

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHỦNG VI KHUẨN SHEWANELLA BALTICA M37 SẢN SINH TETRODOTOXIN PHÂN LẬP TỪ CÁ NÓC ĐỘC VIỆT NAM

ThS BÙI THỊ THU HIỀN

Viện Nghiên cứu Hải sản

PGS.TS KHUẤT HỮU THANH

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Tối ưu hóa khả năng sinh tetrodotoxin (TTX) của chủng *Shewanella baltica* M37 được thực hiện theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm nhiều yếu tố, sử dụng kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của các yếu tố đơn lẻ. Trong bài toán tối ưu, các yếu tố được khảo sát đồng thời ở các khoảng biến thiên nhất định, gồm: pH môi trường, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, nồng độ chất bổ sung. Với hàm mục tiêu là khả năng sinh TTX của chủng *Shewanella baltica*, điều kiện nuôi cấy tối ưu được xác định như sau: pH = 6,3; nhiệt độ 24,6°C; thời gian lên men 89 giờ; nồng độ chất bổ sung là 7,3% thì hàm lượng TTX thu được cao nhất (tăng 11,6% so với khi chưa tối ưu hóa điều kiện nuôi).

Từ khóa: TTX, *Shewanella baltica*, tối ưu hóa, vi khuẩn sinh TTX.

STUDY ON OPTIMIZATION OF CULTURE
CONDITIONS FOR TETRODOTOXIN PRODUCING
BACTERIUM STRAIN SHEWANELLA BALTICA M37
ISOLATED FROM TOXIC PUFFERFISHES IN VIETNAM

Summary

Optimizing tetrodotoxin (TTX) productivity of *Shewanella baltica* M37 has been conducted under the multivariate experimental planning method based on data recording the impact of each factor. In the optimization topic, all factors have been investigated simultaneously within the fixed intervals, including pH of medium, temperature, duration of cultivation, and concentration of supplemental substance.

For the best growth of *Shewanella baltica* M37, optimal culture conditions are as follows: pH = 6.3, temperature = 24.6°C, duration = 3.7 days, concentration of supplemental substance = 7.3%, so that the TTX concentration will be obtained at the highest value (11.6% higher than the control conditions do).

Keywords: Tetrodotoxin, *Shewanella baltica*, optimization, pufferfishes, Vietnam.

Đặt vấn đề

TTX là một độc tố sinh học cực mạnh được chiết xuất chủ yếu từ cá nóc độc, động vật biển và một số chủng vi sinh vật. Trong những năm gần đây, TTX đã được nghiên cứu sử dụng làm thuốc gây tê, gây mê... ở nhiều nước như Canada, Mỹ, Trung Quốc... Ở nước ta, Dư Đình Động và cộng sự nghiên cứu thành công việc sử dụng TTX kết hợp với bài thuốc dân tộc cổ truyền để làm thuốc cai nghiện, đã được tiến hành thử nghiệm trên các bệnh nhân cho kết quả khả quan (Đào Cẩm Tú, 2009).

Những năm trước đây, để đáp ứng nhu cầu của thị trường, một số nghiên cứu đã sinh tổng hợp TTX theo phương pháp hoá học. Tuy nhiên, giá thành của sản phẩm TTX tổng hợp hoá học cao, độ tinh sạch thấp, không kinh tế bằng phương pháp tách chiết TTX trực tiếp từ cá nóc độc. Vì vậy, TTX được tách chiết chủ yếu từ cá nóc độc hoặc động vật biển, nhưng trữ lượng của các loài cá nóc độc ngày càng giảm, trong khi nhu cầu tiêu thụ TTX lại

ngày càng tăng (Yu Chun-Fai et al, 2004).

