng (30°C đến 32°C), với mục đích là xác định tỷ lệ tế bào sống sót sau 72h trong dung môi CaCl_2 0,5% : KCl 0,5% (w/v) ở điều kiện pH của dung môi là 7,0.

Kết quả phân tích (bảng 3.12), tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm dao động trong khoảng $54,37 \pm 1,53\%$ đến $98,66 \pm 1,06\%$.

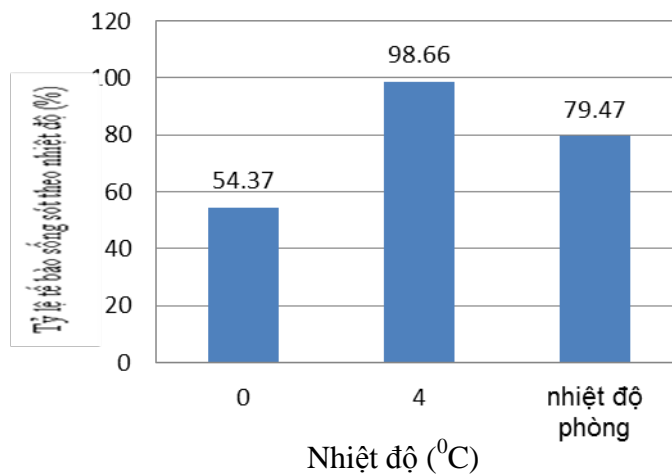
Bảng 3.12. Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm ở các mức nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)	0°C	4°C	30°C
-------------------------------	-------------------	-------------------	--------------------

Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm sau 72 giờ nuôi cấy (%)	$54,37 \pm 1,53^a$	$98,66 \pm 1,06^b$	$79,47 \pm 1,80^c$
--	--------------------	--------------------	--------------------

(Chú thích: a, b, c: thể hiện giá trị có sự khác nhau so với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$)

Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định thấp nhất $54,37 \pm 1,53\%$ ở nhiệt độ bảo quản 0°C . Nguyên nhân là do dung môi bảo quản CaCl_2/KCl với tỷ lệ (CaCl_2 : KCl 0,5%: 0,5%) không phải là chất bảo vệ chế phẩm cố định nên khi bảo quản chế phẩm ở nhiệt độ 0°C , tế bào bên trong chế phẩm có thể ở dạng tinh thể đá và chết làm cho mật độ tế bào trong chế phẩm giảm sau 72 giờ nuôi cấy. Ở nhiệt độ phòng (30°C đến 32°C) tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định sau 72 giờ nuôi cấy $79,47 \pm 1,80\%$ nguyên nhân là do: đây là nhiệt độ rất phù hợp với đặc điểm sinh lý của vi khuẩn nên vi khuẩn phát triển tốt, quá trình trao đổi chất diễn ra mạnh dẫn đến cạnh tranh về dinh dưỡng và sự định vị. Do đó làm mật độ tế bào trong chế phẩm cố định giảm. Hơn nữa, đây cũng là nhiệt độ rất thích hợp cho hoạt động của nhiều vi sinh vật có hại, những vi sinh vật này có thể làm mẫu bảo quản bị nhiễm. Chính những lí do trên, làm cho mật độ tế bào trong chế phẩm cố định giảm ở mức $79,47 \pm 1,80\%$. Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cao nhất $98,66 \pm 1,06\%$ ở nhiệt độ bảo quản 4°C vì ở mức nhiệt độ này hoạt động của enzym cũng như mọi hoạt động khác trong tế bào vẫn diễn ra nhưng với tốc độ chậm. Hơn nữa, nhiệt độ 4°C là nhiệt độ phù hợp để bảo quản giống và còn hạn chế sự xâm nhập của các vi sinh vật có hại, cấu trúc của gel rắn chắc hơn. Kết quả tỷ lệ tế bào sống sót cao ở nhiệt độ 4°C .



Hình 3.8. Đồ thị tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm ở các mức nhiệt độ khác nhau

Kết quả này là cơ sở để chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định.

