

TỐI ƯU HÓA THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG LÊN MEN SẢN XUẤT LIGNIN PEROXIDASE TỪ *STREPTOMYCES* HX10.7

Vũ Văn Lợi, Phan Thị Hồng Thảo, Đỗ Tất Thịnh, Phạm Thanh Huyền, Hồ Tuyên, Phạm Thị Bích Hợp

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* HX10.7 được phân lập từ mẫu đất tại Việt Nam, có hoạt tính enzyme lignin peroxidase cao và ổn định. Môi trường thích hợp cho chủng HX10.7 phát triển tối và sinh enzyme đã được xác định với thành phần gồm (g/l): glucose, 8; cao nấm men, 4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5; Na_2HPO_4 , 0,6; KH_2PO_4 , 0,5; $CaCO_3$, 0,5, và muối vi lượng. Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp nhất là $28^\circ C$. Môi trường này đã được sử dụng làm cơ sở để áp dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box-Wilson tối ưu hóa thành phần môi trường lên men chìm sản xuất lignin peroxidase. Các biến được tối ưu hóa là nồng độ glucose, cao nấm men và manganese sulphate, và hàm mục tiêu là hoạt tính lignin peroxidase trong dịch lên men. Môi trường tối ưu tìm được có thành phần (g/l): glucose, 5,5; cao nấm men, 3,7; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5; KH_2PO_4 , 0,5; Na_2HPO_4 , 0,6; $CaCO_3$, 0,5; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2,7 mM và $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,8 mM. Thành phần môi trường và điều kiện lên men có ảnh hưởng rõ rệt tới hoạt tính lignin peroxidase của chủng HX10.7. Ở quy mô bình tam giác, hoạt tính lignin peroxidase trong môi trường thông thường ISP2 là 52 U/l, đã được tăng lên 1,5 lần trong môi trường thích hợp và 3 lần trong môi trường tối ưu. Lên men chủng HX 10.7 trong hệ thống tự động Bioflo 110 dung tích 7,5 lít cho hoạt tính lignin peroxidase cao nhất là 189 U/l, gấp 3,6 lần kết quả lên men trong bình tam giác trước khi tối ưu hóa.

Từ khóa: Lignin, lignin peroxidase, streptomycetes, tối ưu hóa môi trường, phương pháp Box-Wilson

MỞ ĐẦU

Lignocellulose là thành phần cấu trúc chính của thực vật, là nguyên liệu hữu cơ có thể tái sử dụng rất sẵn có trong phế thải từ các ngành sản xuất như lâm nghiệp, sản xuất bột giấy và giấy, nông nghiệp, thực phẩm và rác thải sinh hoạt. Lignocellulose gồm ba thành phần chính là cellulose, hemicellulose và lignin, trong đó lignin (chiếm tới 35%) là hợp chất khó bị phân hủy nhất. Do tính phức tạp trong công thức phân tử cũng như trong phân bố của lignin trong lignocellulose nên các công nghệ xử lý lignin thường có bản chất hóa-lý, ví dụ nhiệt-hóa, tiêu tốn năng lượng và không thân thiện với môi trường. Do đó, phân hủy lignocellulose bằng phương pháp sinh học sử dụng enzyme là cách tiếp cận bền vững cần được nghiên cứu và phát triển. Enzyme phân hủy lignin, đại diện là lignin peroxidase, manganese peroxidase và laccase, nhờ bản chất đa năng nên có thể phân giải lignin, các dẫn xuất của nó và rất nhiều hợp chất tương tự. Các enzyme này được quan tâm nghiên cứu nhằm ứng dụng trong nhiều lĩnh vực công, nông nghiệp như sản xuất giấy, nhiên liệu sinh học, chăn nuôi và bảo vệ môi trường. Sử dụng enzyme phân hủy lignin trong sản xuất bột giấy và giấy làm giảm lượng hóa chất đầu vào và khử màu hiệu quả nước

thải (Baecker *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2006; Lund *et al.*, 2003). Nước thải từ công nghiệp dệt nhuộm và in ấn chứa khoảng 10-15% thuốc nhuộm và phẩm màu đã sử dụng, trong đó có những hợp chất độc hại nhưng rất khó bị phân hủy trong điều kiện tự nhiên nếu như không có tác động của enzyme phân hủy lignin (Trupkin *et al.*, 2003). Trong sản xuất nhiên liệu sinh học, phụ phẩm và phế thải thực vật giàu lignocellulose được phân giải, và từ cellulose thu được đường đơn. Sử dụng enzyme cellulase để thủy phân cellulose thành đường glucose là công nghệ hiệu quả về kinh tế và có tiềm năng ứng dụng. Tuy nhiên, lignin trong lignocellulose cản trở sự tiếp xúc giữa enzyme và cellulose nên cần phải được loại bỏ (Bothast *et al.*, 1997).