Gần đây, các nghiên cứu thu nhận TTX từ vi sinh vật đã mở ra một triển vọng mới trong công nghệ sinh học. Hướng nghiên cứu cho phép chủ động sản xuất TTX trong phòng thí nghiệm hoặc ở quy mô công nghiệp, độ tinh sạch cao, giảm được giá thành... Xuất phát từ ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn, đề tài “Nghiên cứu công nghệ nuôi cấy và thu nhận TTX từ một số chủng vi khuẩn phân lập từ cá nóc độc Việt Nam” được triển khai. Tuy nhiên, để nâng cao khả năng sinh TTX của vi khuẩn, cần nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy. Bài báo này là kết quả nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy vi khuẩn *Shewanella baltica* sinh TTX.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Chủng vi khuẩn *Shewanella baltica* M37 có khả năng sinh TTX được phân lập từ cá nóc *Takifugu oblongus*.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định TTX bằng HPLC: phân tích độc tố TTX bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC) với các điều kiện sau (Masaaki Kodama, Shigeru Sato, 2005): Detector huỳnh quang, cột C18, pha động là HFBA 0,06 M/Amoni acetat 0,05 M (bơm 1), tốc độ dòng là 0,4 ml/phút, NaOH 4N (bơm 2), reaction coil: 0,5 mm x 2 m/130°C, bước sóng: kích thích 365 nm; phát xạ: 510 nm.

Tối ưu hóa điều kiện nuôi vi khuẩn sinh TTX theo đường dốc của Box - Wilson: sau khi khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men vi khuẩn, tiến hành nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện nuôi vi khuẩn để tăng hàm lượng TTX. Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp quy hoạch trực giao cấp 2, tối ưu hóa khả năng sinh độc tố của chủng vi khuẩn *Shewanella baltica* M37 theo phương pháp lên dốc của Box - Wilson (Nguyễn Doãn Ý, 2009). Các yếu tố biến đổi cần tối ưu gồm: pH, nhiệt độ, thời gian và nồng độ chất bổ sung.

Tại các điều kiện tối ưu đã xác định theo mô hình lý thuyết, tiến hành thí nghiệm nuôi vi khuẩn sinh TTX. Kiểm tra hàm lượng TTX từ dịch nuôi vi khuẩn bằng HPLC. So sánh với hàm lượng TTX từ mô hình tối ưu hóa để tính được hiệu suất thực tế.

Kết quả và thảo luận

Chọn miền khảo sát

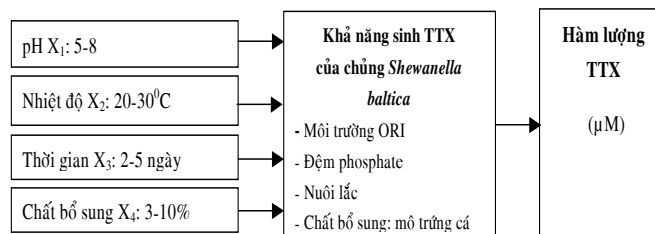
Để tối ưu hóa khả năng sinh TTX của chủng *Shewanella baltica* M37 theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm nhiều yếu tố, sử dụng kết quả

khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn lẻ (Bùi Thị Thu Hiền và cs, 2012). Trong bài toán tối ưu, các yếu tố được khảo sát đồng thời ở các khoảng biến thiên nhất định, gồm: pH môi trường, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, nồng độ chất bổ sung. Hàm mục tiêu là khả năng sinh độc tố TTX của chủng *Shewanella baltica* M37 trong quá trình nuôi cấy. Ma trận thực nghiệm được bố trí như sau:

Các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng sinh TTX của chủng *Shewanella baltica* được mô tả theo sơ đồ:

Các yếu tố ảnh hưởng

Hàm mục tiêu



Với 4 yếu tố cần tối ưu ($k = 4$), số thí nghiệm cần tiến hành là

$$N = 2^{k-p} + 2k + 1 = 2^4 + 8 + 1 = 25$$

Thiết lập mô hình

Đưa thêm vào ma trận trên cột biến ảo $x_0 = +1$ ta có bảng ma trận thực nghiệm với biến ảo (bảng 1).

Bảng 1: bảng ma trận thực nghiệm với biến X

N	X_0	X_1	X_2	X_3	X_4	Y
1	1	-1	-1	-1	-1	0,387
2	1	1	-1	-1	-1	0,436
3	1	-1	1	-1	-1	0,474
4	1	1	1	-1	-1	0,451
5	1	-1	-1	1	-1	0,537
6	1	1	-1	1	-1	0,495
7	1	-1	1	1	-1	0,578
8	1	1	1	1	-1	0,521
9	1	-1	-1	-1	1	0,645
10	1	1	-1	-1	1	0,585
11	1	-1	1	-1	1	0,645
12	1	1	1	-1	1	0,609
13	1	-1	-1	1	1	0,738
14	1	1	-1	1	1	0,697
15	1	-1	1	1	1	0,789
16	1	1	1	1	1	0,730
17	1	0	0	0	0	0,725
18	1	1,41	0	0	0	0,178
19	1	-1,41	0	0	0	0,465
20	1	0	1,41	0	0	0,212
21	1	0	-1,41	0	0	0,716
22	1	0	0	1,41	0	0,778
23	1	0	0	-1,41	0	0,724
24	1	0	0	0	1,41	0,771
25	1	0	0	0	-1,41	0,726

