

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN NITƠ THÍCH HỢP TRONG MÔI TRƯỜNG TỔNG HỢP LYSINE TỪ VI KHUẨN *Corynebacterium glutamicum* CG2

Bùi Trọng Tâm^{1,*}, Phạm Thị Mát¹, Nguyễn Thị Duyệt¹, Nguyễn Hữu Hoàng¹

¹ Viện Nghiên cứu Hải sản

Email: bttam@rimf.org.vn

TÓM TẮT

L-Lysine là một amino axit thiết yếu được bổ sung làm thức ăn thủy sản được sản xuất chủ yếu bằng con đường lên men vi sinh vật. Thành phần môi trường là yếu tố rất quan trọng, ảnh hưởng tới quá trình lên men của vi khuẩn sản xuất Lysine. Nguồn nitơ thường là thành phần cao nhất của môi trường phát triển vi khuẩn. Thành phần nitơ trong môi trường nuôi vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* CG2 được tối ưu nhằm mục đích tăng cường sản xuất L-Lysine đã được kiểm tra và lựa chọn, bao gồm các nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ đơn, hỗn hợp và tỷ lệ các thành phần của chúng. Hàm lượng lysine đạt được 45,7 g/L với môi trường có nguồn nitơ tối ưu (urê -7,4 g/L và dịch thủy phân cá-10 g/L) khi nuôi trên thiết bị lên men 10 lít.

Từ khóa: *Corynebacterium glutamicum*, dịch thủy phân cá, lysine, nguồn nitơ.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lysine là một trong 9 axit amin thiết yếu cho người và động vật, không thể sinh tổng hợp và do đó phải đến từ nguồn thực phẩm [1]. Sản xuất lysine bằng hóa tổng hợp chỉ chiếm 20 so với 80% sản lượng sản xuất bằng lên men vi sinh vật. Trong quá trình lên men của vi sinh vật, môi trường nuôi cấy là đầu vào chính và nguồn nitơ thường là thành phần đắt tiền nhất. Các nguồn nitơ tiềm năng bao gồm các hợp chất vô cơ khác nhau (amoni hoặc muối nitrat) hoặc các hợp chất hữu cơ (cao nấm men, dịch chiết ngô, đậu nành thủy phân) và các chiết xuất khác từ các mô thực vật và động vật [2]. Các sản phẩm phụ của thủy sản có tiềm năng cao là nguồn nitơ rẻ tiền cho sinh trưởng của vi sinh vật [3]. Sản phẩm được tạo ra từ phần thải từ cá (đầu cá, đuôi, xương vụn...) tạo ra sản phẩm ổn định chứa peptit và axit amin có giá trị dinh dưỡng cao, giảm ô nhiễm môi trường, cải thiện tính bền vững của ngành chế biến thủy, hải sản và thu được các sản phẩm sinh học có giá trị gia tăng cao [4]. Dịch đạm thủy phân từ cá giúp vi sinh vật phát

triển tốt hơn, cũng như tạo ra sinh khối cao hơn do hàm lượng cao các hợp chất protein hòa tan, đặc biệt là các hợp chất nitơ. Chúng có thể được sử dụng để thay thế cho pepton thương mại có nguồn gốc từ động vật trên cạn. Việc sử dụng cá thay cao nấm men đã được báo cáo để sản xuất lysine từ vi sinh vật [5]. Ngoài ra, pepton thủy phân từ cá được sử dụng rộng rãi với nhiều ứng dụng khác nhau, đặc biệt sử dụng để thay thế nguồn nitơ trong quá trình lên men thu nhận các sản phẩm từ vi sinh vật [6]. Việc sử dụng vi sinh vật để lên men có rất nhiều ưu việt, trong đó chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 đã được nghiên cứu khả năng tổng hợp lysine trong các điều kiện thích hợp ở nhiệt độ 30°C, pH 7, thời gian 72 giờ nuôi lắc trên môi trường MT5. Nghiên cứu thành phần nitơ thích hợp trong môi trường tổng hợp lysine từ vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* CG2 nhằm thay thế nguồn nitơ trong môi trường nuôi để thu được hàm lượng lysine cao từ nguyên liệu rẻ tiền là rất quan trọng và có thể ứng dụng trong sản xuất ở quy mô công nghiệp. Trên cơ sở ứng dụng công nghệ thủy phân bằng enzym để tận dụng nguồn

nguyên liệu phế phụ phẩm cá tra trong các nhà máy chế biến, cùng với việc bổ sung bột lysine - là sản phẩm được sản xuất ra nhờ công nghệ lên men vi sinh vật sinh lysine năng suất cao sẽ tạo ra một loại sản phẩm có giá trị gia tăng, đáp ứng nhu cầu đa dạng hóa các sản phẩm thủy sản và phục vụ phát triển ngành nuôi trồng thủy sản trong nước.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 được cung cấp từ Viện Nghiên cứu Hải sản và được lưu giữ tại Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học. Dịch thủy phân cá cô đặc được sản xuất tại Việt Nam.

Các hóa chất khác sử dụng trong quá trình nuôi cấy, định lượng, được sản xuất từ các hãng lớn và tinh khiết như: Merck, Sigma, Wako, Ấn Độ, Trung Quốc, Việt Nam.

