

NGHIÊN CỨU TẠO MÀNG CELLULOSE VI KHUẨN VÀ KẾT CẤU HỆ SỢI CELLULOSE NHẪM LÀM PHÔI MẶT NẠ DƯỠNG DA

PHẠM TẤN VIỆT¹, DƯƠNG THỊ THÙY TRANG¹, TRẦN THỊ THANH TIÊN^{1,2}, NGUYỄN THỊ TƯỜNG VY¹, BÙI ĐỨC TRỌNG¹, NGUYỄN NGỌC AN¹, NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH¹

¹*Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh*

²*Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh*

nguyenthidieuhanh@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Bacterial cellulose (BC) là một loại polysaccharide được sản xuất từ nhiều loại vi sinh vật, trong đó *Acetobacter xylinum* có khả năng sản xuất BC tốt với hàm lượng cellulose cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập chủng vi khuẩn *A. xylinum* từ môi trường tự nhiên và khảo sát điều kiện sinh trưởng để hình thành màng BC ứng dụng làm phôi mặt nạ dưỡng da. Với điều kiện nhiệt độ phòng, môi trường dinh dưỡng chứa các khoáng chất và 100% nước dừa thích hợp cho sự tổng hợp màng BC sau 3 ngày trong điều kiện nuôi cấy tĩnh. Màng BC có độ dày tương đương với mặt nạ thương mại (~0,4 mm) có tính chất cơ lý tốt và độ hấp thụ nước cao với khả năng tái hấp thụ lên đến $95,76 \pm 0,35\%$. Hệ sợi cellulose của màng BC cũng được khảo sát bởi kính hiển vi điện tử quét cho thấy kết cấu bền chặt và các khoảng trống giữa hệ sợi cellulose đã giải thích được độ dẻo dai và khả năng hấp thụ của màng BC, cho thấy tiềm năng trong ứng dụng làm phôi mặt nạ dưỡng da.

Từ khóa. Cellulose vi khuẩn, *Acetobacter xylinum*, mặt nạ dưỡng da, phôi mặt nạ, điều kiện nuôi cấy.

PRE-PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE FOR FACE MASK TEMPLATE AND CHARACTERIZATION OF ITS STRUCTURE

Abstract. Bacterial cellulose (BC) is a type of polysaccharide produced from a variety of microorganisms, among which *Acetobacter xylinum* is capable of producing BC with high cellulose content. In this study, *A. xylinum* strain was isolated from natural coconut water and investigated its growth conditions to form BC membranes to be used as skin masks. At room temperature, the growth medium containing minerals and 100% coconut water is suitable for BC synthesis after 3 days under static culture conditions. The thickness of the produced cellulose membrane was equivalent to commercial coconut masks (~0.4 mm) with good mechanical strength, high-water absorption and resorption capacity up to $95.76 \pm 0.35\%$ (w/w). The cellulose fiber structure of the BC membrane is investigated by SEM imaging, which shows tight braided structure. The vacant space gap between in the cellulose fiber matrix explain the toughness and absorption capacity of the BC membrane, implying its potential for the application as skin mask template.

Key words. Bacterial cellulose, *Acetobacter xylinum*, skin mask, mask template, culture condition.

1. GIỚI THIỆU

Cellulose vi khuẩn (Bacterial Cellulose-BC) là một chuỗi polymer do các glucopyranose nối với nhau bằng liên kết β -1,4-glucan. So với cellulose thực vật, BC có độ tinh sạch cao hơn (không chứa lignin và hemicellulose), độ bền và khả năng chịu nhiệt tốt, khả năng giữ nước và hấp thụ nước cực tốt, dễ phân hủy sinh học, tái chế hay phục hồi hoàn toàn [1, 2]. Màng BC có nhiều vai trò trong sự tồn tại và phát triển của vi khuẩn trong tự nhiên. Màng BC cung cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn trong điều kiện thiếu thức ăn, đồng thời màng BC giúp tế bào vi khuẩn lơ lửng và tới được bề mặt giàu oxy, giúp cho vi khuẩn hô hấp dễ dàng hơn [3-6]. Màng BC xúc tiến sự hình thành quần thể vi khuẩn trên cơ chất và bảo vệ vi khuẩn trước những đối thủ cạnh tranh sử dụng cùng cơ chất. Ngoài ra, nhờ độ nhớt và đặc tính ưa nước của màng BC, vi khuẩn được gia tăng khả năng chống chịu với những thay đổi bất lợi của môi trường sống như giảm lượng nước, thay đổi pH, sự xuất hiện các chất độc [7] và bảo vệ vi khuẩn khỏi tác hại của tia UV [8].

Màng BC được sản xuất từ nhiều loài thuộc chi *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Sarcina* và *Agrobacterium*... theo nhiều phương thức khác nhau, trong đó loài *A. xylinum* được biết đến với đặc tính sản sinh BC nổi trội [9, 10]. Màng BC với các đặc tính vượt trội nên được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như y học, thực phẩm, mỹ phẩm,... [11]. Trong thực phẩm, sản phẩm Nata de coco được biết đến khá nhiều, có thể dùng