3.3.2.4. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản

Chế phẩm khi tạo ra phải có chất lượng và bảo quản được trong thời gian dài. Để tìm hiểu khoảng thời gian nào là thích hợp cho việc bảo quản chế phẩm *C. glutamicum* trên chất mang k- carrageenan, chúng tôi tiến hành khảo sát tiếp thí nghiệm bảo quản chế phẩm này trong các điều kiện tối ưu đã nêu ở trên và bố trí ở các thời điểm (7, 10, 14, 30, 60) ngày bảo quản, để xác định tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định. Kết quả thể hiện ở bảng 3.13.

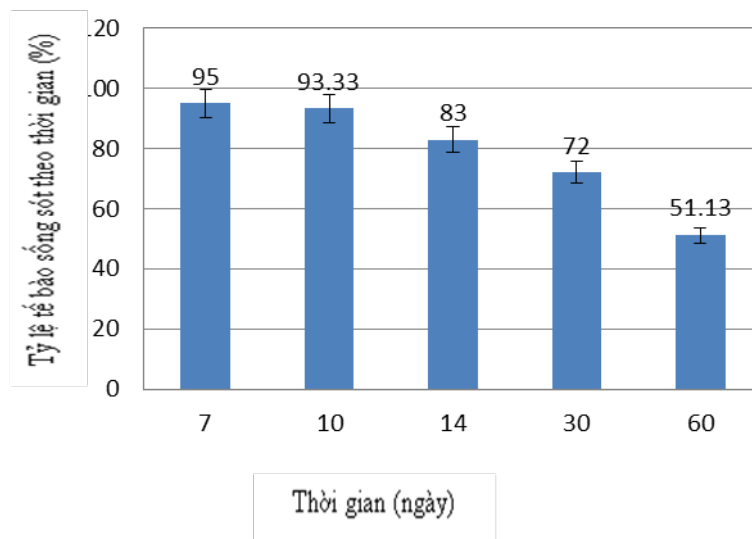
Bảng 3.13. Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cố định theo thời gian

Thời gian bảo quản (ngày)	7 ngày	10 ngày	14 ngày	30 ngày	60 ngày
Tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm sau khoảng thời gian bảo quản (%)	95 ±1,00 ^a	93,33±0,58 ^b	83,00±1,00 ^c	72±1,00 ^d	51,13±1,53 ^e

(Chú thích: a, b, c, d, e: thể hiện giá trị có sự khác nhau so với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$)

Tỷ lệ tế bào sống sót dao động trong khoảng $95 \pm 1,00\%$ đến $51,13 \pm 1,53\%$ khi bảo quản chế phẩm từ 7 ngày đến 60 ngày. Tỷ lệ tế bào sống sót cao nhất khi bảo quản chế phẩm được 7 ngày $95 \pm 1,00\%$, tỷ lệ tế bào rửa trôi (chết) là 5%, tức là trong thời gian này cấu trúc gel bao bọc bên ngoài vi khuẩn vẫn chắc nên số lượng tế bào bị rửa trôi ít và đây cũng là giai đoạn đầu khi bảo quản chế phẩm nên hạn chế sự cạnh tranh về chất dinh dưỡng, không gian trong chất mang, làm cho số tế bào chết giảm.

Từ bảng kết quả trên chúng tôi biểu diễn tỷ lệ tế bào sống sót theo thời gian như sau: thời gian bảo quản càng kéo dài thì tỷ lệ tế bào sống sót có xu hướng giảm tức tỷ lệ tế bào bị rửa trôi (chết) có xu hướng tăng theo thời gian. Đặc biệt khi thời gian bảo quản chế phẩm là 60 ngày thì tỷ lệ tế bào còn lại trong chế phẩm đạt $51,13 \pm 1,53\%$. Lí do là dưới tác động của điều kiện bảo quản cũng như sự thay đổi của các thành phần trong dung môi bảo quản, làm cấu trúc gel lỏng lẻo dần, số lượng tế bào bị rửa trôi cao.