2.2. Môi trường

Môi trường được sử dụng trong nghiên cứu là môi trường MT5 bao gồm các thành phần sau: glucose -83,5 (g/L); urê -7,4 (g/L); KH_2PO_4 -1 (g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,25 (g/L); Thiamine -4 (mg/L); Biotine -1,57 (mg/L); dịch chiết từ 40 g ngô - 1 (lít); pH 7 [7].

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đơn đến sinh trưởng và tổng hợp lysine

Chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 được nuôi vào môi trường MT5 ở bình tam giác 250 ml, lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C. Thay nguồn nitơ dịch chiết ngô và urê (ĐC) bằng các nguồn nitơ vô cơ (10 g/L): Amoni sunphat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), amoni axetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), amoni clorua (NH_4Cl), amoni photphat ($(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$), urê, amoni nitrat (NH_4NO_3) và các nguồn nitơ hữu cơ (20 g/L): cao malt, cao men, cao thịt, pepton, soybean, trypton, Dịch đậm thủy phân cá và Dịch chiết ngô (100 g ngô). Xác định số lượng tế bào và hàm lượng lysine sau 72 giờ.

2.3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ hỗn hợp đến sinh trưởng và tổng hợp lysine

Thay nguồn nitơ của môi trường MT5 để nuôi *Corynebacterium glutamicum* CG2 bằng hỗn hợp các nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ lựa chọn theo nguồn nitơ vô cơ 7,4 g/L; nguồn nitơ hữu cơ 10 g/L. Xác định số lượng tế bào và hàm lượng lysine sau 72 giờ.

2.3.3. Ảnh hưởng tỷ lệ nguồn nitơ hỗn hợp đến sinh trưởng và tổng hợp lysine

Chủng *C. glutamicum* CG2 được nuôi vào môi trường MT5, thay hỗn hợp các nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ lựa chọn theo nguồn nitơ vô cơ 7,4 g/L; nguồn nitơ hữu cơ 5, 10, 15, 20 g/L. Sau đó thay hỗn hợp các nguồn nitơ theo nguồn nitơ hữu cơ lựa chọn và nguồn nitơ vô cơ 5,0, 7,4, 10, 15 g/L. Xác định số lượng tế bào và hàm lượng lysine sau 72 giờ.

2.3.4. Nuôi chủng CG2 trên thiết bị lên men 10 lít

Chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 được hoạt hóa, sau đó cấy 5% chủng vào môi trường MT5 (có chứa nguồn nitơ thích hợp) trong thiết bị lên men 10 lít, nuôi ở 30°C; tốc độ khuấy 200 vòng/phút và tốc độ thổi khí 1,2 lít khí/lít dịch/phút. Sau thời gian 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 giờ nuôi; xác định số lượng tế bào và hàm lượng lysine.

2.4. Phương pháp phân tích

2.4.1. Xác định khả năng sinh trưởng

Xác định mật độ tế bào: Khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn trong dịch nuôi được xác định bằng mật độ tế bào ở giá trị OD 600 nm.

Xác định số lượng tế bào theo mô tả của Burdass và cs (2016) [8], khi lấy 10 g (hoặc 10 ml) mẫu cần xác định số lượng tế bào pha vào 90 ml nước muối sinh lý (NaCl 0,85%). Pha loãng tới nồng độ thích hợp theo hệ số 10. Sau đó, nhỏ vào các đĩa môi trường thích hợp cho mỗi loại (mỗi đĩa nhỏ 100 ml, mỗi nồng độ pha loãng làm 3 đĩa), dùng que gạt trải đều cho đến khi khô mặt thạch,

ở nhiệt độ nuôi 30°C. Sau 2 ngày nuôi ở nhiệt độ 30°C, tiến hành đếm số lượng khuẩn lạc tại nồng độ pha loãng thích hợp (~ 100 khuẩn lạc/đĩa petri).

Xác định pH: Môi trường và dịch nuôi được xác định pH trên thiết bị đo pH theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.4.2. Phương pháp xác định L-Lysine

Xác định L-Lysine theo mô tả của Hsieh và cs (1995) [9] sử dụng thuốc thử Ninhydrin-Ferric. Nồng độ lysine được tính toán theo đường chuẩn xây dựng ở các nồng độ chất chuẩn lysine: 0, 10, 20, 30,0, 40, 50,0 và 60 g/L, đo bước sóng ở 470 nm.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý trên phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm IBM SPSS Statistics 20 với phân tích ANOVA, LSD. Số liệu trình bày là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn SD.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

