

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH LÊN MEN TẠO MÀNG MỎNG CELLULOSE VI KHUẨN CÓ ĐỘ BỀN KÉO CAO

Nguyễn Thị Thu Hằng*, Nguyễn Thúy Hương

Bộ môn Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Bách khoa – ĐHQG TP HCM

Ngày nhận bài: 24-3-2017; ngày nhận bài sửa: 18-5-2017; ngày duyệt đăng: 20-12-2017

TÓM TẮT

Từ 5 chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng cellulose, chúng tôi đã chọn được chủng *Gluconacetobacter intermedius* cho màng cellulose vi khuẩn (BC) có độ bền kéo cao nhất. *G. intermedius* được tối ưu hóa quá trình nuôi cấy thu màng mỏng BC có độ bền kéo cực đại. Tiến hành thí nghiệm tối ưu theo thiết kế bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) – phương án cấu trúc có tâm (CCD) đã tìm được giá trị tối ưu của 4 yếu tố dinh dưỡng: Nước dừa già 89,2%, khoáng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,07%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,34% và glucose 5,2%, cho màng mỏng BC có độ bền kéo cực đại theo mô hình 32,3291Gpa. Thử nghiệm nuôi cấy với điều kiện của mô hình thu được màng BC đạt độ bền kéo 32,515Gpa.

Từ khóa: Bacterial cellulose, *Gluconacetobacter intermedius*, Plackett-Burman, RSM-CCD.

ABSTRACT

Optimization of fermentation process to achieve bacterial cellulose membrane with high tensile strength

Gluconacetobacter intermedius strain producing bacterial cellulose (BC) membrane with highest tensile strength was selected from 5 bacterial strains are capable of producing cellulose. *G. intermedius* has been optimized of ferment to obtain a thin film BC with maximum tensile strength. Response surface methodology – Central composite design was used to investigate the effects of four nutrition factor on tensile strength of thin film BC. The results show that: concentration of coconut water was 89,2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,07%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,34% and glucose 5,2% for thin film BC with maximum tensile strength of the model is 32,3291Gpa. The culture experiment with the conditions of the model obtained thin film BC has tensile strength of 32,515Gpa.

Keywords: Bacterial cellulose, *Gluconacetobacter intermedius*, Plackett-Burman, RSM-CCD.

1. Mở đầu

Cellulose vi khuẩn (BC) là một loại cellulose được tổng hợp bởi vi sinh vật, trong đó *Gluconacetobacter* là chủng nổi bật cho khả năng tổng hợp BC với năng suất cao và ổn định. Mặc dù, có cùng công thức phân tử với cellulose thực vật $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$, nhưng BC có thêm các tính chất cơ lí đặc trưng nổi bật như: Có khả năng tạo màng mỏng, độ kết tinh cao, hấp thụ và giữ nước tốt, cường độ kéo cao và tính tương thích sinh học tốt... Do đặc tính và cấu

* Email: hangnguyen9228@gmail.com

trúc độc đáo của nó, cellulose vi khuẩn có nhiều ứng dụng quan trọng trong nhiều lĩnh vực công nghiệp, thực phẩm, y học... [1,2].

Tùy thuộc vào mục đích sử dụng mà màng BC tạo thành cần được nâng cao các đặc tính phù hợp. Trong đó, độ bền cơ học của màng mỏng BC là một trong những chỉ tiêu chất lượng quan trọng để đưa màng vào hầu hết các ứng dụng [3].

Trong nghiên cứu này, thiết kế Plackett-Burman và thiết kế trung tâm phức hợp (Central Composite Design – CCD) đã được sử dụng để xác định môi trường lên men tối ưu cho quá trình lên men thu nhận màng mỏng BC có độ bền kéo cao. Nhằm nâng cao khả năng ứng dụng của sản phẩm.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Giống vi sinh vật:

Vi sinh vật được sử dụng trong nghiên cứu này gồm 5 chủng giống có khả năng tạo màng cellulose có nguồn gốc từ bộ sưu tập giống của Bộ môn Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Bách khoa – ĐHQG TP HCM. Các chủng đã được định danh và lưu trữ trong tủ đông sâu -80°C.