Hình 3.9. Đồ thị tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm theo thời gian

Thêm vào đó, sự cạn kiệt chất dinh dưỡng diễn ra sự cạnh tranh nên tỷ lệ tế bào chết cao ở giai đoạn này. Mặt khác, trong thời gian bảo quản hoạt động trao đổi chất của vi khuẩn vẫn diễn ra bên trong chất mang nhưng với tốc độ chậm, kết quả của hoạt

động này làm cho pH dung môi bảo quản thay đổi, xuất hiện nhiều ion H^+ làm thay đổi tính thấm của màng gây ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn.

Song song với điều kiện bảo quản chế phẩm, thời gian bảo quản chế phẩm cũng là yếu tố ảnh hưởng lớn đến mật độ tế bào trong chế phẩm. Trong nghiên cứu này, điều kiện bảo quản chế phẩm tốt nhất là ngâm chế phẩm trong dung môi $CaCl_2$ 0,5% : KCl 0,5% (w/v), với pH của dung môi 7,0 và nhiệt độ bảo quản $4^{\circ}C$, chúng tôi xác định cần bảo quản chế phẩm trong vòng 7 - 10 ngày để tỷ lệ tế bào trong chế phẩm đạt mức cao nhất, tức hoạt tính của chế phẩm vẫn được đảm bảo. Kết quả này so với nghiên cứu của Nguyễn Thúy Hương và Trần Thị Minh Tâm (2014), khi bảo quản chế phẩm cố định trên chất mang Bacterial cellulose (BC) trong dung môi nước vô trùng, pH của dung môi 7,0 và nhiệt độ bảo quản $4^{\circ}C$ thì tỷ lệ tế bào trong chế phẩm đạt 100% trong 10 ngày đầu bảo quản. Ngày thứ 20, 30, 60 tương ứng là 90%, 80% sau cùng là 50% [40]. Điều này có nghĩa là cấu trúc gel của k-carrageenan kém bền theo thời gian so với chất mang Bacterial cellulose (BC). Để nâng cao độ bền của chất mang cũng như kéo dài thời gian bảo quản chế phẩm chúng ta cần cải tiến cấu trúc gel của chất mang k-carrageenan hoặc sử dụng phức chất mang để khắc phục tính kém bền của cấu trúc gel k-carrageenan.

Qua kết quả khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện bảo quản đến tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm, cho thấy tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm đạt tối đa khi chế phẩm được bảo quản trong dung môi $CaCl_2/KCl$ với tỷ lệ $CaCl_2$ 0,5% : KCl 0,5% (w/v); pH của dung môi là 7,0 và nhiệt độ bảo quản là $4^{\circ}C$. Ở điều kiện này, chúng ta có thể bảo quản chế phẩm cố định 60 ngày với tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm 51,13%. Tỷ lệ tế bào sống sót đạt 83% khi bảo quản chế phẩm cố định trong khoảng 14 ngày. Kết quả khảo sát giúp người sử dụng chế phẩm bảo quản có thể xác định được lượng chế phẩm cần bổ sung để đảm bảo tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cao nhất nhằm đáp ứng cho mục đích nghiên cứu.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm, chúng tôi đã xác định được các yếu tố không ảnh hưởng đến hiệu suất cố định tế bào như: khối lượng chất mang, nhiệt độ hình thành gel, thời gian hình thành gel, tốc độ lắng, thời gian rắn gel, các yếu tố này được giữ ở mức giá trị trung tâm. Đồng thời, chúng tôi cũng tìm ra được thông số tối ưu của hai yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất cố định khảo sát là: giống bổ sung vào 58,58 triệu tế bào/mL và nồng độ KCl 0,58 mol/L, hiệu suất cố định đạt 91,6%.

Thử nghiệm tạo chế phẩm k-carrageenan và sử dụng chế phẩm này để lên men thu nhận L-lysine. Kết quả thu đượg L-lysine dao động khoảng $29,58 \pm 0,44$ g/L đến $32,74 \pm 0,18$ g/L trong ba lần tái sử dụng. Đặc biệt là hiệu suất L-lysine thu được từ lên men sử dụng tế bào cố định ($0,969 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) cao hơn tế bào tự do ($0,667 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Kết quả khảo sát đã cải thiện hiệu suất thu nhận L-lysine bằng giải pháp sử dụng kỹ thuật cố định chủng *C. glutamicum* trên chất mang k-carrageenan.