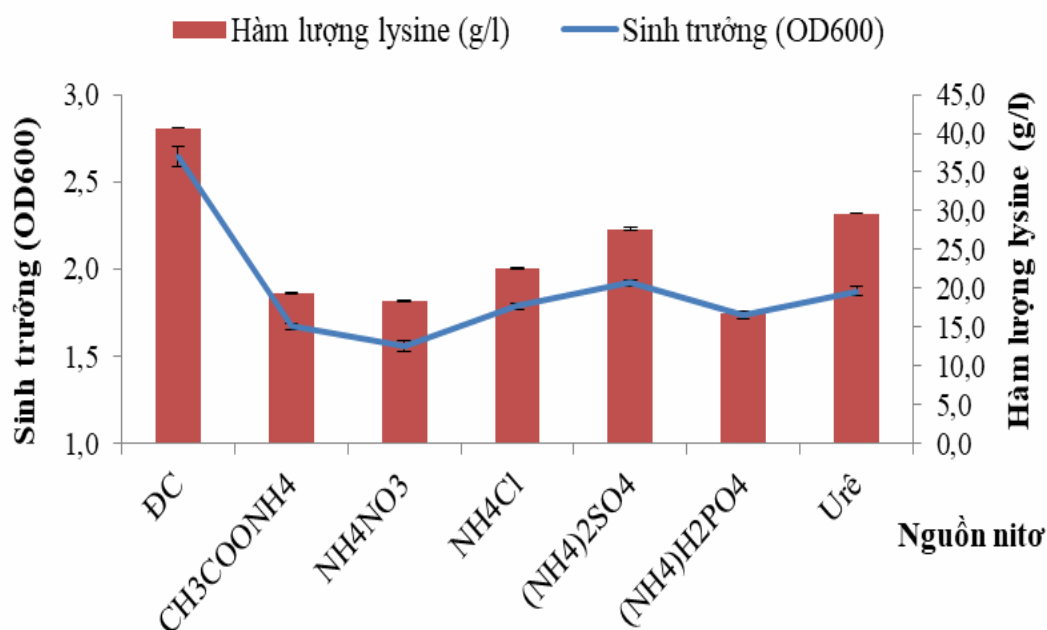
Chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 được nghiên cứu sử dụng cho sản xuất lysine, vì chủng này thuộc loài an toàn, có khả năng sinh trưởng tốt và có khả năng sinh lysine cao. Điều kiện nuôi cấy thích hợp trong phòng thí nghiệm

cho chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2: nuôi lắc 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C, pH 7, thời gian thu lysine ở 72 giờ trên môi trường MT5.

3.1. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng và tổng hợp lysine của chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2

3.1.1. Ảnh hưởng nguồn nitơ đơn đến sinh trưởng và tổng hợp lysine của chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2

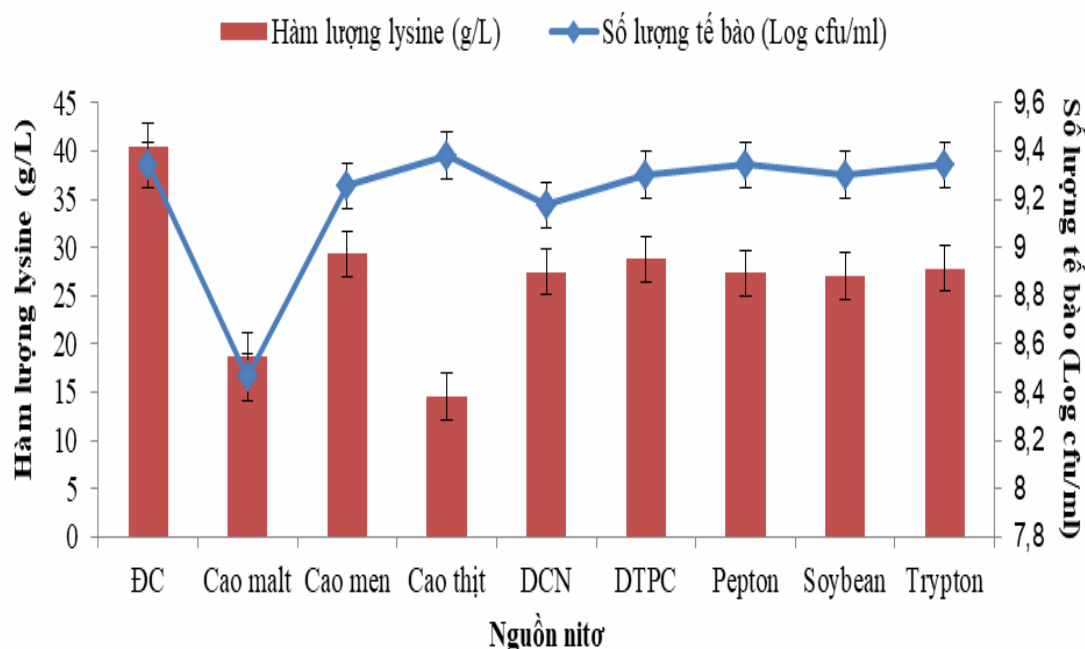
Kết quả hình 1 cho thấy, nuôi trong 6 nguồn nitơ vô cơ đơn lẻ, sinh trưởng của chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 kém hơn so với đối chứng (urê và dịch chiết ngô), đạt giá trị OD₆₀₀ từ 1,56 - 1,92. Sinh trưởng yếu nhất trong nguồn amoni nitrat - NH₄NO₃, sinh trưởng tốt nhất ở nguồn amoni sunphat - (NH₄)₂SO₄ và urê. Khả năng tổng hợp lysine của chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 thay đổi đáng kể từ 16,73 - 29,68 g/L khi nuôi ở các nguồn nitơ vô cơ đơn lẻ khác nhau, thấp nhất đạt 16,73 g/L khi nuôi trên amoni photphat (NH₄)H₂PO₄ và cao nhất 29,68 g/L khi nuôi ở nguồn urê, tuy nhiên vẫn thấp hơn so với đối chứng (Hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn nitơ vô cơ đến sinh trưởng và tổng hợp lysine của chủng CG2