Môi trường lên men:

Các môi trường lên men được điều chế từ nguồn nguyên liệu nước dừa già đã bổ sung các chất dinh dưỡng cơ bản.

2.2. Bố trí thí nghiệm

2.2.1. Chọn lọc chủng giống tạo màng BC có độ bền kéo cao

5 chủng: Bk1, Bk2, Bk3, Bk4, Bk5 được nuôi trên môi trường cơ bản, tỉ lệ nước dừa 80%, hàm lượng ammonium sulfate (SA) 0,8%, hàm lượng diammonium phosphate (DAP) 0,2%, đường glucose 2%, acid acetic 0,5%, tỉ lệ giống 10%. Lên men tĩnh trải mỏng trong khay nhựa sau 72h, thu màng và đánh giá các chỉ tiêu: Độ bền kéo, độ đồng đều và khối lượng khô của màng.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng đến độ bền kéo của màng BC

Các yếu tố dinh dưỡng ảnh hưởng đến độ bền kéo màng BC gồm 4 yếu tố: Tỉ lệ nước dừa, nồng độ ammonium sulfate, diammonium phosphate và đường glucose. Tất cả các yếu tố này được khảo sát lần lượt trong điều kiện lên men tĩnh trải mỏng. Phạm vi khảo sát được thể hiện trong Bảng 1. Mỗi yếu tố thực hiện khảo sát ở 4 mức và 3 lần lặp lại. Kết quả của từng yếu tố sẽ là tâm được đưa vào thí nghiệm sàng lọc và quy hoạch thực nghiệm.

Bảng 1. Phạm vi các yếu tố khảo sát khả năng tạo màng BC có độ bền kéo cao

Kí hiệu	Tên yếu tố	Các mức khảo sát			
x_1	Tỉ lệ pha loãng nước dừa (%)	55	70	85	100
x_2	Nồng độ khoáng SA (%)	0,6	0,8	1,0	1,2
x_3	Nồng độ khoáng DAP (%)	0,1	0,2	0,3	0,4
x_4	Nồng độ glucose (%)	1,0	2,0	3,0	4,0

2.2.3. Sàng lọc các yếu tố bằng ma trận Plakett – Burman

Thí nghiệm sàng lọc giúp chúng ta xác định được các yếu tố quan trọng có ảnh hưởng trực tiếp tới hàm mục tiêu và loại bỏ những yếu tố ảnh hưởng không đáng kể. Ma trận Plakett – Burman được thiết kế dựa vào tam thí nghiệm của 4 yếu tố ở thí nghiệm khảo sát. Ma trận được thiết kế với mức thấp (-1) và mức cao (+1) của từng yếu tố tương ứng với phạm vi khảo sát được thực hiện trong thí nghiệm khảo sát đơn yếu tố (Bảng 1) bao gồm 12 thí nghiệm (Bảng 3) để sàng lọc ra các yếu tố ảnh hưởng chính đến độ bền kéo màng BC. Các yếu tố có độ tin cậy cao ($p < 0,05$) sẽ được đưa vào mô hình tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt theo cấu trúc có tâm (RSM – CCD).

2.2.4. Leo dốc tìm vùng cực trị

Do các thí nghiệm khởi đầu về vùng hoạt động tối ưu của các yếu tố thường không chính xác và ở xa so với vùng tối ưu thực tế. Vì vậy, cần di chuyển nhanh đến vùng lân cận có chứa điểm tối ưu. Thực hiện thí nghiệm leo dốc theo ma trận thực nghiệm gồm 12 thí nghiệm được thiết kế bằng tập tin Macro Minitab chứa các lệnh của Minitab.

Hàm đáp ứng được chọn là độ bền kéo của màng BC.