làm thực phẩm ăn kiêng, hỗ trợ chống lại ung thư ruột, chứng nhồi máu cơ tim và nhiều bệnh khác [12]. Trong y học, BC được dùng làm cơ sở để tạo màng sinh học trong trị bỏng, ngoài ra BC còn được nghiên cứu về hiệu ứng làm lành vết thương khi kết hợp với chitosan tan trong nước, nano bạc, hay oxide kẽm [13-16]. Trong mỹ phẩm, BC dùng làm mặt nạ dưỡng da và giúp cải thiện độ ẩm của da một cách hiệu quả [17, 18]. Ngoài ra, việc sản xuất BC trên nhiều nguồn cơ chất rẻ tiền là các dạng phế phụ liệu trong thực phẩm, nông nghiệp, công nghiệp như nguồn dinh dưỡng cũng được nghiên cứu, tạo ra sản phẩm có giá trị thực tiễn, giúp giảm thiểu chi phí trong sản xuất, tăng giá trị kinh tế và góp phần bảo vệ môi trường [19-21]. Theo xu hướng phát triển của xã hội và điều kiện cuộc sống thì nhu cầu làm đẹp ngày càng được quan tâm. Trong đó mặt nạ dưỡng da với thành phần tự nhiên luôn được ưa chuộng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập, sàng lọc và định danh chủng vi khuẩn *A. xylinum* có khả năng tổng hợp màng BC và xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình tổng hợp màng BC, cũng như các đặc tính của màng BC tạo thành. Nghiên cứu này tạo cơ sở cho việc sản xuất màng BC có tiềm năng ứng dụng trong việc tạo phôi mặt nạ dưỡng da, đạt được hiệu suất sử dụng cao, đồng thời với đặc tính dễ phân hủy sinh học, màng BC giúp giảm ô nhiễm môi trường tạo tiền đề trong sự phát triển bền vững của xã hội.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương pháp phân lập và làm thuần giống vi khuẩn *A. xylinum*

Giống vi khuẩn *A. xylinum* được phân lập và làm thuần từ môi trường nước dừa đã lên váng, được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh trường Đại học Công Nghiệp Tp. HCM. Mẫu nước dừa có váng được thu nhận và pha loãng bằng nước muối sinh lý ở các bậc pha loãng khác nhau. 0,1 ml dịch pha loãng được trải trên đĩa môi trường Hestrin-Schramm (HS) (glucose 20 g, cao nấm men 5 g, peptone 3 g, Na_2HPO_4 5,0 g, acid citric 1,15 g, agar 20,0 g, nước đủ 1000 ml, pH 6,3-6,5). Các khuẩn lạc riêng lẻ được chọn lọc, làm thuần và được nuôi tăng sinh trong môi trường HS để kiểm tra khả năng hình thành lớp màng cellulose trên môi trường. Chủng vi khuẩn có khả năng hình thành lớp màng cellulose được chọn lọc và kiểm tra các đặc điểm về hình thái cũng như trình tự đoạn gen mã hóa cho 16S-rRNA. Vi khuẩn được chọn sẽ được giữ giống trong glycerol 20% tại -60°C cho các thí nghiệm tiếp theo [2].

2.2 Định danh vi khuẩn

Chủng vi khuẩn được định danh ở mức phân tử bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA với cặp mồi 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' và chu trình PCR như sau 95°C -5 phút, 30 chu kỳ tiếp theo (95°C -30 giây; 55°C -40 giây; 72°C -90 giây) và 72°C -5 phút bởi phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học động vật (Trường Đại học Konkuk, Seoul, Hàn Quốc) và kết quả giải trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu 16S-rRNA của các vi khuẩn có sẵn trên National Center for Biotechnology Information (NCBI) bằng công cụ BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.3 Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến quá trình tạo màng cellulose của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn chọn lọc được nuôi tăng sinh trong môi trường lỏng HS tại điều kiện 37°C , lắc 150 vòng/phút trong 24 giờ và ống giống thu được sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát điều kiện sản sinh màng BC. Môi trường nước dừa được sử dụng để sản xuất màng cellulose và các nồng độ nước dừa khác nhau trong môi trường sẽ ảnh hưởng lên khả năng tạo màng cellulose của vi khuẩn. Giống vi khuẩn tăng sinh (10%) được nuôi trong môi trường tạo màng cellulose bao gồm glucose 10,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0 g/L, KH_2PO_4 2,0 g/L và bổ sung hàm lượng nước dừa ở các tỷ lệ khác nhau (10%, 20%, 40%, 60%, 80% và 100%), pH 5,5-5,7 tại nhiệt độ phòng trong điều kiện tĩnh sau 7 ngày và tiến hành kiểm tra độ dày, trọng lượng của màng cellulose tạo thành.

2.4 Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi ủ đến quá trình tạo màng BC

Thời gian nuôi ủ ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và khả năng tạo màng BC. Sau khi chọn lọc được môi trường thích hợp cho sự hình thành màng cellulose, vi khuẩn được kiểm tra khả năng tạo màng trong các khoảng thời gian khác nhau. 10% giống tăng sinh được cấy vào môi trường thích hợp, ủ trong điều kiện tĩnh, tại nhiệt độ phòng, kiểm tra độ dày, trọng lượng của màng BC tạo thành sau các khoảng thời gian nuôi ủ như 3, 4, 5, 6, 7 ngày.

2.5 Phương pháp xác định khả năng hấp thụ nước của màng BC

Màng cellulose của vi khuẩn được sản xuất trong môi trường thích hợp và thu nhận các màng có kích thước (18x22 cm) và độ dày (~0,4 mm) tương tự nhau. Các màng BC được sấy bằng cân sấy ẩm hồng ngoại ở nhiệt độ 60°C cho đến khi phần trăm khối lượng còn khoảng 50%. Màng cellulose sau sấy được tiến hành

kiểm tra khả năng hấp thụ nước bằng cách ngâm màng trong nước cất và kiểm tra khối lượng của màng sau các khoảng thời gian 6 và 12 giờ ngâm. Sự chênh lệch trọng lượng của màng cellulose trước và sau khi ngâm nước thể hiện khả năng hấp thụ của màng. Thực hiện thử nghiệm tương tự với mặt nạ thương mại sản xuất từ màng BC để làm đối chứng (Mặt nạ Coconut, Công ty TNHH chế biến sản phẩm dừa Cửu Long, 158 Nguyễn Đình Chiểu, P8, Tp. Bến Tre, Tỉnh Bến Tre, Việt Nam).