Phân tử lysine có hai nhóm amin (-NH_2), do đó, cần phải cung cấp nitơ nhiều để quá trình sinh tổng hợp lysine đạt tối đa. Nghiên cứu của Moosavi-Nasab và cs (2007) [10] sử dụng các nguồn nitơ có chứa nhóm amin trong nuôi cấy *C. glutamicum* PTCC 1532 sản xuất lysine, tối đa lysine (22 g/L) được tích lũy khi sử dụng amoni sunphat - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tiếp theo là amoni clorua - NH_4Cl (18 g/L), amoni axetat - $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (11 g/L) và amoni photphat - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (9 g/L). Nghiên cứu của Irshad và cs (2015) [11] sử dụng các nguồn nitơ NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và urê để sản xuất lysine từ chủng *Brevibacterium flavum*. Urê và amoni sunphat - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ được tìm thấy là

nguồn tốt nhất. Nồng độ 0,3% của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ để sản xuất lysine đạt 28,86 g/L. Urê là một nguồn nitơ hữu cơ trung tính cũng được sử dụng để sản xuất siêu lysine. Sản xuất lysine đạt được 29,34 g/L với mức urê tối ưu (0,2%). Trong khi nghiên cứu của Rehman và cs (2012) [12] đã chứng minh nồng độ tối ưu của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2,3 và 3,5% để sản xuất lysine từ các môi trường cơ bản khác nhau (tương ứng là FM3 và FM1) [12]. Tương tự, kết quả nghiên cứu của Ali S và cs (2009) [13], Sattar và cs (2008) [14] cũng khẳng định, urê là một loại nguồn ni tơ trung tính chi phí thấp không làm tăng độ pH của môi trường lên men, hỗ trợ sản xuất lysine tối đa.



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ hữu cơ đến sinh trưởng và tổng hợp lysine của chủng CG2

Khi nuôi chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 bằng các nguồn hữu cơ riêng biệt (Hình 2), sinh trưởng tốt trên 7 nguồn nitơ thử nghiệm tương đương với đối chứng, trừ cao malt. Khả năng tổng hợp lysine của chủng CG2 thay đổi từ 14,56 - 29,34 g/L khi nuôi ở các nguồn hữu cơ, thấp nhất khi nuôi trên cao thịt và cao malt, cao nhất khi nuôi ở nguồn cao men, tiếp theo là dịch thủy phân cá, đạt 29,34 g/L và 28,77 g/L. Khi nuôi ở các

nguồn còn lại, hàm lượng lysine tương tự nhau, đạt 27,08 - 27,83 g/L.

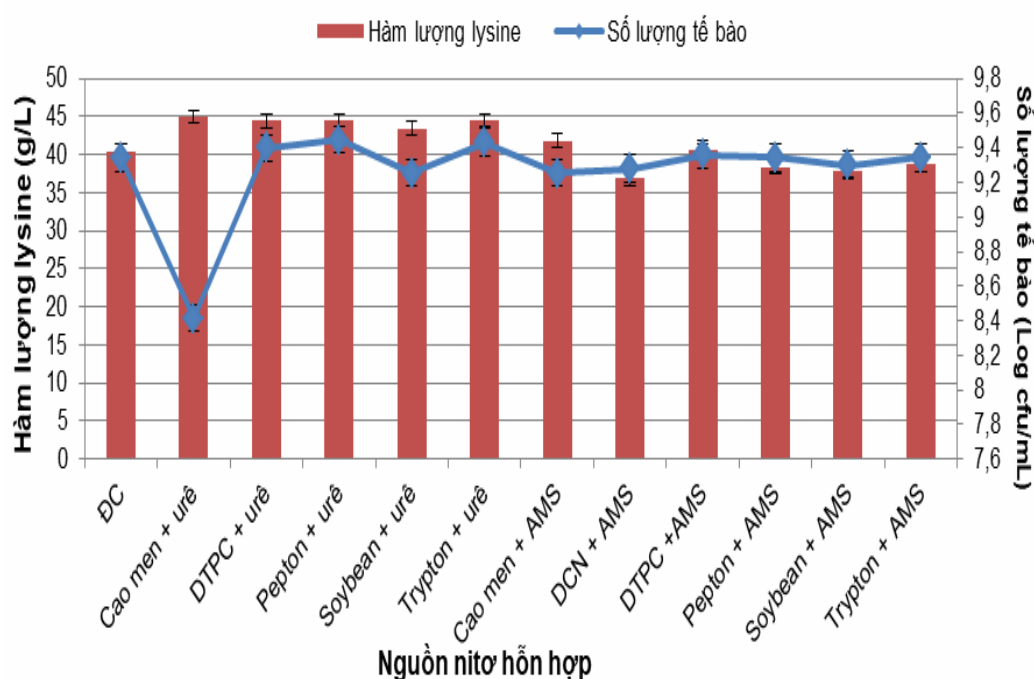
Sản phẩm đậu tương thủy phân được nuôi cấy và năng suất lysine đạt 31,2 g/L với 0,5% dịch thủy phân đậu tương [6]. Tryptone được điều chế bằng cách phân hủy casein bằng enzym, đóng vai trò như peptone và nguồn giàu tryptophan để lên men. Hiệu suất cao 33,92 g/L của lysine đạt được với 0,3% tryptone được tìm thấy [15]. Young và Chipley (1983) [16] đã nghiên cứu sản xuất lysine