2.2.5. Tối ưu hóa bằng phương pháp thực nghiệm RSM – CCD

Từ kết quả thí nghiệm leo dốc, tiến hành thí nghiệm tối ưu hóa RSM – CCD, nhằm xây dựng mô hình bậc cao mô tả chính xác mối quan hệ giữa độ bền kéo màng và các yếu tố đầu vào. Thí nghiệm được thực hiện với 31 thí nghiệm ở 5 mức giá trị (-2) (-1) (0) (1) (2). Số liệu được phân tích bởi phần mềm Minitab 17. Từ kết quả phân tích sẽ xác định điểm tối ưu của các yếu tố cho độ bền kéo màng BC tối ưu [4].

2.2.6. Phương pháp đo độ bền kéo

Độ bền kéo được xác định tại phòng thí nghiệm trọng điểm, Trường Đại học Bách khoa - ĐHQG TPHCM. Màng được dập khuôn theo hình quả tạ. Cố định hai đầu vào ngàm kẹp và cho di chuyển ra xa dần với tốc độ kéo 10mm/phút cho đến khi đứt. Theo biểu đồ trên máy có thể xác định được lực kéo đứt (F). Từ lực kéo đứt và độ dày của màng xác định được ứng suất kéo: $\sigma = \frac{F}{4.d}$.

Trong đó F là lực kéo đứt, d là bề dày của màng.

3. Kết quả và biện luận

3.1. Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn cho màng BC có độ bền kéo cao

5 chủng có khả năng tạo màng cellulose từ bộ sưu tập, sàng lọc chủng Bk5 *Gluconacetobacter intermedius* có khả năng tạo màng BC có độ bền kéo cao nhất (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả khảo sát khả năng tạo màng của 5 chủng sinh celledose.

Đặc tính màng Chủng vi khuẩn	Độ bền kéo (GPa)	Khối lượng khô (g)	Độ đồng đều
Bk1	31,45	0,257	+
Bk2	29,05	0,346	+
Bk3	25,67	0,175	-
Bk4	15,45	0,085	-
Bk5	31,69	0,344	+

Ghi chú:

+: (đồng đều); -: (không đồng đều)

3.2. Kết quả khảo sát các yếu tố dinh dưỡng ảnh hưởng đến độ bền kéo màng BC

Độ bền kéo của màng BC thu được sau quá trình lên men ảnh hưởng trực tiếp bởi nhiều yếu tố khách quan là các yếu tố khảo sát trình bày ở Bảng 1. Kết quả khảo sát của các yếu tố này được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng của dinh dưỡng đến độ bền kéo của màng BC

Yếu tố	Tỉ lệ phù hợp (%)	Độ bền kéo màng BC (Gpa)
Tỉ lệ nước dừa già	85	31,70
Hàm lượng khoáng SA	1,0	31,70
Hàm lượng khoáng DAP	0,3	31,67
Đường glucose	2,0	31,70

Các yếu tố dinh dưỡng môi trường lên men đóng vai trò quan trọng để vi khuẩn có thể sinh tổng hợp màng cellulose, chúng quyết định năng suất cũng như tính chất của màng. Kết quả thực nghiệm cho thấy, tỉ lệ nước dừa là 85%, hàm lượng khoáng SA 1,0% và hàm lượng đường glucose 2,0% sẽ cho màng BC có độ bền kéo tối ưu (31,70 Gpa). Hàm lượng khoáng DAP tỉ lệ 0,3% sẽ cho màng BC có độ bền kéo cao nhất (31,67 Gpa).

Các yếu tố này tiếp tục được sàng lọc và xác định rõ mức độ ảnh hưởng đến độ bền kéo màng BC bằng mô hình Plackett – Burman.

3.3. Ma trận Plackett - Burman sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến độ bền kéo màng BC

Mục đích của thí nghiệm sàng lọc là xác định các yếu tố quan trọng, có ảnh hưởng trực tiếp và loại bỏ những yếu tố ít hoặc không ảnh hưởng đến độ bền kéo của màng BC.