2.6 Phương pháp xác định đặc tính cơ lý của màng

Đặc tính cơ lý của màng cellulose vi khuẩn được kiểm tra theo phương pháp TPA (Texture profile analysis). Mẫu màng được cố định 2 đầu vào máy đo cơ lý Intron Universal Testing System 5543, máy sẽ tác động lực kéo tăng dần cho đến khi màng đứt ra, giá trị lực kéo sẽ được ghi nhận và hiển thị theo đơn vị N (Newton). Thí nghiệm được thực hiện với đối chứng là các mặt nạ thương mại trên thị trường với 2 loại là mặt nạ vải (Skin solution mask Wrinkle care, Công ty Innisfree, Hàn Quốc) và mặt nạ thương mại sản xuất từ màng cellulose vi khuẩn (Mặt nạ Coconut, Công ty TNHH chế biến sản phẩm dừa Cửu Long)

2.7 Quan sát cấu trúc màng cellulose của vi khuẩn

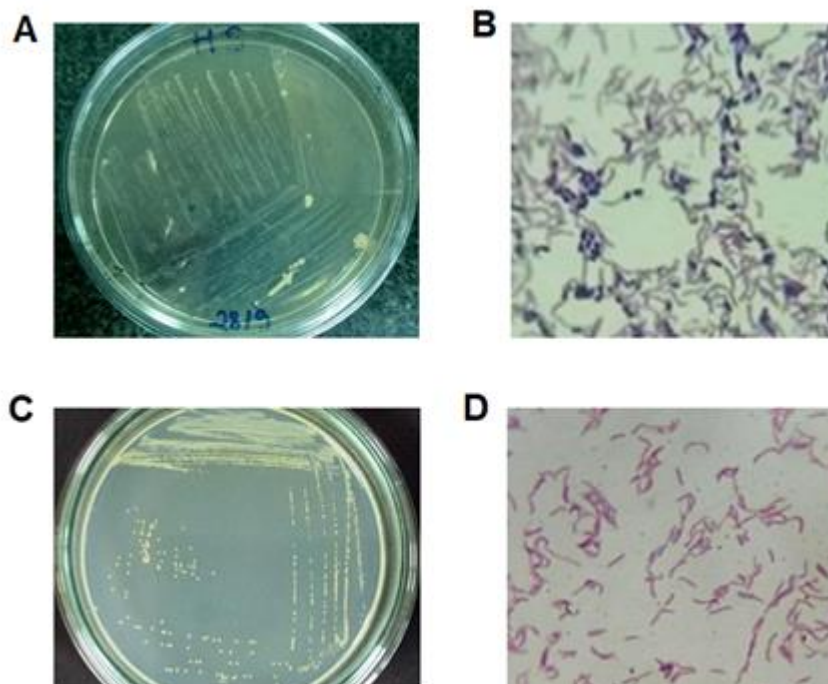
Cấu trúc màng cellulose của vi khuẩn được quan sát bằng kính hiển vi điện tử theo phương pháp chụp SEM (Scanning Electron Microscope). Các mẫu màng BC, mặt nạ vải, mặt nạ coconut được gửi chụp SEM tại Viện công nghệ hóa học-Sở khoa học và công nghệ Tp. HCM (1 Mạc Đĩnh Chi, P. Bến Nghé, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam). Cấu trúc hệ sợi được quan sát ở các độ phóng đại khác nhau.

2.8 Phương pháp xử lý số liệu

Giá trị kết quả của các thí nghiệm là trung bình của 3 lần lặp lại. Số liệu được tính toán, vẽ biểu đồ trên Microsoft Excel 2013 và được xử lý thống kê bằng phương pháp ANOVA bằng phần mềm Statgraphics Centurion 18.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập và làm thuần chủng vi khuẩn *A. xylinum*



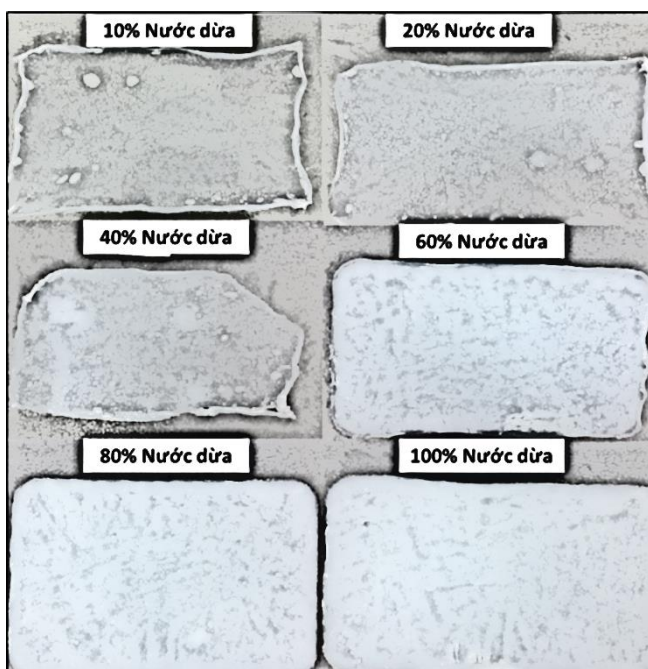
Hình 1: Giống vi khuẩn *A. xylinum*. (A) Hình thái khuẩn lạc của các vi sinh vật trong nước dừa. (B) Kết quả nhuộm Gram của các vi sinh vật trong nước dừa. (C) Khuẩn lạc *A. xylinum* được phân lập và làm thuần chủng trên môi trường HS sau 5 ngày. (D) Kết quả nhuộm Gram *A. xylinum*.