và threonine từ *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21086 và *E. coli* ATCC 21151, lượng lysine cao nhất 3,3 g/L được sản xuất từ hỗn hợp axit dịch whey thủy phân và cao men (0,2%).

Nguồn nitơ hữu cơ trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn rất quan trọng, do có mặt của amino axit, giúp đồng hóa và tăng trưởng tế bào nhanh hơn [17]. Mặt khác, chi phí của các nguồn hữu cơ rất cao so với các nguồn vô cơ. Bằng cách này, sự kết hợp của các nguồn hữu cơ và vô cơ có thể cho phép tế bào phát triển tốt với chi phí tương đối thấp [18]. Từ các kết quả hình 2 và 3 cho thấy, sinh trưởng của chủng CG2 trong nguồn nitơ hữu cơ cao hơn nguồn nitơ vô cơ. Hàm lượng lysine khi nuôi ở các nguồn vô cơ và hữu cơ riêng biệt thấp hơn so với nuôi ở nguồn nitơ hỗn hợp của môi trường MT5. Do vậy, các nguồn nitơ vô cơ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và urê sẽ được nuôi hỗn hợp với các nguồn nitơ hữu cơ như: Cao men, pepton, soybean, trypton, dịch thủy phân cá và dịch chiết ngô.

3.1.2. Ảnh hưởng nguồn nitơ hỗn hợp đến sinh trưởng và tổng hợp lysine của chủng CG2

Nuôi hỗn hợp các nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ cho kết quả tốt hơn so với nuôi đơn lẻ; sinh trưởng của chủng CG2 trong các hỗn hợp đều $>10^9$ CFU/ml (Hình 4). Hàm lượng lysine được tổng hợp cao, đạt 36,88 - 45,02 g/L, cao nhất là nuôi trên hỗn hợp cao men + urê, đạt 45,02 g/L, tiếp theo là hỗn hợp dịch thủy phân cá + urê, pepton + urê, trypton + urê đạt >44 g/L. Nuôi hỗn hợp nitơ hữu cơ với urê cho hàm lượng lysine cao hơn khi nuôi với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Các nguồn nitơ hữu cơ cao men, pepton, trypton đều là các sản phẩm thương mại đắt tiền, trong khi dịch thủy phân cá là sản phẩm rẻ tiền và cho các kết quả cao khi nuôi cấy chủng CG2. Từ kết quả này, nguồn nitơ hỗn hợp dịch thủy phân cá cô đặc + urê sẽ được sử dụng trong các thực nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ hỗn hợp đến sinh trưởng và tổng hợp lysine của chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2

Ghi chú: DTPC: Dịch thủy phân cá; DCN: Dịch chiết ngô; MA: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Trong nghiên cứu của Junior và cs (2016) [18] về ảnh hưởng của các nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ đối với việc sản xuất lysine của vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21799 được đánh giá bằng cách phân tích CCRD, mật độ sinh khối tốt nhất đạt được với môi trường chứa NB (7,1 g/L), tiếp theo là môi trường chứa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5,9 g/L); môi trường chứa $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ và urê làm nguồn nitơ thu được không quá 3,0 g/L sinh khối. Hàm lượng lysine cao nhất (đạt 5,87 g/L) với sự kết hợp của môi trường NB (5,5 g/L) và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (61 g/L).

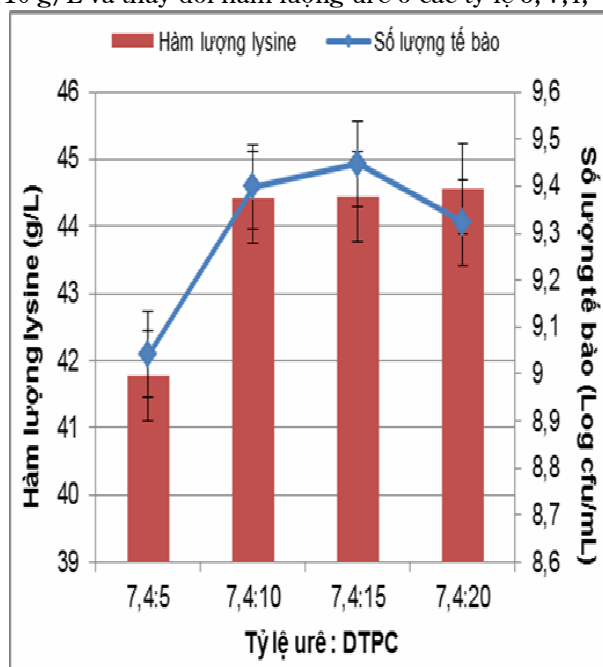
3.1.3. Lựa chọn tỷ lệ urê và dịch thủy phân cá thích hợp cho sinh trưởng và tổng hợp lysine của chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2