Khảo sát các điều kiện bảo quản ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm: trong điều kiện dung môi CaCl_2/KCl với CaCl_2 0,5%: KCl 0,5% (w/v), pH của dung môi CaCl_2/KCl là 7,0 và nhiệt độ bảo quản 4°C , thì thời gian bảo quản chế phẩm là 60 ngày với tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm đạt 51,13%. Tỷ lệ tế bào sống sót đạt 83% khi bảo quản chế phẩm cố định trong khoảng 14 ngày. Kết quả khảo sát giúp người sử dụng chế phẩm bảo quản có thể xác định được lượng chế phẩm cần bổ sung, để đảm bảo tỷ lệ tế bào sống sót trong chế phẩm cao nhất nhằm đáp ứng cho mục đích nghiên cứu.

KIẾN NGHỊ

- Khảo sát khả năng tái tạo cấu trúc của chế phẩm cố định khi ngâm chế phẩm trong dung môi CaCl_2/KCl sau mỗi chu kỳ lên men so với không ngâm chế phẩm trong dung môi CaCl_2/KCl .

- Để giảm tỷ lệ thoát bào cần kết hợp với các phức chất mang khác.

- Lặp lại thí nghiệm và tiếp tục tái sử dụng chế phẩm ở các lần tiếp theo để xác định rõ hơn về tỷ lệ tế bào rửa trôi và số lần tái sử dụng chế phẩm.
- Phục hồi lại chế phẩm.
- Sử dụng chế phẩm bảo quản để lên men thu nhận L-lysine và đánh giá chất lượng của chế phẩm cố định.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

Tam Thi Minh Tran, Suong Thi Hong Nguyen, Huong Thuy Nguyen, "*Determination of Immobilization Process Parameters of Corynebacterium glutamicum on Kappa carrageenan, Its Application in L-lysine Fermentation and The Investigation Into Its Storage Conditions*" Vol. 4 - Issue 11 (November - 2014), International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA) , ISSN: 2248-9622, www.ijera.com

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng việt

1. Nguyễn Thùy Châu (2007), *Nghiên cứu áp dụng công nghệ vi sinh hiện đại để sản xuất chế phẩm acid amin và enzym từ nguồn thứ phẩm nông nghiệp và hải sản ở quy mô bán công nghiệp*, Hà nội, tr.154 -165.
2. Nguyễn Bích Thủy và cs., (2005), *Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo gel của k-Carrageenan từ rong Hồng Vân (Eucheuma gelatinae) Việt Nam*, Tạp chí Hóa học, T.43(2), tr. 184 - 187.
3. Nguyễn Thị Thu Vân và cs., (2006), *Thí nghiệm phân tích định lượng*, Nxb Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
4. Nguyễn Đức Lượng (2003), *Thí nghiệm công nghệ sinh học*, T.1, Nxb Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
5. Nguyễn Đức Lượng (2006), *Vi sinh vật công nghiệp*, Nxb Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
6. Nguyễn Đức Lượng và cs., (2006), *Thí nghiệm công nghệ sinh học T.2*, Nxb Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
7. Phạm Hồng Hải và cs., (2007), *Một số ứng dụng của Carrageenan và khả năng sử dụng k-carrageenan từ rong biển Việt Nam trong bảo quản chế biến thực phẩm*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, T.45 (4), tr 87 - 93.
8. Lương Đức Phẩm (2004), *Công nghệ vi sinh vật*, Nxb Nông Nghiệp
9. Nguyễn Thúy Hương, Bùi Thị Thanh Hương (2008), *Nghiên cứu điều kiện cố định nấm men *Saccharomyces cerevisiae* N28 bằng chất mang cellulose vi khuẩn và bước đầu ứng dụng trong lên men rượu vang*, Tạp chí Công nghệ sinh học, 6 (3), tr. 383 - 389.
10. Nguyễn Thúy Hương, Thái Trinh Thượng Trí (2010), *Cố định vi khuẩn *Oenococcus oeni* bằng phức chất mang alginate - bacterial cellulose để ứng dụng lên men*

malolactic, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, (26), tr. 217 - 223.