Chủng vi khuẩn *A. xylinum* được phân lập từ mẫu nước dừa có sự hình thành váng dạng màng có cấu trúc cellulose trên bề mặt. Sau 7 ngày nuôi ủ trong điều kiện nhiệt độ phòng, các khuẩn lạc được quan sát thấy với nhiều hình dạng khác nhau (Hình 1A) cho thấy sự hiện diện của các vi sinh vật nhiễm tạp trong môi trường tự nhiên. Bên cạnh đó, kết quả nhuộm Gram mẫu váng nước dừa với sự hiện diện của nhiều vi sinh vật có hình dạng và kích thước khác nhau cũng khẳng định sự tạp nhiễm của các vi sinh vật tham gia vào

quá trình hình thành màng BC của *A. xylinum* (Hình 1B). Giống vi khuẩn thuần khiết có ý nghĩa quan trọng trong việc nghiên cứu và ứng dụng vào thực tiễn, việc nhiễm tạp sẽ ảnh hưởng đến quá trình và hiệu quả sản xuất do đó các khuẩn lạc cần được làm thuần và kiểm tra khả năng hình thành màng BC, từ đó khuẩn lạc cho khả năng hình thành màng BC cao nhất đã được chọn lọc. Khuẩn lạc của vi khuẩn được chọn có hình tròn, màu trắng đục, bề mặt xù xì, phân giữa hơi lồi lên (Hình 1C). Kết quả nhuộm Gram cho thấy vi khuẩn bắt màu hồng, hình que thẳng hay cong, tồn tại riêng rẽ hoặc kết dính nhau (Hình D). Bên cạnh đó, một phần trình tự đoạn gen mã hóa cho 16S-rRNA (~500 bp) của chủng vi khuẩn được chọn cũng được kiểm tra với trình tự mỗi chuyên biệt và so sánh với ngân hàng dữ liệu trên NCBI. Kết quả cho thấy gen mã hóa cho 16S-rRNA của vi khuẩn có sự tương đồng với các chủng vi khuẩn *Acetobacter xylinum*. Dựa trên các kết quả thu được, chủng vi khuẩn này được xác định là loài *A. xylinum* và được chọn làm đối tượng cho việc sản xuất màng BC làm phôi mặt nạ dưỡng da.

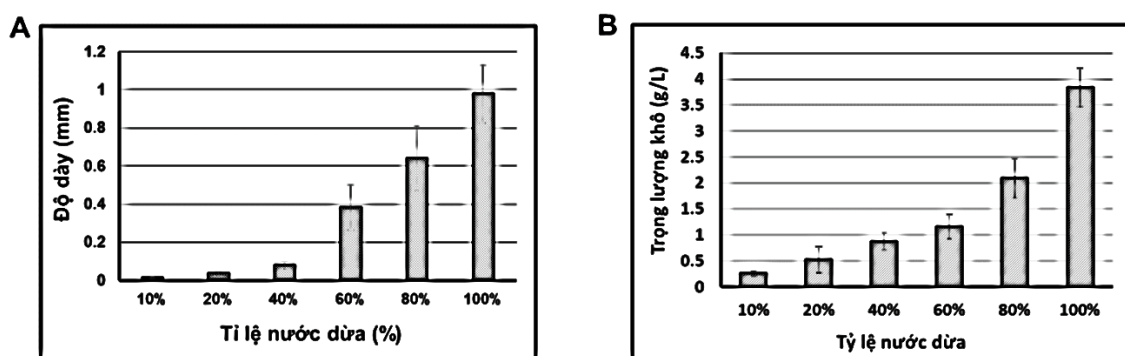
3.2 Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến quá trình tạo màng BC của chủng *A. xylinum*

Nước dừa là môi trường tự nhiên có đầy đủ các yếu tố dinh dưỡng cho sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *A. xylinum*, do đó, thành phần nước dừa trong môi trường sẽ ảnh hưởng đến khả năng hình thành màng BC [22]. Trong điều kiện nghiên cứu, nước dừa ở các tỷ lệ khác nhau được bổ sung vào môi trường dinh dưỡng. Sau 7 ngày lên men tĩnh trong điều kiện nhiệt độ phòng, độ dày và khối lượng màng được kiểm tra (Hình 2 và Hình 3).



Hình 2: Màng BC được hình thành trên môi trường có tỷ lệ nước dừa khác nhau

Ở các điều kiện tỉ lệ nước dừa khác nhau, sau 7 ngày nuôi cấy, chủng vi khuẩn *A. xylinum* đều thể hiện sự hình thành màng BC, tuy nhiên màng BC có độ dày và trọng lượng khác nhau. Ở môi trường bổ sung 10% nước dừa, vi khuẩn *A. xylinum* tạo màng rất mỏng với khối lượng khô $0,26 \pm 0,052$ g/L, và độ dày $0,013 \pm 0,00$ mm. Trong môi trường có bổ sung 20%, 40% và 60% nước dừa, màng BC có giá trị trọng lượng khô tương ứng là $0,524 \pm 0,256$ g/L, $0,88 \pm 0,16$ g/L, và $1,164 \pm 0,232$ g/L với độ dày tương ứng là $0,0375 \pm 0,0096$ mm, $0,078 \pm 0,022$ mm, và $0,383 \pm 0,116$ mm. Tuy nhiên, với độ dày thu được ở các điều kiện môi trường này, màng BC dễ bị rách, không phù hợp cho việc làm mặt nạ dưỡng da. Khi tăng nồng độ nước dừa trong môi trường nuôi cấy lên 80% và 100%, độ dày và khối lượng của màng BC cũng tăng cao với độ dày tương ứng là $0,64 \pm 0,17$ mm và $0,98 \pm 0,15$ mm, với trọng lượng khô tương ứng là $2,100 \pm 0,376$ g/L, $3,840 \pm 0,368$ g/L (Hình 3A và 3B).