Kết quả phân tích phương sai xác định mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố cho thấy, tất cả các yếu tố dinh dưỡng đều gây ảnh hưởng đến độ bền kéo màng BC, với độ

tin cậy $p < 0,005$. Vì thế, 4 yếu tố này gồm tỉ lệ nước dừa, nồng độ khoáng SA, DAP và glucose sẽ được đưa vào quá trình lên men tối ưu hóa RSM - CCD với hàm mục tiêu là độ bền kéo của màng BC sau khi lên men (Bảng 4).

Bảng 4. Mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố ảnh hưởng

Tên yếu tố	Mức độ ảnh hưởng	Độ tin cậy
Tỉ lệ nước dừa (%)	0,4783	0,039
Nồng độ khoáng SA (%)	0,6350	0,012
Nồng độ khoáng DAP (%)	0,6617	0,010
Nồng độ glucose (%)	5,4883	0,000

Đồng thời từ kết quả phân tích phương trình hồi quy bậc nhất các thí nghiệm khởi đầu cho thấy, mô hình hồi quy bậc nhất là phù hợp với các kết quả thí nghiệm thu thập được vì giá trị kiểm định Lack of fit có p-value 0,077 ($>0,05$). Điều này có nghĩa là khu vực khảo sát không nằm gần vùng cực trị, do đó cần thực hiện leo dốc để tìm vùng cực trị.

3.4. Kết quả leo dốc tìm vùng cực trị

Do thí nghiệm khởi đầu còn xa vùng cực trị, cần tiến hành các thí nghiệm leo dốc, nhằm đưa các điều kiện hoạt động hiện tại tới vùng cực trị (điều kiện tối ưu) một cách hiệu quả. Ma trận và kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Ma trận và kết quả thí nghiệm leo dốc

Bước thí nghiệm	Mức thí nghiệm				Y (Độ bền kéo Gpa)
	x_1	x_2	x_3	x_4	
1	85,00	1,00	0,30	2	31,71
2	86,31	1,02	0,31	3	31,72
3	87,61	1,05	0,32	4	31,75
4	88,92	1,07	0,34	5	31,76
5	90,23	1,09	0,35	6	31,75
6	91,54	1,12	0,36	7	31,76
7	92,84	1,14	0,37	8	31,75
8	94,15	1,16	0,38	9	30,55
9	95,46	1,19	0,40	10	30,08
10	96,77	1,21	0,41	11	30,01
11	98,07	1,23	0,42	12	29,67
12	99,38	1,25	0,43	13	29,70

Bắt đầu từ bước thứ 6, độ bền kéo của màng thu được bắt đầu giảm nhanh. Tuy nhiên, nhận thấy rằng kết quả hàm mục tiêu ở bước thứ 4 và thứ 6 là như nhau, và để hiệu quả về

kinh tế thì các mức thí nghiệm ở bước thứ 4 được chọn là điểm tâm cho các thí nghiệm tiếp theo.

Như vậy, sau khi tiến hành thí nghiệm leo dốc chúng tôi đã tìm được vùng chứa điểm cực trị của độ bền kéo màng BC có các mức yếu tố đầu vào như sau: Độ pha loãng nước dứa 88,92%, nồng độ khoáng SA 1,07%, nồng độ khoáng DAP 0,34%, nồng độ đường glucose 5%. Các yếu tố này sẽ là tâm cho thí nghiệm tối ưu RSM – CCD tiếp theo.