Tính các hệ số của phương trình hồi quy:

$$b_0 = 0,584; b_1 = -0,034; b_2 = -0,022; b_3 = 0,047; b_4 = 0,081$$

Phương trình hồi quy tuyến tính dạng rút gọn là:

$$Y = 0,584 - 0,034X_1 - 0,022X_2 + 0,047X_3 + 0,081X_4$$

Để viết phương trình hồi quy đầy đủ, cần xác định các hiệu ứng tương tác đôi và ba giữa các yếu tố và tính các hệ số $b_{11}; b_{12}; b_{13}; \dots$

$$b_{11} = -0,136; b_{12} = -0,005; b_{13} = 0,008; b_{14} = -0,015; b_{22} = -0,065; b_{23} = 0,002; b_{24} = -0,004; b_{33} = 0,079; b_{34} = 0,005; b_{44} = 0,078$$

Kiểm định tính ý nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi quy: bố trí 3 thí nghiệm song song trong cùng một điều kiện, theo các điều kiện ở tâm phương án. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: ma trận thực nghiệm ở tâm phương án

No	Y_0 (TTX)	$\bar{Y}_0$	$Y_0 - \bar{Y}_0$
26	0,681	0,719	-0,038
27	0,758	0,719	0,038
28	0,691	0,719	-0,028
29	0,747	0,719	0,027

Phương sai tái hiện: $S^2_{th} = 0,0015$

$$\Rightarrow S_{th} = 0,038; S_{b_0} = 0,0078; S_{b_j} = 0,087; S_{b_{ij}} = 0,0097; S_{b_{ij}} = 0,0137$$

Tra bảng tiêu chuẩn student với $\alpha = 0,05$, bậc tự do $f = 4$ ta có: $t^3_{0,95} = 2,35$. Ứng với độ tin cậy là 95%, các hệ số tương tác của các yếu tố bị loại khỏi phương trình hồi quy. Phương trình hồi quy tuyến tính đầy đủ có dạng:

$$Y = 0,584 - 0,034X_1 - 0,022X_2 + 0,047X_3 + 0,081X_4 - 0,136X_1^2 - 0,065X_2^2 + 0,079X_3^2 + 0,078X_4^2 (*)$$

Kiểm định sự tương thích của phương trình hồi quy (*) theo tiêu chuẩn Fisher:

Ta có: $S_{du}^2 = 0,012$, $S_{th}^2 = 0,0015$ vậy $F = 7,998$

Tra bảng tiêu chuẩn Fisher với $p = 0,05$; $f_1 = 16$; $f_2 = 3$ có: $F_{(0,05; 16; 3)} = 8,6 > F = 7,998$.

Nhìn vào phương trình hồi quy (*) ta có:

- Hệ số $b_1 = -0,034$, $b_2 = -0,022 < 0$, trong vùng quy hoạch, pH và nhiệt độ của môi trường nuôi cấy tỷ lệ nghịch với hàm lượng TTX, khi nhiệt độ và pH của môi trường nuôi cấy tăng cao, khả năng sinh TTX của chủng M37 sẽ giảm. Do pH môi trường

tăng cao, môi trường có tính kiềm sẽ hạn chế khả năng hoạt động của chủng M37; nhiệt độ càng tăng, khả năng hoạt động của M37 giảm, khả năng sinh tổng hợp TTX giảm.

- Hệ số $b_3 = 0,047$, $b_4 = 0,081 > 0$: trong vùng quy hoạch, các yếu tố thời gian nuôi cấy, nồng độ chất bổ sung tăng tỷ lệ thuận với khả năng sinh tổng hợp TTX của chủng M37. Khi tăng hàm lượng chất bổ sung, khả năng hoạt động của chủng sẽ mạnh, lượng độc tố TTX sinh ra càng nhiều. Kéo dài thời gian nuôi cấy, đồng thời tăng nồng độ chất bổ sung thích hợp làm tăng khả năng sinh tổng hợp TTX của chủng M37, hàm lượng TTX thu được tăng theo thời gian nuôi cấy.