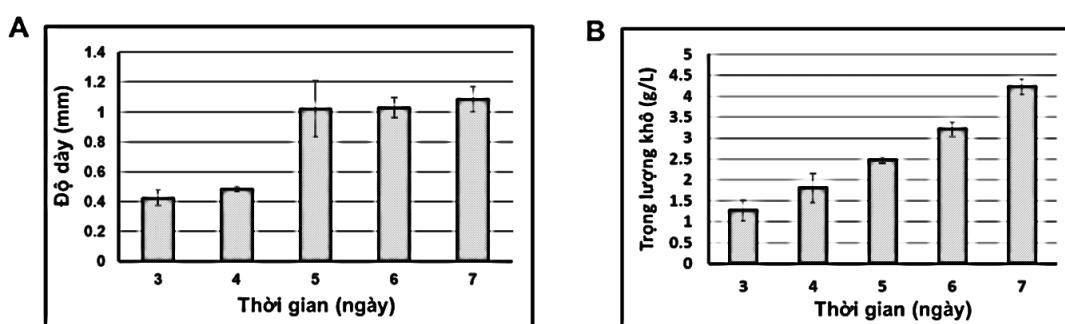


Hình 3: Ảnh hưởng của tỉ lệ nước dừa trong môi trường nuôi cấy lên độ dày màng BC (A) và trọng lượng khô màng BC (B) sau thời gian lên men 7 ngày.

Như vậy, môi trường có bổ sung 100% nước dừa, vi khuẩn *A. xylinum* tạo màng BC có độ dày tăng gấp 2,5 lần so với môi trường có 60% nước dừa ($0,382 \pm 0,116$ mm) và gấp 1,5 lần màng ở môi trường chứa 80% nước dừa ($0,64 \pm 0,17$ mm). Trong điều kiện 80% và 100% nước dừa, màng BC tạo thành có khối lượng cao và dày, bề mặt nhẵn bóng, trắng và dai hơn. Trọng lượng khô của màng BC thu được trong môi trường chứa 100% nước dừa cao hơn 1,8 lần so với môi trường chứa 80% nước dừa. Kết quả này cho thấy khối lượng màng BC được tạo ra trong môi trường có bổ sung 100% nước dừa sau 7 ngày tương đối cao hơn so với khi nuôi cấy *Gluconacetobacter hansenii* trong môi trường HS thay thế glucose bằng nước ngâm bắp và phần thừa trong sản xuất nước trái cây nhiệt đới (tropical fruit residues) sau 10 ngày nuôi ủ ($3,56$ g/L) [23], và cao hơn trọng lượng khô BC thu được trong môi trường HS nuôi cấy *Gluconacetobacter sucrofermentans* B-11267 sau 3 ngày là $2,14$ g/L [24]. Do đó, với điều kiện môi trường chứa 100% nước dừa, sự hình thành màng BC đạt hiệu quả cao trong thời gian ngắn sẽ tiết kiệm được thời gian và giảm nguy cơ gây tạp nhiễm trong quá trình sản xuất. Như vậy, môi trường có bổ sung 100% nước dừa được chọn để nuôi ủ *A. xylinum* sản xuất màng BC.

3.3 Ảnh hưởng của thời gian nuôi ủ đến quá trình tạo màng BC của chủng *A. xylinum*

Thời gian lên men sẽ ảnh hưởng độ dày và kết cấu màng BC. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tạo màng BC trên môi trường chọn lọc có chứa 100% nước dừa. Độ dày và trọng lượng khô màng BC hình thành sẽ được kiểm tra trong các khoảng thời gian khác nhau sau 3, 4, 5, 6, 7 ngày (Hình 4). Sau 24 giờ nuôi cấy, *A. xylinum* bắt đầu hình thành lớp màng cellulose rất mỏng, xuất hiện màng trắng mỏng trên bề mặt môi trường. Bắt đầu đến ngày thứ 3, trên bề mặt môi trường có một lớp màng BC mỏng, đều và có màu trắng. Độ dày màng BC đạt $0,425 \pm 0,054$ mm và $0,485 \pm 0,018$ mm tương ứng ở ngày lên men thứ 3 và thứ 4. Sau 5 ngày lên men, màng BC có độ dày tăng nhanh với $1,023 \pm 0,186$ mm, gấp 2,5 lần màng BC ở 3 ngày và tăng không đáng kể khi tiếp tục nuôi ủ sau 6 ngày và 7 ngày, đạt độ dày $1,085 \pm 0,083$ mm ở ngày lên men thứ 7 (Hình 4A). Kết quả kiểm tra trọng lượng khô của màng BC tạo thành theo thời gian cho thấy khối lượng của màng BC tăng dần thể hiện sự sinh trưởng và phát triển liên tục của vi sinh vật này trong môi trường dinh dưỡng có bổ sung 100% nước dừa (Hình 4B). Trọng lượng khô của màng BC thu được ở ngày nuôi cấy thứ 3 là $1,271 \pm 0,248$ g/L và tăng dần đến $4,224 \pm 0,184$ g/L ở ngày nuôi cấy thứ 7. Kết quả thu được tương ứng với màng BC nuôi *Gluconacetobacter hansenii* UCP1619 trong môi trường nước ngâm bắp bổ sung có glucose (40-45 g/L) trong nghiên cứu của Andrea F. S. Costa và cộng sự (2017) với trọng lượng khô thu được tương ứng là $3,55 \pm 0,4$ g/L và $4,60 \pm 0,8$ g/L sau 10 ngày nuôi ủ với độ dày $0,62 \pm 0,08$ mm [25]. Tuy nhiên, việc hình thành độ dày cao hoặc trọng lượng cao của màng BC không khẳng định được sự thích hợp cho việc dùng màng BC làm phôi cho mặt nạ dưỡng da. Mặt nạ dưỡng da cần có độ mỏng thích hợp và độ mềm dẻo để dễ dàng tiếp xúc với da. Do đó, chúng tôi đã tiến hành so sánh độ dày của màng BC với mặt nạ thương mại Coconut được sản xuất từ màng BC, độ dày của màng BC trong nghiên cứu sau 3 ngày nuôi ủ có độ dày $0,425 \pm 0,054$ mm tương đương với mặt nạ Coconut thương mại với độ dày $0,448 \pm 0,057$ mm. Như vậy, căn cứ vào độ dày màng BC thu được, chúng tôi chọn màng BC thu được sau 3 ngày nuôi cấy để tạo phôi tạo mặt nạ dưỡng da.