Khi nuôi chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 với tỷ lệ urê theo môi trường MT5 (7,4 g/L) và thay đổi dịch thủy phân cá ở các tỷ lệ 5, 10, 15 và 20 g/L, sinh trưởng và tổng hợp lysine thay đổi không nhiều, thấp nhất khi nuôi ở hàm lượng 5,0 g/L. Khi tăng hàm lượng dịch thủy phân cá từ 10 - 20 g/L, sinh trưởng và tổng hợp lysine hầu như không thay đổi (Hình 4).

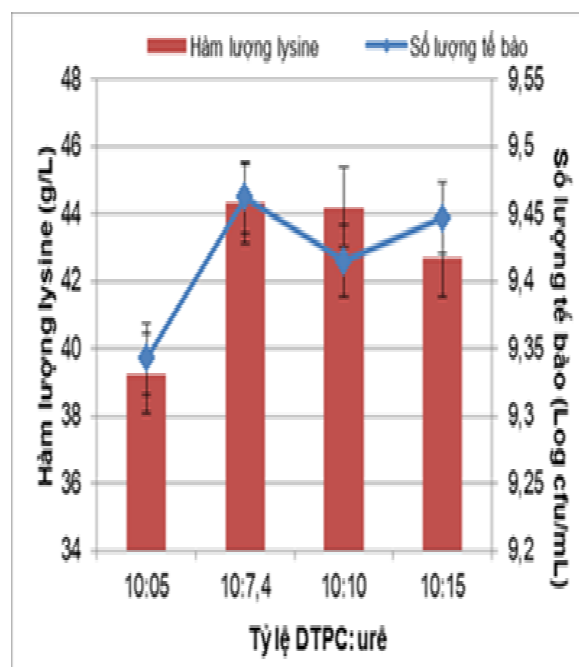
Nuôi chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 trong môi trường với tỷ lệ dịch thủy phân cá 10 g/L và thay đổi hàm lượng urê ở các tỷ lệ 5, 7,4,

10, và 15 g/L (Hình 5), sinh trưởng không thay đổi nhiều khi thay đổi hàm lượng urê, tổng hợp lysine thấp hơn khi nuôi ở hàm lượng urê 5 g/L và khi tăng hàm lượng urê từ 7,4 - 15 g/L, sinh trưởng và tổng hợp lysine hầu như không thay đổi. Từ kết quả này, môi trường có hàm lượng urê 7,4 và 10 g/L dịch thủy phân cá sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu lên men.

Lên men phụ phẩm cá làm cơ chất cho *C. glutamicum* mang đến hiệu quả sinh tổng hợp lysine (30 g/L) khi so sánh ngang với cao nấm men làm cơ chất cung cấp nguồn nitơ – một cơ chất phổ biến nhưng đắt tiền được sử dụng thông dụng trong lên men vi sinh vật [5, 19]. Nghiên cứu của Coello và cs (2002) [5] đã thu được sản lượng lysine 34,38 g/L, cao hơn so với sản lượng ban đầu khi mới phân lập là 13,22 g/L khi sử dụng bột phụ phẩm cá ủ chua bổ sung vào môi trường tối ưu với hàm lượng 65 g/L. Nghiên cứu này chứng minh rằng, sự có mặt của bột phụ phẩm cá ủ chua có tác dụng tích cực đến quá trình sinh tổng hợp lysine của tế bào chủng *C. glutamicum* GIGO đã sử dụng. Ngược lại, amonium sulfate làm giảm đáng kể sản lượng lysine sinh tổng hợp được [5].