11. Nguyễn Thúy Hương, Trần Thị Minh Tâm (2009), *Ứng dụng vi khuẩn Corynebacterium sp. cố định trong lên men thu nhận lysine*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ các trường Đại học kỹ thuật, (70), tr. 96 - 100.
12. Nguyễn Thúy Hương, Trần Thị Tường An (2008), *Thu nhận Bacteriocin bằng phương pháp lên men bởi tế bào Lactococcus lactic cố định trên chất mang cellulose vi khuẩn (BC) và ứng dụng trong bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu*, Nxb Đại học Quốc gia Tp. HCM, T.11 (9), tr. 100 - 109.
13. Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thúy Hương (2009), *Tối ưu quá trình lên men thu nhận amino acid L-lysine từ vi khuẩn Corynebacterium glutamicum VTCC-B-656*, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, (25), tr.172 - 178.

Tiếng nước ngoài

14. Bickerstaff Jr Gordon F (1997), *Immobilization of enzymes and cells*, Springer.
15. Chi Meng-Chun, et al. (2008), Characterization of Bacillus kaustophilus leucine aminopeptidase immobilized in Ca-alginate/k-carrageenan beads, *Biochemical Engineering Journal*, 39(2), pp. 376-382.
16. Dolui Ashoke Kumar, Sahana, Sitikantha, and Kumar, Atul (2012), Studies on Production of 6-Aminopenicillanic Acid by Free and κ -Carrageenan Immobilized Soil Bacteria, *Ind J Pharm Edu Res*, 46(1), pp. 71.
17. Eggeling Lothar and Bott, Michael (2010), *Handbook of Corynebacterium glutamicum*, CRC press.
18. Elnashar Magdy M, et al. (2014), Optimal Immobilization of β -Galactosidase onto κ -Carrageenan Gel Beads Using Response Surface Methodology and Its Applications, *The Scientific World Journal*, 2014.

19. Elnashar Magdy MM, et al. (2014), Application of Plackett–Burman screening design to the modeling of grafted alginate–carrageenan beads for the immobilization of penicillin G acylase, *Journal of Applied Polymer Science*, 131(11).
20. Guisan Jose M (2006), *Immobilization of enzymes and cells*, T. 22, Springer.
21. Hung Chih-Peng, et al. (2008), Immobilization of *Escherichia coli* novablue γ -glutamyltranspeptidase in Ca-alginate-k-carrageenan beads, *Applied biochemistry and biotechnology*, 150(2), pp. 157-170.
22. Kourkoutas Y, et al. (2004), Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, *Food Microbiology*, 21(4), pp. 377-397.
23. Kumar SK Praveen and Mulimani, VH (2011), Immobilization of *Aspergillus oryzae* with κ -carrageenan for soybean oligosaccharide hydrolysis, *Food Science and Biotechnology*, 20(6), pp. 1691-1697.
24. Makas Y Gizem, et al. (2010), Immobilization of laccase in κ -carrageenan based semi-interpenetrating polymer networks, *Journal of biotechnology*, 148(4), pp. 216-220.
25. Pfefferle Walter Mockel Bettina, Bathe Brigitte, Marx Achim (2003), *Biotechnological manufacture of lysine*, *Adv. Biochem, Biotechnol*, pp. 60 -112.
26. Yee Lachlan H, et al. (2007), Inhibition of fouling by marine bacteria immobilised in κ -carrageenan beads, *Biofouling*, 23(4), pp. 287-294.
27. Anastassiadis Savas (2007), L-Lysine fermentation, *Recent patents on Biotechnology*, 1(1), pp. 11-24.
28. Ikeda Masato (2003), *Amino acid production processes*, in *Microbial production of l-amino acids*, Springer, pp. 1-35.
29. Kiefer Patrick, et al. (2004), Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose, *Applied and environmental microbiology*, 70(1), pp. 229-239.