3.5. Kết quả thí nghiệm RSM – CCD, tối ưu hóa các yếu tố dinh dưỡng ảnh hưởng đến độ bền kéo màng BC.

Thí nghiệm RSM – CCD nhằm xây dựng mô hình bậc cao mô tả chính xác mối quan hệ giữa độ bền kéo màng với các yếu tố đầu vào, đồng thời có thể xác định được điểm tối ưu cho độ bền kéo cực đại của màng BC. Thí nghiệm RSM – CCD gồm 31 nghiệm thức. Kết quả thí nghiệm, phân tích đánh giá mức độ tin cậy của các yếu tố được trình bày ở Bảng 6 và 7

Bảng 6. Kết quả thực nghiệm tối ưu hóa theo phương pháp RSM – CCD

Bước thí nghiệm	Mức thí nghiệm				Y (Độ bền kéo Gpa)
	x_1	x_2	x_3	x_4	
1	90,23	1,09	0,35	4	11,86
2	88,92	1,07	0,32	5	14,61
3	87,61	1,05	0,35	6	16,48
4	88,92	1,07	0,36	5	11,30
5	90,23	1,05	0,35	6	16,11
6	90,23	1,05	0,33	4	22,84
7	88,92	1,07	0,34	5	31,80
8	87,61	1,05	0,35	4	7,50
9	88,92	1,07	0,34	5	31,74
10	88,92	1,07	0,34	5	31,75
11	87,61	1,09	0,33	6	14,71
12	90,23	1,09	0,35	6	16,25
13	91,54	1,07	0,34	5	20,25
14	88,92	1,07	0,34	5	31,81
15	87,61	1,09	0,35	4	7,60
16	88,92	1,07	0,34	5	31,80
17	88,92	1,07	0,34	5	31,75
18	88,92	1,07	0,34	5	31,78
19	90,23	1,05	0,35	4	16,15
20	88,92	1,07	0,34	3	12,15
21	88,92	1,03	0,34	5	14,76
22	88,92	1,07	0,34	7	21,92

23	90,23	1,09	0,33	4	13,25
24	87,61	1,09	0,35	6	20,01
25	87,61	1,05	0,33	4	12,67
26	87,61	1,09	0,33	4	6,16
27	90,23	1,05	0,33	6	20,67
28	87,61	1,05	0,33	6	18,03
29	90,23	1,09	0,33	6	13,78
30	88,92	1,11	0,34	5	14,77
31	86,30	1,07	0,34	5	13,32

Kết quả phân tích cho thấy tất cả các trường hợp đều đạt độ tin cậy $p \leq 0,05$ do đó các yếu tố này sẽ được đưa vào phương trình hồi quy.

Bảng 7. Các yếu tố ảnh hưởng và độ tin cậy

Yếu tố	Độ tin cậy	Yếu tố	Độ tin cậy
x_1	0,000	$x_4 x_4$	0,000
x_2	0,000	$x_1 x_2$	0,004
x_3	0,006	$x_1 x_3$	0,032
x_4	0,000	$x_1 x_4$	0,000
$x_1 x_1$	0,000	$x_2 x_3$	0,000
$x_2 x_2$	0,000	$x_2 x_4$	0,006
$x_3 x_3$	0,000	$x_3 x_4$	0,007