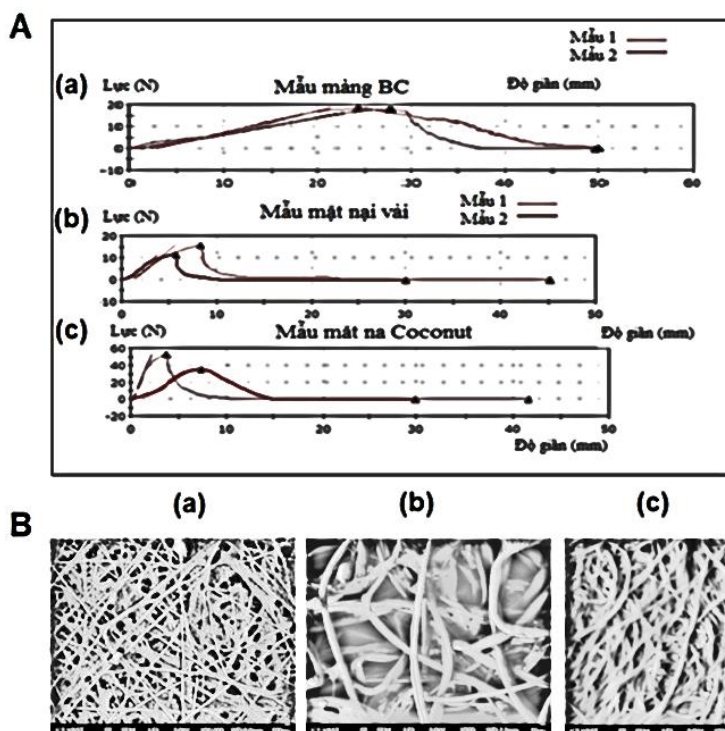


Hình 4: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy *A. xylinum* lên độ dày (A) và khối lượng của màng BC (B).

3.4 Đặc tính màng BC được sản xuất bởi chủng *A. xylinum*

Với mục tiêu làm phôi mặt nạ dưỡng da, các đặc tính về độ dai, độ bền chắc, kết cấu hệ sợi của màng BC được kiểm tra và so sánh với các loại mặt nạ dưỡng da thương mại như mẫu mặt nạ vải và mặt nạ Coconut. Tính chất cơ lý về độ bền chắc, độ kéo giãn của màng BC và các mặt nạ được xác định bằng máy đo cơ lý Universal Testing System 5543 và kết quả được thể hiện trong Hình 5.

Kết quả đo lực kéo đứt trung bình trên mặt nạ coconut được thể hiện cao nhất với lực $43,5 \pm 12,7$ N, trong khi lực kéo đứt ở mặt nạ vải là thấp nhất với $13,5 \pm 2,97$ N. Màng BC trong nghiên cứu có lực kéo đứt trung bình với $18,1 \pm 0,7$ N (Hình 5A). Như vậy, ở cùng độ dày 0,4 mm, mặt nạ Coconut có lực kéo đứt cao gấp 2,4 lần màng BC. Tuy nhiên, độ kéo giãn của màng BC được ghi nhận là cao nhất với $49,8 \pm 0,28$ mm, tăng hơn 226% so với chiều dài màng BC ban đầu, trong khi mặt nạ Coconut và mặt nạ vải chỉ có độ kéo giãn tương ứng là $35,7 \pm 8,3$ mm và $37,6 \pm 10,8$ mm, tăng 162% và 170% so với chiều dài ban đầu. Kết quả cho thấy mặt nạ coconut có cấu trúc hệ sợi bền chắc nhưng thiếu sự dẻo dai và màng BC thể hiện sự dẻo dai nổi trội hơn các mẫu đối chứng, nguyên nhân có thể do sự khác biệt trong cấu trúc hệ sợi của màng BC và các loại mặt nạ. Trong nghiên cứu của Andrea F. S. Costa và cộng sự (2017), lực kéo đứt trung bình của màng BC dày 0,6 mm được sản xuất từ *Gluconacetobacter hansenii* UCP1619 sau 10 ngày nuôi ủ là 25.67 N và độ biến dạng là ~35% [25], kết quả thu được cho thấy màng BC thu được trong nghiên cứu có lực kéo đứt trung bình thấp hơn nhưng độ biến dạng cao, phù hợp với sự áp sát lên bề mặt da trong các sản phẩm mặt nạ.

