

NGHIÊN CỨU XỬ LÝ VÀ BẢO QUẢN MÀNG BACTERIAL CELLULOSE (BC)
TỪ CHỦNG VI KHUẨN *ACETOBACTER XYLINUM*

LÔ THỊ BẢO KHÁNH, DƯƠNG MINH LAM

Đại học Sư phạm Hà Nội

ĐINH THỊ KIM NHUNG

Đại học Sư phạm Hà Nội 2

NGUYỄN THỊ THÙY VÂN

Học viện Cảnh sát Nhân dân

Bỏng là một tai nạn thường gặp trong lao động và sinh hoạt hàng ngày. Ngoài làm tổn thương da, trường hợp bỏng nặng có thể còn gây rối loạn nội tạng, để lại di chứng nặng đến khả năng vận động, thẩm mỹ và sức khoẻ của người bệnh. Hiện nay, có nhiều nghiên cứu về điều trị bỏng, một trong những hướng nghiên cứu điều trị bỏng đang được quan tâm là sử dụng màng sinh học điều trị bỏng từ vi khuẩn có tên gọi Bacterial Cellulose (BC). Màng sinh học BC cấu tạo bởi những chuỗi polymer 1,4 - glucopyranose mạch thẳng được tổng hợp từ một số loài vi khuẩn, đặc biệt là chủng vi khuẩn *Acetobacter xylinum* có khả năng tổng hợp cellulose hiệu quả nhất.

Ở Việt Nam, hầu hết các loại màng đắp lên vết thương hở để điều trị bỏng phải nhập ngoại với giá thành cao. Trong khi đó, màng sinh học BC có thể sản xuất trong nước bằng phương pháp lên men từ vi khuẩn *Acetobacter xylinum* trong môi trường lỏng. Việc nghiên cứu quá trình tạo màng BC, xây dựng và hoàn thiện quy trình xử lý và bảo quản, sản xuất, ứng dụng điều trị bỏng đang là một đòi hỏi cấp thiết hiện nay.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi khuẩn *Acetobacter xylinum* BHN2 nhận được từ Bộ môn Công nghệ sinh học - Vi sinh, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội. Động vật thử nghiệm là thỏ nhà khoẻ mạnh, trọng lượng từ 1,5 - 2 kg đã ổn định về các chỉ tiêu sinh lý. Các môi trường giữ giống (MT1), nhân giống (MT2), lên men và môi trường nuôi cấy vi sinh vật kiểm định.

Sử dụng các phương pháp vi sinh như lên men mà ng, quan sát ở bào bằng nhuộm Gram, xác định số lượng tế bào vi sinh vật (đếm khuẩn lạc, xác định số lượng vi sinh vật bằng đo OD...) và phương pháp bảo quản chủng giống.

Quan sát cấu trúc màng dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM). Các phương pháp xác định trọng lượng khô, ướt, độ ẩm, khả năng chịu lực của màng BC.

Màng BC có bản chất là cellulose liên kết với các tế bào vi khuẩn, màng thường có mùi khi mới tạo ra, nên cần phải xử lý. Màng được xử lý theo phương pháp Mercer, trong đó có bước ngâm màng trong NaOH để tăng độ bám bề mặt sợi giúp tăng độ bám dính cơ học. Hiệu quả xử lý phụ thuộc vào nồng độ dung dịch, thời gian và nhiệt độ xử lý. Màng sau khi xử lý sẽ được bảo quản theo hướng tạo ra sự đa dạng của sản phẩm và kéo dài hạn sử dụng của màng. Màng BC sau xử lý và bảo quản được sử dụng làm thí nghiệm theo các tiêu chí của vật liệu trị bỏng như khảo sát khả năng thấm hút (với nước, với thuốc trị bỏng, dịch rỉ của vết thương...), độ thông thoáng, khả năng ngăn cản vi khuẩn của màng từ bên ngoài, tính kích ứng, khả năng bám dính của màng. Thử nghiệm tính kích ứng da của màng BC được tiến hành trên thỏ: Dùng dao cạo sạch lông ở lưng thỏ khoảng 10 cm, sát trùng bằng cồn 70%, đặt một miếng màng BC vào vùng da thử trong 4 giờ, sau đó bóc màng, rửa sạch vùng da bằng nước cất. Đánh giá phản ứng trên chỗ da đặt màng BC xem mức độ kích ứng gây ban đỏ hay có trầy xước sau 4 giờ - 12giờ - 24 giờ - 48 giờ.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Quá trình lên men tạo màng