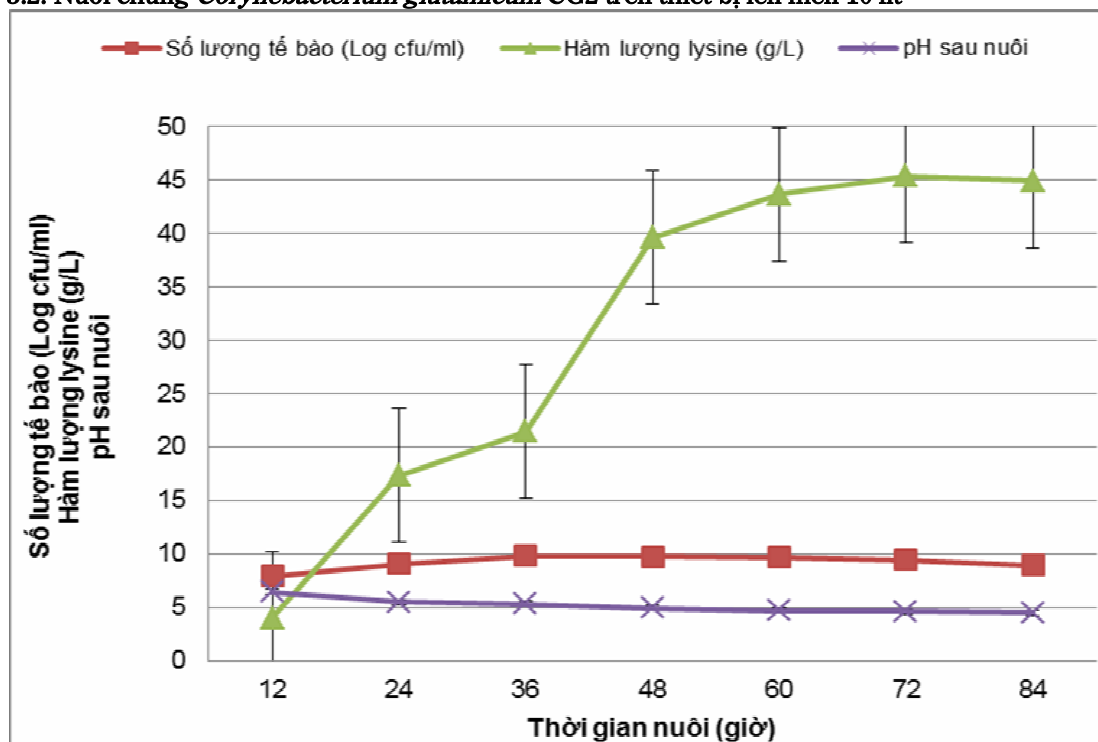


Hình 4. Tỷ lệ dịch thủy phân cá thích hợp



Hình 5. Tỷ lệ urê thích hợp

3.2. Nuôi chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 trên thiết bị lên men 10 lít



Hình 6. Nuôi chủng *Corynebacterium glutamicum* CG2 trên thiết bị lên men 10 lít

Để khẳng định kết quả lựa chọn nguồn nitơ môi trường trên, chủng vi khuẩn CG2 được nuôi trên thiết bị lên men 10 lít trong môi trường MT5 cải tiến (urê 7,4 g/L và 10 g/L dịch thủy phân cá). Hình 6 cho thấy, sự phát triển của chủng CG2 tăng dần theo thời gian đến 36 giờ, duy trì đến 60 giờ, sau đó giảm dần theo thời gian lên men. Số lượng tế bào đạt cao nhất ở 36 giờ ($6,5 \times 10^9$ cfu/mL). Đồng thời, với quá trình tăng sinh tế bào là quá trình giảm pH do sự hình thành axit hữu cơ, giá trị pH giảm dần từ 7,0 xuống dưới 5 sau 84 giờ nuôi. Hàm lượng lysine tăng nhanh đến 60 giờ nuôi đạt 43,72 g/L và tiếp tục tăng nhẹ, đạt giá trị cao nhất đến 72 giờ (45,38 g/L), sau đó duy trì và giảm nhẹ sau 84 giờ. Kết quả giảm mật độ tế bào sau 60 giờ nuôi có thể do 2 nguyên nhân, đó là sự giảm pH làm ức chế sinh trưởng, gây chết tế bào và sự cạn kiệt nguồn các - bon trong môi trường, khiến tế bào thiếu thức ăn để tăng sinh.

Chủng vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21799 đột biến được nuôi trên thiết bị lên

men 5 lít với tỷ lệ giống 5% v/v; pH 7,2; nhiệt độ 30°C; tốc độ khuấy 120 v/ph; tốc độ thổi khí 0,75 v/v/ph; đạt hàm lượng lysine 9,3 g/L [18]. Nghiên cứu công nghệ lên men tổng hợp lysine cao nhất từ chủng đột biến của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13287 trên thiết bị lên men 20 lít chứa 10 lít môi trường, bổ sung 0,75 lít giống, pH 7,5 - 8; nhiệt độ 28 - 30°C, tốc độ sục khí 1,0 (v/ph); tốc độ khuấy 7,1 hz, thời gian 72 giờ đạt 41,1 g/L [20].