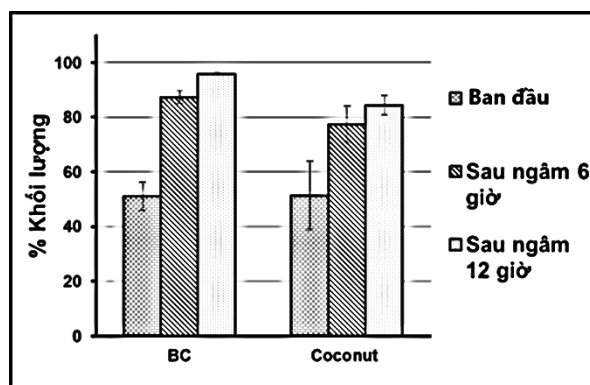


Hình 5: Đặc tính màng BC được sản xuất bởi *A. xylinum* (a) so với mặt nạ vải (b) và mặt nạ Coconut (c). (A) Tính chất cơ lý. (B) Hình ảnh SEM ở độ phóng đại X30.000 (a, c) và X3.000 (b).

Cấu trúc hệ sợi của màng BC và các loại mặt nạ được kiểm tra bằng hình ảnh chụp SEM (Scanning Electron Microscope) (Hình 5B) cho thấy đường kính sợi cellulose của mặt nạ vải là khoảng 8000 nm và lớn gấp 80 lần sợi cellulose của mặt nạ Coconut và màng BC (~100 nm). Cấu trúc hệ sợi của mặt nạ vải lỏng lẻo tạo nhiều khoảng trống. Sợi cellulose của mặt nạ Coconut và màng BC có kích thước bằng nhau do đều tạo thành từ cellulose của vi khuẩn, mạng lưới các sợi cellulose đan xen nên kết cấu của vật liệu mịn và có độ dai chắc cao. Tuy nhiên, cấu trúc hệ sợi của mặt nạ Coconut có cấu trúc bền chặt, thiếu các khoảng không trong khi hệ sợi của màng BC có cấu trúc sợi cellulose không quá lỏng lẻo như mặt nạ vải, cũng không quá chặt chẽ như mặt nạ Coconut, hình thành nên các khoảng không trong hệ sợi. Đặc điểm cấu trúc nổi bật này đã giúp màng BC phù hợp cho việc ứng dụng làm mặt nạ dưỡng da, giúp cho các dung dịch dưỡng da được giữ trong mặt nạ và dần dần thấm vào da khi sử dụng. Hệ sợi cellulose của màng BC cũng được quan sát trong các nghiên cứu của Paola Perugini (2018) và S. Muhsinin (2017) đã cho thấy các tính năng nổi bật của màng BC trong việc ứng dụng để làm mặt nạ dưỡng da [17, 20].

3.5 Khả năng hấp thụ của màng BC

Sản phẩm dùng làm mặt nạ dưỡng da cần có khả năng hấp thụ tốt để lưu giữ các chất dưỡng da bên trong và từ từ thấm thấu ra ngoài khi tiếp xúc với da. Màng BC được kiểm tra khả năng hấp thụ bằng cách so sánh khối lượng của màng BC trước và sau khi ngâm với nước cất sau các khoảng thời gian 6 giờ và 12 giờ. Kết quả thí nghiệm được so sánh với khả năng hấp thụ của mặt nạ Coconut và thể hiện ở Hình 6.



Hình 6: Khả năng hấp thụ nước của màng BC và mặt nạ Coconut.

Màng BC và mặt nạ Coconut đều thể hiện khả năng tái hấp thu nước sau khi sấy ở nhiệt độ 60°C với phần trăm khối lượng còn lại lần lượt là 51,1±5,6% và 51,3±12,6%. Khả năng hấp thụ nước của màng BC và mặt nạ Coconut sau thời gian ngâm 6 giờ có sự chênh lệch với các giá trị phần trăm khối lượng tương ứng là 87,38±2,23% và 77,37±6,66%. Tuy nhiên, Kết quả phân tích thống kê cho thấy không có sự khác biệt về độ hấp thụ nước giữa màng BC và mặt nạ Coconut sau thời gian ngâm là 6 giờ (ANOVA, n=3, độ tin cậy 95%). Khi khảo sát độ hấp thụ nước ở thời gian lâu hơn (12 giờ), phần trăm khối lượng của màng BC được ghi nhận là 95,76±0,35% trong khi mặt nạ Coconut là 84,53±3,48%. Điều này cho thấy cấu trúc hệ sợi có ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ của màng BC. Sự hình thành các khoảng không hợp lý giữa hệ sợi cellulose của màng BC giúp cho việc hấp thụ nước hiệu quả hơn. Nghiên cứu của Guilherme Pacheco MD và cộng sự (2017) đã cho thấy cấu trúc vi sợi của màng BC thích hợp cho việc dưỡng da và đã cải thiện được 76% độ ẩm của 75% tình nguyện viên [18]. Kết quả nghiên cứu của Thanaporn Amnuakit và cộng sự cũng cho thấy sự cải thiện độ ẩm của da hiệu quả và độ hài lòng khi sử dụng màng BC là 4/5 [26]. Kết quả thu được cho thấy tiềm năng ứng dụng màng BC trong hướng phát triển làm mặt nạ dưỡng da, giúp tiết kiệm trong việc phối chế dung dịch dưỡng da vào mặt nạ, giảm thiểu ô nhiễm môi trường khi sử dụng mặt nạ vải, đồng thời tạo một sản phẩm hữu ích từ nguồn nguyên liệu nước dừa phong phú tại Việt Nam.