30. Montero P and Pérez-Mateos, Miriam (2002), Effects of Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ on gels formed from fish mince containing a carrageenan or alginate, *Food Hydrocolloids*, 16(4), pp. 375-385.
31. Ramli Nur Aainaa Syahirah and Amin, Nor Aishah Saidina (2014), Fe/HY zeolite as an effective catalyst for levulinic acid production from glucose: Characterization and catalytic performance, *Applied Catalysis B: Environmental*.
32. Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thúy Hương (2009), Optimization of production of L-lysine through fermentation of *Corynebacterium glutamicum*, *Hội nghị Khoa học và Công nghệ lần thứ 11*, pp. 13-18.
33. Amin Faiza, et al. (2013), Utilization of wheat bran for enhanced production of exo-polygalacturonase by *Penicillium notatum* using response surface methodology, *Pak J Agri Sci*, 50(3), pp. 469-477.
34. BRÖER Stefan and KRÄMER, Reinhard (1991), Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*, *European Journal of Biochemistry*, 202(1), pp. 137-143.
35. Georgi Tobias, Rittmann, Doris, and Wendisch, Volker F (2005), Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: Roles of malic enzyme and fructose-1, 6-bisphosphatase, *Metabolic engineering*, 7(4), pp. 291-301.
36. Górecka Elżbieta and Jastrzębska, Magdalena (2011), Immobilization techniques and biopolymer carriers, *Biotechnology and Food Science*, 75(1), pp. 65-86.
37. Hermann Thomas (2003), Industrial production of amino acids by *coryneform bacteria*, *Journal of biotechnology*, 104(1), pp. 155-172.
38. Hsieh Chung-Lung, Hsiung, Kuang-Pin, and Su, Jong-Ching (1995), Determination of lysine with ninhydrin-ferric reagent, *Analytical biochemistry*, 224(1), pp. 187-189.
39. Shah Abdul Haleem, Hameed, Abdul, and Khan, Gul Majid (2002), Fermentative production of L-Lysine: Bacterial fermentation, *J. Med. Sci*, 2(3), pp. 152-157.

40. Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thúy Hương (2014), Optimization of *Corynebacterium glutamicum* immobilization process on bacterial cellulose carrier and its application for lysine fermentation, IOSR Journal of Engineering, 4 (07), pp.33 - 38.
41. Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thúy Hương (2009), Production of L-lysine by fermentation in Fermentor, *Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc - khu vực phía nam*, pp. 124.
42. Wittmann Christoph and Becker, Judith (2007), *The L-lysine story: from metabolic pathways to industrial production*, in *Amino Acid Biosynthesis Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*, Springer, pp. 39-70.

Internet

43. [http://chemistry. about. com/od/factsstructure/ig/Chemical - Structure--\(25/3/2014\).](http://chemistry.about.com/od/factsstructure/ig/Chemical-Structure--(25/3/2014).)

PHỤ LỤC 1. CÁCH DỰNG ĐƯỜNG CHUẨN L-LYSINE

Chuẩn bị mẫu phân tích L-lysine theo bảng bố trí sau:

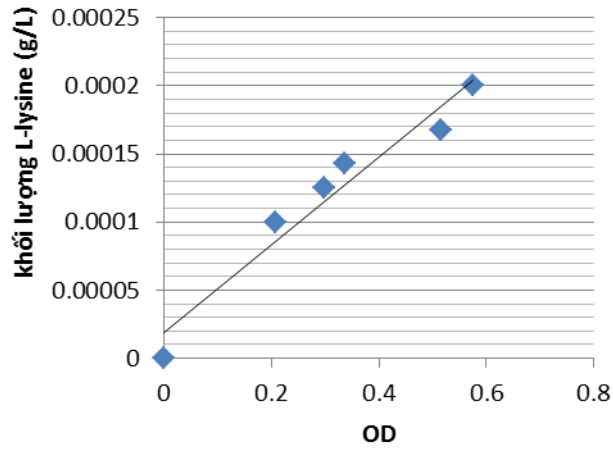
Khối lượng (g/L)	Mẫu kiểm tra	Nước (mL)	Kí hiệu
50	2g Lysine	40	A
40	8mL A	2	B
30	6mL A	4	C
25	5mL A	5	D
20	4mL A	6	E
15	3mL A	7	F
10	2mL A	8	G
5	1mL A	9	H
0	0 mL A	10	I