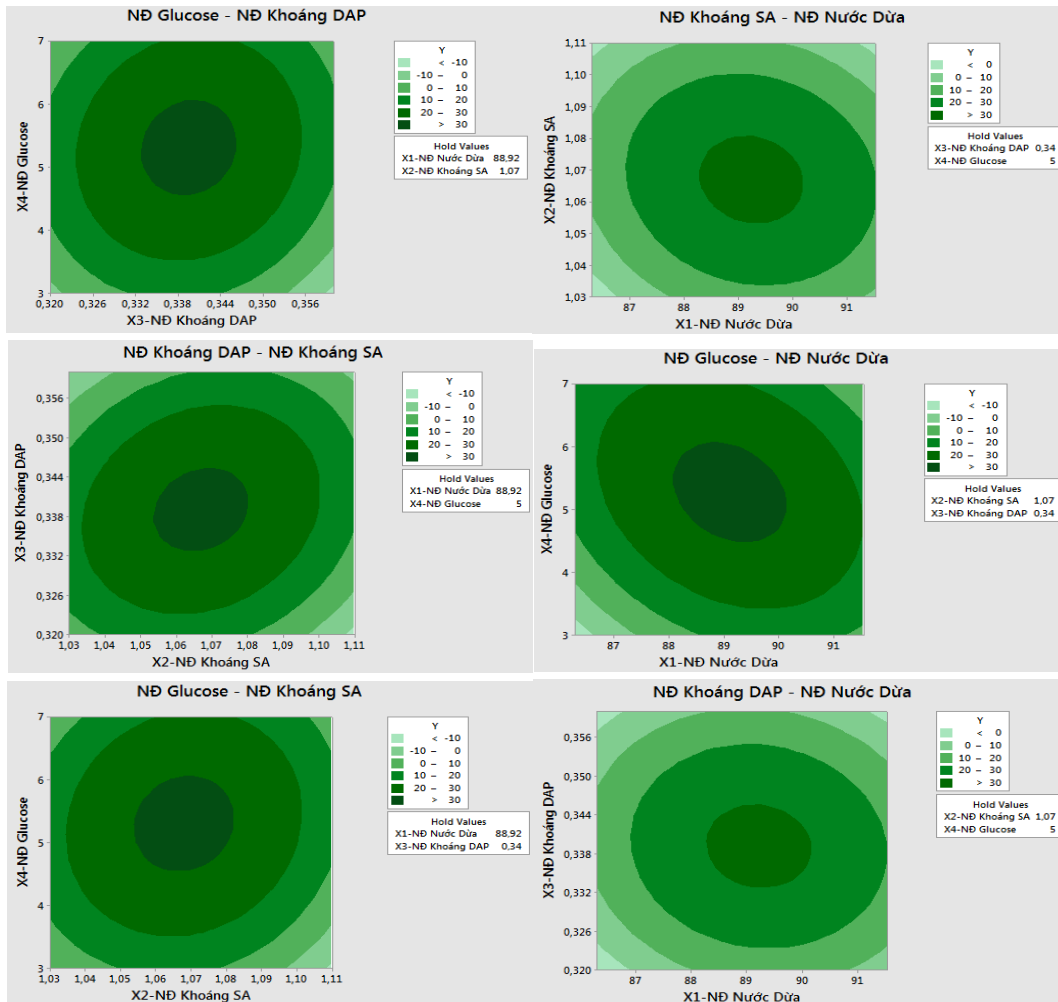
Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = -38206 + 463,9x_1 + 23476x_2 + 28060x_3 + 104,2x_4 - 2,257x_1^2 - 10947x_2^2 - 48311x_3^2 - 3,811x_4^2 - 34,4x_1x_2 - 48,6x_1x_3 - 1,555x_1x_4 + 8059x_2x_3 + 43,0x_2x_4 + 84,2x_3x_4$$

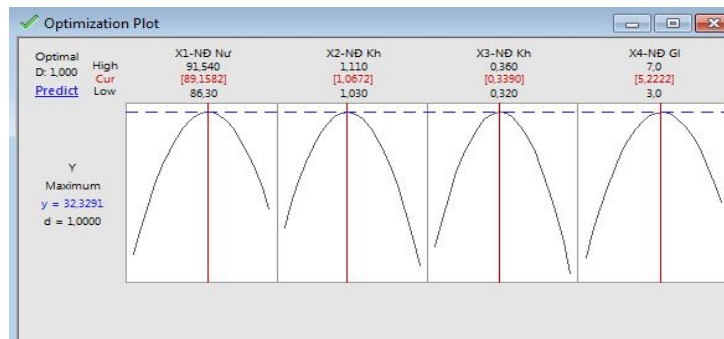
Hệ số hồi quy (R^2) tính được là 0,9905. Điều này thể hiện rằng có 99,05% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu mô hình phỏng đoán.

Các đồ thị bề mặt chỉ tiêu (Hình 1) thể hiện mối quan hệ giữa hàm mục tiêu với từng cặp hai biến thí nghiệm và từ đồ thị này có thể xác định được vùng tối ưu (vùng đường cong màu xanh đậm nhất) của từng yếu tố làm cho hàm đáp ứng cực đại.