4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *Acetobacter xylinum* đã được phân lập và định danh từ mẫu nước dừa có váng. Điều kiện nuôi ủ để hình thành màng BC được xác định với môi trường khoáng có chứa 100% nước dừa, với tỷ lệ giống bổ sung 10% trong điều kiện lên men tĩnh tại nhiệt độ phòng với thời gian lên men là 3 ngày. Màng BC hình thành có độ dày 0,425±0,054 mm thể hiện độ bền cơ học cao với lực kéo đứt trung bình là 18,1±0,7 N và độ biến dạng 49,8±0,28 mm. Màng BC sau sấy ở 60°C với phần trăm khối lượng 51,1±5,6% có khả

năng tái hấp thụ nước lên đến $95,76 \pm 0,35\%$ sau 12 giờ tẩm ướt. Cấu trúc hệ sợi không quá chặt và có các khoảng không tương đối hợp lý của màng BC có thể giải thích cho khả năng tái hấp thụ nước và kháng định tiềm năng ứng dụng màng BC này trong sản xuất mặt nạ dưỡng da.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu này được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công Nghiệp TP. Hồ Chí Minh. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Công Nghiệp TP. HCM đã tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bielecki S, Krystynowicz, Turkiewicz A, Kalinowska M: Bacterial cellulose Institute of Technical Biochemistry. *Technical Chemistry of Lodz Stefanowskiego* 2001, 37-46.
- [2] Hestrin S, Schramm M: Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J* 1954, 58(2):345-352.
- [3] Garcia-Sanchez ME, Jimenez Palomar I, Gonzalez-Garcia Y, Robledo-Ortiz JR: Bacterial Cellulose Produced by *Gluconacetobacter xylinus* Culture Using Complex Carbon Sources for Biomedical Applications. *MRS Advances* 2016, 1(36):2563-2567.
- [4] Bielecki S, Krystynowicz, A. Turkiewicz, M. Kalinowska: Bacterial cellulose Institute of Technical Biochemistry. *Technical Chemistry of Lodz Stefanowskiego*: 37-46; 2001.
- [5] Retegi A, Gabilondo N, Pena C, Zuluaga R, Castro C, Ganan P, de La Caba K, Mondragon I: Bacterial cellulose films with controlled microstructure–mechanical property relationships. *Cellulose* 2010, 17(3):661-669.
- [6] Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska-Jezierska A, Gonçalves-Miśkiewicz M, Turkiewicz M, Bielecki S: Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2002, 29(4):189-195.
- [7] Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A: Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *Journal of materials science* 2000, 35(2):261-270.
- [8] Ross P, Mayer R, Benziman M: Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological reviews* 1991, 55(1):35-58.
- [9] Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A: Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *Journal of materials science* 2000, 35(2):261-270.
- [10] Mohammadi Z: Structure, Properties and Medical Advances for Biocellulose Applications: A Review. *American Journal of Polymer Science and Technology* 2017, 3(5):89.
- [11] Brown, E. E: Bacterial cellulose/thermoplastic polymer nanocomposites. *Washington State University* 2007.
- [12] El-Saied H, Basta AH, Gobran RH: Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and its application). *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 2004, 43(3):797-820.
- [13] Khalid A, Khan R, Ul-Islam M, Khan T, Wahid F: Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds. *Carbohydrate polymers* 2017, 164:214-221.
- [14] Wu J, Zheng Y, Song W, Luan J, Wen X, Wu Z, Chen X, Wang Q, Guo S: In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate polymers* 2014, 102:762-771.

- [15] Kim J, Cai Z, Lee HS, Choi GS, Lee DH, Jo C: Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. *Journal of Polymer Research* 2011, 18(4):739-744.
- [16] Legeza VI, Galenko-Yaroshevskii VP, Zinov'ev EV, Paramonov BA, Kreichman GS, Turkovskii, II, Gumenyuk ES, Karnovich AG, Khripunov AK: Effects of new wound dressings on healing of thermal burns of the skin in acute radiation disease. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2004, 138(3):311-315.
- [17] Perugini P, Blevé M, Cortinovis F, Colpani A: Biocellulose Masks as Delivery Systems: A Novel Methodological Approach to Assure Quality and Safety. *Cosmetics* 2018, 5(4):66.
- [18] Pacheco G, de Mello CV, Chiari-Andreo BG, Isaac VLB, Ribeiro SJL, Pecoraro E, Trovatti E: Bacterial cellulose skin masks-Properties and sensory tests. *Journal of cosmetic dermatology* 2017, 17(5):840-847.
- [19] Zhao H, Xia J, Wang J, Yan X, Wang C, Lei T, Xian M, Zhang H: Production of bacterial cellulose using polysaccharide fermentation wastewater as inexpensive nutrient sources. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2018, 32(2):350-356.
- [20] Muhsinin S, Putri NT, Ziska R, Jafar G: Bacterial Cellulose from Fermented Banana Peels (*Musa paradisiaca*) by *Acetobacter xylinum* as Matrix Of Biocellulose Mask *Sci & Res* 2017, 9(2):159-162.
- [21] Hussain Z, Sajjad W, Khan T, Wahid F: Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. *Cellulose* 2019, 26(5):2895-2911.
- [22] Chinsamran K, Suttisuwan, R. : Development of bacterial cellulose production in molasses by using coconut juice as the nutrient supplement and adding of gelling agent. *RMUTSB Acad J* 2015, 3:98-108.
- [23] Amorim J. CA, Galdino C., Vinhas G., Santos E., Sarubbo L.: Bacterial Cellulose Production Using Industrial Fruit Residues as Substrate to Industrial Application. *Chemical Engineering Transactions* 2019, 74:1165-1170.
- [24] Revin V, Liyaskina E, Nazarkina M, Bogatyreva A, Shchankin M: Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 2018, 49 Suppl 1:151-159.
- [25] Costa AFS, Almeida FCG, Vinhas GM, Sarubbo LA: Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. *Frontiers in microbiology* 2017, 8:2027.
- [26] Amnuakit T, Chusit T, Raknam P, Boonme P: Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction. *Medical devices* 2011, 4:77-81.

Ngày nhận bài: 18/06/2020

Ngày chấp nhận đăng: 23/09/2021