4. KẾT LUẬN

Khả năng sinh trưởng và tổng hợp lysine của chủng vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* CG2 đã được tăng cường khi tối ưu nguồn nitơ trong thành phần môi trường bằng sự kết hợp các nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ rẻ tiền. Nguồn nitơ tốt nhất cho sự sinh trưởng và tổng hợp lysine của chủng CG2 trong môi trường có hàm lượng urê 7,4 g/L và 10 g/L dịch thủy phân cá, hàm lượng lysine đạt 45,38 g/L khi nuôi trên thiết bị lên men 10 lít.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của dự án “Hoàn thiện công nghệ sản xuất thức ăn nuôi thủy sản giàu lysine từ phế phụ phẩm cá tra” thuộc Đề án Phát triển và Ứng dụng Công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến của Bộ Công thương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anastassiadis S (2007). L-lysine fermentation. *Recent patents on Biotechnology* 1(1): 11 - 24.
2. Bisaria R, Madan M, Vasudevan P (1997). Utilisation of agro-residues as animal feed through bioconversion. *Bioresource Technology* 59, 5 - 8.
3. Vecht-Lifshitz S. E., Almas K. A., and Zomer E (1990). Microbial growth on peptones from fish industrial wastes. *Lett. Appl. Microbiol*, 10, 183 - 186.
4. Vázquez J. A., Durán A. I., Mendiña A and Nogueira M (2020). Biotechnological Valorization of Food Marine Wastes: Microbial Productions on Peptones Obtained from Aquaculture By-Products, *Biomolecules*, 10(8): 1184.
5. Coello N., Montiel E., Concepcion M and Christen P (2002). Optimisation of a culture medium containing fish silage for L L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource Technology*, 85: 207 - 211.
6. Jaziri A. A., Setijawati D, Yufidasari H. S., Pratomo M. D., Wardani D. W., Ersyah D and Huda N (2020). Characteristics of peptones from grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) and parrotfish (*Scarus javanicus*) head by-products as bacterial culture media. *Journal of Biotech Research*, 11: 1 - 12.
7. Trần Thị Minh Tâm và Nguyễn Thuý Hương (2009). Tối ưu quá trình lên men thu nhận amino axit L-lysine từ vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* VTCC-B-0656. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học tự nhiên và Công nghệ*, 25: 172 - 178.
8. Burdass D., Grainger J., and Hurst J. (2016). Basic practical microbiology - A manual. *Microbiology society*, 40pp.
9. Hsieh C. L., Hsiung K. P and Sut J. C (1995). Determination of Lysine with Ninhydrin-Ferric Reagent. *Analytical Biochem*, 224(1): 187-189.
10. Moosavi-Nasab M., Ansari S., and Montazer Z (2007). Fermentative Production of Lysine by *Corynebacterium glutamicum* from Different Carbon Sources. *Iran Agricultural Research*, 25(2): 99 - 106.
11. Irshad S, Hashmi A. S., Javed M. M., Babar M. E., Awan A. R and Anjum A. A (2015). Optimization of physico-chemical parameters for hyper- production of lysine by mutated strain of *Brevibacterium flavum*. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(3): 784 - 791.
12. Rehman H. U., Hameed A and Ahmed A (2012). Selection and Characterization of a Lysine Yielding Mutant of *Corynebacterium glutamicum* – a Soil Isolate from Pakistan. *Pakistan Vet. J.*, 32 (1): 20 - 24.
13. Ali S., Ahmed S., Sheikh M. A., and Hashmi A. S. (2009). Lysine production by L-homoserine resistant mutant of *Brevibacterium flavum*. *J. Chem. Soc. Pakistan*, 31(1): 97 - 102.
14. Sattar M., Ahmed S., Sheikh M. A., and Hashmi A. S (2008). Fermentation of yeast sludge with *Brevibacterium flavum* to enhance lysine concentration. *J. Chem. Soc. Pakistan*, 30 (4): 642 - 648.
15. Sezonov G., Joseleau-Petit D. and Ari R. D. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.*, 189: 8746 - 8749.
16. Young T. K., and Chipley J. R (1983). Microbial production of lysine and

threonine from whey permeate. *Applied Environ. Microbiol.*, 45: 610 - 615.

17. Kind S., Becker J. and Wittmann C (2013). Increased lysine production by flux coupling of the tricarboxylic acid cycle and the lysine biosynthetic pathway - Metabolic engineering of the availability of succinyl-CoA in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 15: 184 - 195.

18. Junior L., Alberto L., Letti G. V and Soccol C. R (2016). Development of an L-Lysine Enriched Bran for Animal Nutrition via Submerged Fermentation by *Corynebacterium glutamicum* using Agroindustrial Substrates. *Brazilian*

Archives of Biology and Technology volume 59. Doi.org/10.1590/1678-4324-2016150519.

19. Coello N., Brito L and Nonus M (2000). Biosynthesis of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum* grown on fish silage. *Bioresource technology* 73 (3): 221 - 225.

20. Pelechová J., Smékal F., Koura V., Plachý J. and Krumphanzl V. (1980). Biosynthesis of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum* on sucrose, ethanol and acetic acid, *Folia Microbiol (Praha)*, 25 (4): 341 - 346.

RESEARCH OF OPTIMIZATION OF NITROGEN COMPOSITIONS FOR L-LYSINE PRODUCING MEDIUM BY *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* CG2

Bui Trong Tam¹, Pham Thi Mat¹, Nguyen Thi Duyen¹, Nguyen Huu Hoang¹

¹*Research Institute for Marine Fisheries*

Summary

L-Lysine is an essential amino acid added as supplement for aquatic feed and is produced mainly by microbial fermentation. Medium composition is a very important factor, influencing the fermentation of L-Lysine-producing bacteria. Nitrogen source is usually the most high-priced constituent of bacterial growth media. The nitrogen contents of medium for *Corynebacterium glutamicum* CG2 growth was optimized targeting enhanced L-Lysine production were tested and selected, including inorganic and organic nitrogen sources of single, mixture and the ratio of their compounds. Maximum concentration of lysine was 45.7g/L with the optimized nitrogen formulated media (urea -7.4g/l and fish hydrolysates -10g/l) when cultured in a 10L bioreactor.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, fish hydrolysates, lysine, nitrogen sources.

Ngày nhận bài: 6/6/2024

Ngày chuyển phản biện: 9/7/2024

Ngày thông qua phản biện: 12/8/2024

Ngày duyệt đăng: 30/12/2024