Tiến hành nuôi cấy chủng *A. xylinum* trong các môi trường dịch thể có thành phần và điều kiện môi trường (nhiệt độ, pH...) khác nhau, đã lựa chọn được thành phần môi trường thích hợp nhất cho quá trình tạo màng bao gồm: Glucose 20g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g, KH_2PO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, nước dừa già 1 lit, thời gian 5 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ phòng, pH = 5. Màng BC có độ dày khác nhau từ 1- 4 mm.

Màng BC được xử lý với dung dịch NaOH và acid citric. Tìm điều kiện tối ưu cho việc xử lý màng bằng cách thay đổi các yếu tố như thời gian, nồng độ dung dịch và nhiệt độ xử lý màng. Nhìn chung, nếu nồng độ NaOH cao, thời gian xử lý dài, màng sẽ bị mủn, độ dai kém và mỏng đi, nhưng nồng độ NaOH thấp, màng vẫn có màu vàng, không đạt độ cảm quan.

Quy trình được lựa chọn để xử lý màng BC bao gồm 5 bước được trình bày tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1

Quy trình xử lý màng BC

Bước	Cách xử lý	Kết quả
1.	Rửa sạch bằng nước máy nhiều lần	Loại bỏ bớt acid acetic và các thành phần dư từ môi trường
2.	Đun với NaOH 3% ở 100°C trong thời gian 10 phút	Màng có màu vàng sậm, mùi khét
3.	Trung hoà bằng acid citric loãng	Màng từ vàng sậm chuyển sang trắng trong
4.	Ngâm lại với NaOH 3% ở nhiệt độ phòng	Màng BC trắng trong, không mùi, đạt cảm quan
5.	Trung hoà lại bằng acid citric loãng	Màng BC trắng trong

Sau khi xử lý như trên, màng được bảo quản theo các cách sau:

+ *Cách 1*: Sấy loại bớt nước trong màng đến độ ẩm khoảng 50% - 60%, sau đó hấp vô trùng, tẩm với dịch mật ong trong thời gian 12 giờ. Đóng gói chế phẩm trong túi nilon, hút chân không.

+ *Cách 2*: Sấy loại bớt nước trong màng đến độ ẩm 50% - 60%, hấp vô trùng, tẩm với dung dịch Becberin clorid 0,1% và mật ong trong thời gian 12 giờ. Đóng gói chế phẩm trong túi nilon, hút chân không.

+ *Cách 3*: Sấy loại bớt nước trong màng đến độ ẩm 50% - 60%, hấp vô trùng, ngâm với dung dịch nước muối sinh lý 0,9%. Đóng gói chế phẩm trong túi nilon, hút chân không.

+ *Cách 4*: Sấy loại bớt nước của màng đến độ ẩm 30-40%. Đóng gói chế phẩm trong túi nilon, hút chân không.

Màng được bảo quản theo các mô hình mang các đặc điểm khác nhau. Hạn sử dụng của loại màng khô và màng ướt sau xử lý là 3 tháng và 6 tháng. Lưu ý mọi thao tác trên đều được tiến hành trong tủ cấy vô trùng.

Xác định độ ẩm của màng

Thay đổi nhiệt độ và thời gian xử lý để tạo màng có độ ẩm khác nhau. Nhiệt độ thích hợp để sấy màng là 40 - 50°C, tùy vào độ ẩm của màng cần sử dụng để thay đổi thời gian sấy màng.