Chú thích: A, B, C, D, E, F, G, H, I lần lượt là kí hiệu tên các mẫu ứng với khối lượng được bố trí trong bảng

Hút 20 μ L mẫu trộn hoàn toàn với 0,66mL của dung dịch A và 0,37mL dung dịch B. Trộn ở nhiệt độ 100⁰C khoảng 20 phút, sau đó làm lạnh dưới vòi nước. Tiếp theo bổ sung 4mL DMSO (Dimethyl sulfoxide), 6mL nước cất và vortex mẫu. Mẫu đối chứng cách làm tương tự nhưng thay mẫu bằng nước cất 2 lần. Dem mẫu đo ở bước sóng 470nm. Xây dựng đường chuẩn và xác định hàm số $y = f(x)$, với y là OD 470nm, x là khối lượng L-lysine (g/L).

L- lysine

$$y = 0.455x + 0,039$$
$$R^2 = 0.947922$$



PHỤ LỤC 2. CÁCH DỰNG ĐƯỜNG CHUẨN ĐƯỜNG KHỬ

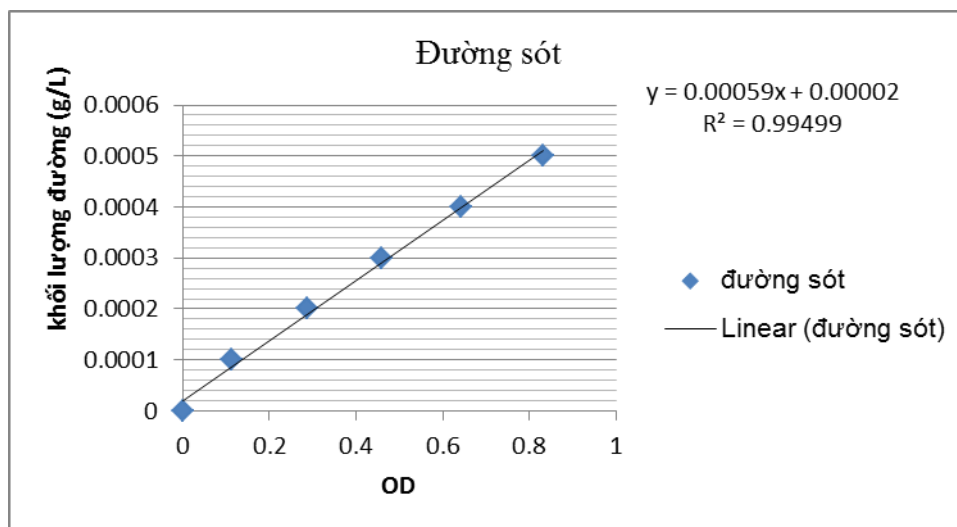
Pha chế dung dịch

Cho 300g muối sodium potassium tartrate pha trong 500 mL nước cất được dung dịch A. Tiếp đó cân 10g DNS pha trong 200mL NaOH 2N. Trộn A và B đồng thời bổ sung thêm nước cất cho vừa đủ 1 lít.

Dựng đồ thị đường chuẩn glucose

Cân 1g D-glucose pha trong 200mL nước cất gọi dung dịch tạo thành là dung dịch A.

Lần lượt định mức 50mL nước cất vào 5 bình bi đánh số theo thứ tự từ 1-5. Sau đó bổ sung lần lượt 1mL, 2mL, 3mL, 4mL, 5mL từ dung dịch A vào các bình được đánh số theo thứ tự. Cuối cùng là lắc đều mẫu và lấy 3mL từ mỗi bình bi cho vào 5 ống nghiệm bổ sung thêm 1mL DNS, vortex và bịt kín mẫu đem đun 100°C với thời gian 5 phút. Sau đó làm lạnh tới ở nhiệt độ phòng. Mẫu đối chứng cách làm cũng tương tự nhưng thay mẫu bằng nước cất hai lần. Tiến hành đo độ hấp phụ màu ở bước sóng 560nm. Xây dựng đường chuẩn và xác định hàm số $y = f(x)$, với y là OD 560nm, x là khối lượng đường (g/L).