Trong 4 yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh TTX, yếu tố nồng độ chất bổ sung có ảnh hưởng mạnh nhất, tiếp theo là yếu tố thời gian, nhiệt độ và pH môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, tăng nồng độ chất bổ sung sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế của quá trình lên men thu TTX của chủng M37.

Tối ưu hóa khả năng sinh độc tố TTX của chủng *Shewanella baltica* M37 theo phương pháp lên dốc của Box - Wilson

Để thực hiện được quá trình tối ưu hóa theo Box - Wilson, cần tính được các giá trị $lb_i\Delta_i$ và tìm ra giá trị lớn nhất: $lb_1\Delta_1 = 0,051$; $lb_2\Delta_2 = 0,109$; $lb_3\Delta_3 = 0,07$; $lb_4\Delta_4 = 0,284$ (đạt giá trị lớn nhất). Chọn X4 làm biến cơ sở và chọn cho biến cơ sở một bước nhảy thích hợp là $\delta_4 = 0,2\%$. Bước chuyển động của các yếu tố còn lại được tính theo công thức:

$$\delta_i = b_i\Delta_i * \delta_{cs}/b_{cs}\Delta_{cs}$$

Bố trí các mẫu nuôi cấy với các điều kiện ở mức cơ sở và các bước nhảy đã tính và chọn ở trên ta thu được kết quả ghi trong bảng 3.

Bảng 3: tối ưu hóa theo đường dốc của Box - Wilson

Tên	pH X_1	Nhiệt độ X_2 (°C)	Thời gian X_3 (ngày)	Nồng độ mô trùn cá nóc độc X_4 (%)	TTX (μ M)
Mức cơ sở	6,5	25	3,5	6,5	
Hệ số b_j	-0,034	-0,022	0,047	0,081	
Khoảng biến thiên	1,5	5	1,5	3,5	
$b_j \cdot \#j$	-0,051	-0,109	0,070	0,284	
Bước $\#j$	-0,0356	-0,0764	0,0491	0,2	
Làm tròn	-0,05	-0,1	0,05	0,2	
TN 30	6,45	24,9	3,55	6,7	0,703 ^a
TN 31	6,4	24,8	3,6	6,9	0,734 ^b
TN 32	6,35	24,7	3,65	7,1	0,785 ^c
TN 33	6,3	24,6	3,7	7,3	0,787^c
TN 34	6,25	24,5	3,75	7,5	0,750 ^d
TN 35	6,2	24,4	3,8	7,7	0,723 ^e
TN 36	6,15	24,3	3,85	7,9	0,693 ^f

Kết quả bảng 3 cho thấy, có sự sai khác đáng kể giữa các mẫu khi tối ưu theo đường dốc. Phân tích ANOVA cho thấy giữa cặp mẫu TN32 - TN33 không có sự khác biệt về hàm lượng TTX thu được từ điều kiện nuôi cấy. Các thí nghiệm còn lại có sự khác biệt đáng kể về hàm lượng TTX thu được từ các môi trường nuôi cấy.

Với hàm mục tiêu là khả năng sinh TTX của chủng *Shewanella baltica*, điều kiện nuôi cấy tối ưu được xác định như sau: pH = 6,3; nhiệt độ 24,6°C; thời gian 89 giờ; nồng độ mô cá nóc độc bổ sung là 7,3% thì hàm lượng TTX thu được cao nhất, theo mô hình lý thuyết có thể tăng 25,9% so với khi chưa tối ưu hóa điều kiện nuôi, từ 0,548 µM lên 0,690 µM (đã trừ đi hàm lượng TTX bổ sung từ mô trứng cá nóc).

Kiểm định mô hình tối ưu khả năng sinh TTX của chủng M37 bằng thực nghiệm

Chúng tôi tiến hành kiểm định khả năng sinh TTX của chủng M37 với các thí nghiệm trong thiết bị lên men 5 lít/mê. Các thông số công nghệ: môi trường ORI, pH = 6,3 ổn định bằng đệm phosphat, nhiệt độ nuôi cấy 24,6°C, thời gian nuôi 89 giờ, nồng độ mô trứng cá nóc bổ sung 7,3% (khoảng 31,05 µg/lít TTX), tốc độ khuấy 200 v/phút, tỷ lệ cấp giống 2%. Sau mỗi 10 giờ lên men lấy mẫu phân tích hàm lượng TTX.