Khả năng chịu lực của 2 loại màng khô và ướt

Độ bền cơ học của màng BC là một trong những chỉ tiêu chất lượng quan trọng để đưa màng vào ứng dụng trị bỏng. Đo khả năng chịu lực theo chiều dọc và chiều ngang của màng BC theo phương pháp ASTM D828-93 (*American society for testing and materials*) tại nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ với màng khô và ướt có độ ẩm tương ứng là 30-40% và 70-80%, kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2

Khả năng chịu lực của màng theo chiều dọc và chiều ngang

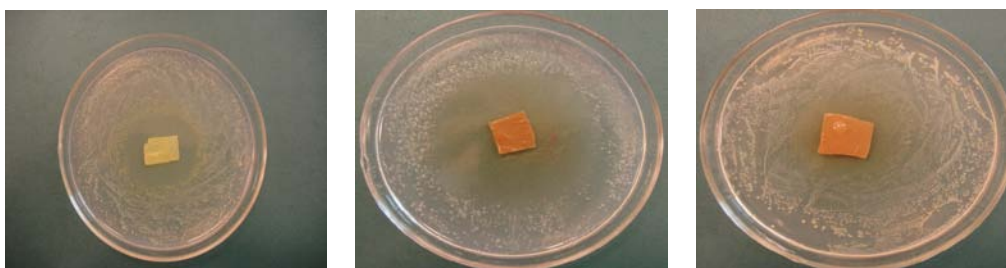
Khả năng chịu lực (N/150cm ²)	Chiều dọc	Chiều ngang
Màng khô	19,7	20,3
Màng ướt	16,5	18,9

Bảng 2 cho thấy màng khô có khả năng chịu lực tốt hơn màng dạng ướt, nhưng cả 2 loại màng này đều đáp ứng yêu cầu của vật liệu trị bỏng. Màng khô có độ dai và thời hạn sử dụng dài hơn màng ướt. Để tăng thời hạn sử dụng của màng BC, chúng tôi kiến nghị chiếu tia Gamma cho màng sau khi đóng gói.

Một số tiêu chí của màng BC đáp ứng các tiêu chuẩn của vật liệu trị bỏng

Một vật liệu sinh học trị bỏng cần các tiêu chí: vô khuẩn, không độc, không gây dị ứng, có tác dụng che phủ tạm thời vết thương, ngăn cản được vi sinh vật từ môi trường, tác dụng kích thích biểu mô phát triển, bám dính nhanh lên bề mặt vết thương mà không gây đau rát, khả năng thấm hút tốt, hút được dịch trên vết thương, dễ sử dụng và bảo quản, chế phẩm có mỹ quan và rẻ tiền.

Kết quả khảo sát một số tiêu chí của màng BC cho thấy: Màng sau khi xử lý vô trùng, tẩm mật ong và thuốc Becberin clorid 0,1% có thể kháng vi khuẩn *E. coli* và *Staphylococcus* như thể hiện tại Hình 1. Kết quả cho thấy màng BC tẩm dung dịch Becberin clorid 0,1% có tác dụng ức chế hoạt động của vi khuẩn, đặc biệt là tụ cầu khuẩn. Màng BC tẩm mật ong có tác dụng kích thích biểu mô phát triển và tạo mô hạt nhờ thành phần acid amin và các enzym trong mật ong.



Hình 1: Khả năng kháng khuẩn của màng BC tẩm becerrin clorid 0,1%, màng tẩm mật ong kháng khuẩn *E. coli* và *Staphylococcus*

Bản thạch dinh dưỡng được che phủ bởi màng BC khô không thấy xuất hiện vi sinh vật sau 4 ngày, trong khi đó bản thạch che phủ gác y tế vẫn thấy xuất hiện vi sinh vật, cho thấy màng BC khô ngăn được sự xâm nhập của vi khuẩn tạp nhiễm. Khi phủ huyền phù vi khuẩn *Pseudomonas*, nấm *Asperillus* lên bề mặt màng BC sau 4 ngày chỉ quan sát thấy các vi sinh vật này mọc trên bề mặt màng, không mọc được dưới màng BC chứa thạch dinh dưỡng.