**PHỤ LỤC 3. SỰ THAY ĐỔI ĐƯỜNG, L-LYSINE, MẬT ĐỘ TẾ BÀO THEO
THỜI GIAN LÊN MEN Ở TẾ BÀO TỰ DO**

Thời gian (h)	Đường (g/L)	L- lysine (g/L)	Mật độ tế bào (Tế bào /mL)	Mật độ tế bào (tỷ tế bào /L)
0	59,1	5	460,000	0,46
2	57,2	6	870,000	0,87
4	55,4	11	1,505,000	1,505
5	52,0	13	2,100,000	2,1
6	510	15	5,900,000	5,9
8	48,7	16	19,100,000	19,1
12	47,6	19	48,000,000	48
16	43,3	22	226,000,000	226
20	31,3	26	1,380,000,000	1,380
24	25,5	30	1,300,000,000	1,300
28	19,9	31	1,280,000,000	1,280
32	16,8	32	1,320,000,000	1,320
36	15,2	33	x	x
40	15,0	33,5	x	x
44	12,7	33,8	x	x
48	10,9	34	320,000,000	320

x: bị nhiễm

PHỤ LỤC 4. ĐÁNH GIÁ SỰ RỬA TRÔI CHẾ PHẨM CỐ ĐỊNH

Số lần tái sử dụng	Tỷ lệ tế bào bị rửa trôi (%)					Giá trị trung bình
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	
1	12,89	14,78	12,62	13,14	12,30	13,15±2,01 ^a
2	25,62	29,93	32,08	29,93	29,39	29,39 ±1,05 ^b
3	35,92	31,50	37,03	46,42	37,72	37,72 ±2,43 ^c
4	50,58	57,17	x	x	53,88	53,88 ±1,90

x: Không tiếp tục tái sử dụng

PHỤ LỤC 5. ĐÁNH GIÁ SẢN PHẨM LÊN MEN CỦA CHẾ PHẨM CỐ ĐỊNH

Số lần tái sử dụng	Pha loãng (lần)	OD		
		Lần 1	Lần 2	Lần 3
1	150	0,364	0,369	0,37
2	150	0,397	0,393	0,392
3	150	0,347	0,349	0,347
4	150	0,258	0,256	0,257

Số lần tái sử dụng	Lượng L-lysine (g/L)			
	Lần1	Lần 2	Lần 3	Giá trị trung bình
1	30,693	31,03425	31,1025	30,94 \pm 0,22 ^a
2	32,94525	32,67225	32,604	32,74 \pm 0,18 ^a
3	29,53275	29,66925	29,53275	29,58 \pm 0,44 ^a
4	23,4585	23,322	23,39025	23,39 \pm 0,36 ^b

(Chú thích: a, b: kí hiệu khác thể hiện giá trị có sự khác nhau so với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$)

**PHỤ LỤC 6. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SỬ DỤNG CƠ CHẤT CỦA CHẾ PHẨM
CỐ ĐỊNH**

Số lần tái sử dụng	Lượng đường còn lại (g/L)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Giá trị trung bình
1	10,26	10,2	10,26	10,24 \pm 0,03 ^a
2	14,94	14,28	13,5	14,24 \pm 0,72 ^b
3	14,76	14,7	14,64	14,7 \pm 0,06 ^b
4	14,76	14,82	14,64	14,74 \pm 0,09 ^b

Số lần tái sử dụng	Đường sử dụng (g/L)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Giá trị trung bình
1	39,74	39,8	39,74	39,76 \pm 0,03 ^a
2	35,06	35,72	36,5	35,76 \pm 0,72 ^b
3	35,24	35,3	35,36	35,3 \pm 0,06 ^b
4	35,24	35,18	35,36	35,3 \pm 0,09 ^b

(Chú thích: a, b: kí hiệu khác thể hiện giá trị có sự khác nhau so với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$)

PHỤ LỤC 7. HÌNH ẢNH CỦA CHẾ PHẨM CỐ ĐỊNH