Bảng 4: thử nghiệm lên men sinh tổng TTX

Thời gian lên men (giờ)	Hàm lượng độc tố (µg/lít)			
	TTX	Epi - TTX	Anhy - TTX	Tổng TTX
0	30,92	0,02	0,11	31,05
10	54,85	0,13	0,25	55,23
20	98,81	0,19	0,31	99,31
30	125,14	0,28	0,55	125,97
40	137,97	0,32	0,61	138,9
50	155,82	1,19	0,77	157,78
60	163,78	2,38	1,02	167,18
70	170,97	3,19	2,08	176,24
80	184,48	3,33	2,21	190,02
90	219,92	3,65	2,55	226,12
100	219,52	3,68	3,03	226,23

Kết quả bảng 4 cho thấy, tại điều kiện tối ưu, chủng M37 sinh tổng hợp TTX bắt đầu tăng mạnh tại thời gian 20 giờ và đạt nồng độ cao nhất là 90 giờ lên men, sau đó ổn định không tăng. Vì pH luôn được ổn định trong quá trình lên men nên không ảnh hưởng tới sự chuyển hóa các dẫn xuất của TTX. Khả năng tích lũy hàm lượng TTX càng nhiều

khi càng kéo dài thời gian lên men. Tuy nhiên, để quá trình lên men đạt hiệu quả cao, cần dừng thí nghiệm tại thời điểm hàm lượng TTX cao nhất để giảm chi phí lên men. Hàm lượng TTX thu được sau 89 giờ lên men là 226,12 - 31,05 = 195,07 µg/lít.

Hiệu quả tối ưu hóa điều kiện nuôi chủng M37 thu được hàm lượng TTX cao hơn 20,27 µg/lít (195,07 µg/l - 174,8 µg/l = 20,27 µg/l) so với thí nghiệm nuôi cấy chủng chưa tối ưu hóa. Sau tối ưu hóa, hàm lượng TTX từ dịch nuôi chủng M37 tăng 11,6% so với khi chưa tối ưu hóa. Tuy nhiên, hàm lượng TTX thu được trong mô hình tối ưu hóa thực nghiệm chỉ đạt 88,7% so với mô hình lý thuyết (thực nghiệm 195,07 µg/l, lý thuyết 220 µg/l).

Kết luận

Sau quá trình quy hoạch thực nghiệm, các điều kiện tối ưu hóa nuôi cấy của chủng *Shewanella baltica* M37 được xác định như sau: pH = 6,3; nhiệt độ 24,6°C; thời gian 89 giờ; nồng độ mô cá nóc độc bổ sung là 7,3%, tốc độ khuấy 200 v/phút, tỷ lệ cấp giống 2% thì hàm lượng TTX thu được cao nhất. Theo mô hình lý thuyết có thể tăng 25,9% so với khi chưa tối ưu hóa điều kiện nuôi. Tuy nhiên, khi kiểm định mô hình lý thuyết, mô hình tối ưu hóa thực nghiệm đạt 88,7%, nghĩa là tăng 11,6% hàm lượng TTX so với khi chưa tối ưu ■

Tài liệu tham khảo

1. Bùi Thị Thu Hiền và cs (2012), Nghiên cứu nuôi cấy và phân lập vi sinh vật sản sinh TTX từ cá nóc độc Việt Nam và tách chiết TTX. Báo cáo tổng kết đề tài thuộc Chương trình công nghệ sinh học, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.
2. Đào Cẩm Tú (2009), Căn cứ khoa học của thuốc cai nghiện Thiên Thanh Hoàn. Báo An ninh thế giới số 789 ra ngày 27.6.2009.
3. Nguyễn Doãn Ý (2009) Xử lý số liệu thực nghiệm trong kỹ thuật. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, 2009.
4. Masaaki Kodama, Shigeru Sato (2005). Manual for Food Hygiene TTX. Manual for food safety, Shyokuhin Eiseikensasisin, pp. 661-666.
5. Yu Chun-Fai, Yu Peter Hoi-Fu, Pui-Ling Chan, Qun Yan, Po-Keung Wong (2004) Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes. *Toxicon.*, 44, pp 641-647.