Bảng 3

Khả năng hút nước của màng BC theo các độ ẩm khác nhau (g/cm²)

Độ ẩm màng	Sau 2h	Sau 4h	Sau 6h	Sau 12h	Sau 24h
90%	6.67	9.25	11.34	15.04	16,01
80%	5.32	6.27	7.49	11.23	12.39
70%	4.71	6.12	7.53	10.47	12.03
50%	3.52	8.53	8.57	8.35	7.34
30%	3.04	3.98	4.52	5.08	6.02
20%	2.05	2.46	3.45	3,98	4,01
0%	1.24	1.57	2.34	2.54	2.58

Khả năng thấm hút của màng có độ ẩm từ 0 - 90% được thể hiện trong Bảng 3 cho thấy màng BC có khả năng hút nước tốt, khả năng thấm hút dịch phụ thuộc vào độ ẩm ban đầu của màng.

Tính kích ứng da theo OECD 2004, kết quả được dẫn ra ở Bảng 4 cho thấy màng BC không gây kích ứng cho da lành, nên khi đắp lên vết thương hở sẽ không gây dị ứng cho da.

Bảng 4

Khả năng kích ứng của màng BC

Vùng da thử nghiệm	Lần 1 (Sau 4 giờ)	Lần 2 (Sau 12 giờ)	Lần 3 (Sau 24 giờ)	Lần 4 (Sau 48 giờ)
Gây ban đỏ	-	+	+	+
Có vết trầy xước	+	+	+	+
Phù nề, sưng tấy	+	+	+	+

Ghi chú: (-) Có ban đỏ rất nhẹ; (+) Không có hiện tượng bị kích ứng.

III. KẾT LUẬN

Xử lý màng BC bằng NaOH 3% ở 100°C trong 10 phút, sau đó ngâm cùng axit citric loãng và ngâm lại với NaOH 3% ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ là thích hợp nhất. Màng BC sấy khô trong khoảng 40-50°C có thời hạn sử dụng là 6 tháng và là cách bảo quản tốt nhất hiện nay. Màng BC sau khi được xử lý và bảo quản có nhiều đặc tính phù hợp với vật liệu trị bỏng như: khả năng thấm hút tốt, độ thông thoáng cao, có độ bền cơ học, không gây kích ứng da và có khả năng ngăn cản khuẩn tốt, giúp vết thương tránh được các vi sinh vật xâm nhập vào trong quá trình điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Brown M.R., M. Willison, C.L. Richardson**, 1976: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 37(12): 4565- 4569.
2. **Brown M.R.**, 1999: *Pure appl. Chem*, 71(5): 767-775.
3. **Huỳnh Thị Ngọc Lan, Nguyễn Văn Thanh**, 2006: *Tạp chí Dược học*, số 361.
4. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.33318/abstract>
5. <http://resources.metapress.com/pdf-preview.axd?code=g021q8w020v13231&size=largest>
6. <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/phuongphapthucnghiemdinhten.htm>
7. <http://www.hco2bsh.googlepages.com/thachdua.doc>

A STUDY ON PROCESSING AND STORING BACTERIAL CELLULOSE MEMBRANE (BC) PRODUCED FROM ACETOBACTER XYLINUM STRAINS

**LO THI BAO KHANH, DUONG MINH LAM,
DINH THI KIM NHUNG, NGUYEN THI THUY VAN**

SUMMARY

Bacterial cellulose membrane (BC) is created by the fermentation of the bacteria *Acetobacter xylinum* BHN2, *xylinum* is treated with 3% NaOH at 100°C for 10 minutes then diluted and used citric acid soaked with 3% NaOH at room temperature for 12 hours is currently the best method for preservation dried BC film. After processing and storing, has the property suitable for the treatment material of burns such as: good absorbing, high ventilation level, mechanical durability, not irritating the skin. Especially the ability of bacteriostatic can help preventing the wound from exotic bacterium during treatment. With these excellent features, the utilization of BC membrane is a new direction in producing biological membrane to treat burns.