Tuy nhiên, cách xem xét này mang tính trực quan. Do đó, chúng tôi sử dụng công cụ tối ưu hóa của phần mềm Minitab 17 sẽ giúp xác định cực trị của hàm mục tiêu Y một cách chính xác. Theo Hình 2, hàm mục tiêu Y đạt tối ưu khi các biến đầu vào đạt giá trị tại đỉnh của các đường cong lần lượt là: Tỷ lệ nước dứa 89,1582%, nồng độ khoáng SA 1,0672%, nồng độ khoáng DAP 0,339%, và nồng độ đường glucose 5,2222%. Độ bền kéo màng BC đạt cực đại được phần mềm xác định là 32,3291 (Gpa).



Hình 1. Bề mặt đáp ứng của độ bền kéo theo từng cặp yếu tố ảnh hưởng



Hình 2. Các giá trị tối ưu theo mô hình

Đánh giá mô hình thực nghiệm

Sau khi tìm được điểm tối ưu chúng tôi tiến hành lặp lại thí nghiệm tại điểm tối ưu vừa tìm được với các giá trị làm tròn và so sánh với giá trị cực đại của hàm mục tiêu suy ra từ mô hình (Y_{\max}) với giá trị thực nghiệm (Y'_{\max}) thu được kết quả như Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả thực nghiệm kiểm chứng giá trị tối ưu

Thành phần môi trường	Lí thuyết	Thực nghiệm
Nồng độ nước dừa (%)	89,1582	89,2
Nồng độ khoáng DAP (%)	0,339	0,34
Nồng độ khoáng SA (%)	1,0672	1,07
Nồng độ đường glucose (%)	5,2222	5,2
Độ bền kéo màng (Gpa)	32,3291	32,515

Kết quả thí nghiệm cho thấy có sự tương đồng giữa thực tế và lí thuyết. Điều này chứng tỏ việc tối ưu các yếu tố trên đạt độ tin cậy cao và có ý nghĩa rất lớn trong sản xuất.

4. Kết luận

Với mục tiêu tạo ra màng BC có độ bền kéo cao bài báo đã chọn được chủng vi khuẩn *Gluconacetobacter intermedius* có khả năng tạo màng BC có độ bền kéo cao nhất trong 5 chủng của bộ sưu tập giống.

Quá trình tối ưu hóa các thành phần môi trường lên men nhằm thu nhận màng BC có độ bền kéo cao trên cơ chất nước dừa già được thực hiện bằng phương pháp đáp ứng bề mặt theo cấu trúc có tâm đã xác định được điểm tối ưu: Tỷ lệ nước dừa 89,2%, nồng độ khoáng SA 1,07%, nồng độ khoáng DAP 0,34% và nồng độ đường glucose 5,2%. cho độ bền kéo tối ưu đạt được là 32,515 Gpa.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E. Bilgi, E. Bayir, A. S. Urkmez, E. Esin Hames, "Optimization of Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus* using Carob and Haricot Bean," *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016.
- [2] E.J. Vandamme, S. De Baets, A. Vanbaelen, K. Joris, P. De Wulf, "Improved production of bacterial cellulose and its application potential," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 99, pp. 59-93, 1998.
- [3] Lô Thị Bảo Khánh, Dương Minh Lam, Đinh Thị Kim Nhung, Nguyễn Thị Thùy Vân, "Nghiên cứu xử lí và bảo quản màng cellulose vi khuẩn từ chủng vi khuẩn *Acetobacter xylinum*," *Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4*, pp. 1181-1184, 2011.
- [4] Nguyễn Cảnh, *Quy hoạch thực nghiệm*, NXB Đại học Bách khoa - ĐHQG TPHCM, 1993.
- [5] Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập II và III*, NXB Khoa học Kỹ thuật, 1976.

- [6] S. Bielecki, A. Krystinowicz, M. Turkiewicz, H. Kalinowska, "Bacterial Cellulose," *Technical University of Łódź Poland*, vol. 3, pp. 37-46, 2005.