Rất nhiều vi sinh vật có thể dễ dàng phân giải cellulose và hemicellulose làm nguồn carbon cho sinh trưởng, nhưng chỉ có số ít (xạ khuẩn và nấm mục trắng) là có thể phân giải được lignin. Có ý kiến cho rằng, trong điều kiện tự nhiên, đây là một cơ chế để chúng tiếp cận với cellulose và hemicellulose vốn bị lignin "che chắn" (Cullen, Kerstin, 2004; Godden *et al.*, 1992; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009).

Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật rất đa dạng, được

quan tâm tìm kiếm và nghiên cứu vì là nguồn chủng giống phong phú để sản xuất các chất có hoạt tính sinh học, nơi bật nhất là kháng sinh. Tuy nhiên, ứng dụng của xạ khuẩn không chỉ giới hạn ở đó. Từ những năm 1980, xạ khuẩn đã được nhiều phòng thí nghiệm nghiên cứu về khả năng phân hủy lignin một polyme sinh học phức tạp và rất bền vững (Crawford *et al.*, 1983; Godden *et al.*, 1992; Mercer *et al.*, 1996; Niladevi *et al.*, 2005). Trong điều kiện *in vitro*, xạ khuẩn có thể sinh trưởng và phát triển tốt trong một môi trường nhất định, nhưng không phải lúc nào cũng đồng thời sinh enzyme cao trong cùng môi trường đó. Vì vậy, cần phải tìm môi trường tối ưu cho chung sinh enzyme mong muốn (Pometto *et al.*, 1986; Trupkin *et al.*, 2003; Tuncer *et al.*, 1999; Yee *et al.*, 1996). Trong bài này, chúng nghiên cứu là *Streptomyces* HX10.7 được phân lập tại Việt Nam, có hoạt tính lignin peroxidase cao và ổn định. Trên cơ sở điều kiện nuôi cấy và môi trường thích hợp cho chủng HX10.7 phát triển tốt và sinh enzyme đã được xác định, nồng độ glucose, cao nấm men và manganese sulphate được tối ưu hóa để nâng cao hơn nữa hoạt tính lignin peroxidase.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* HX10.7 sinh enzyme lignin peroxidase nhận từ bộ sưu tập giống của phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Lên men sản xuất enzyme

Chủng HX10.7 được nuôi nhân giống ở 28°C trong bình tam giác dung tích 250 ml chứa 50 ml môi trường có thành phần: glucose, 10 g/l; peptone, 5 g/l; NaCl, 5 g/l; cao thịt, 0,5 g/l; pH 7 - 7,2. Thời gian nhân giống 72 h trên máy lắc tròn tốc độ 200 vòng/phút. Thí nghiệm lên men sinh enzyme lignin peroxidase được tiến hành trong bình tam giác dung tích 500 ml chứa 100 ml môi trường nghiên cứu. Giống được cấy vào môi trường lên men theo tỷ lệ 2% thể tích. Kết thúc quá trình lên men, dịch nuôi cấy được lọc qua giấy lọc, sau đó ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ cặn. Dịch nổi (từ đây được gọi là *dịch lên men*) được bảo quản ở nhiệt độ 2 - 4°C cho tới khi xác định hoạt tính.

Xác định hoạt tính lignin peroxidase

Xác định hoạt tính LiP (Crawford *et al.*, 1993), sử dụng cơ chất 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP). Tổng

thể tích dung dịch phản ứng là 1 ml, bao gồm các phần bằng nhau của đệm potassium phosphate, 100 mM (pH 7,0); 4-amino antipyrine, 82 mM; 2,4-dichlorophenol, 1 mM; H₂O₂, 4 mM và dịch lên men. Phản ứng được thực hiện ở 37°C khi bắt đầu bổ sung dung dịch H₂O₂. Đo độ hấp thụ ánh sáng (absorbance) trên máy quang phổ ở bước sóng 510 nm sau 1 phút. Thời đơn vị hoạt độ lignin peroxidase (U/ml) là lượng enzyme cần thiết để tăng độ hấp thụ ở bước sóng 510 nm (Abs₅₁₀) lên 1,0 đơn vị trong một phút ở 37°C.

Xác định hàm lượng đường

Hàm lượng đường dư trong dịch lên men được xác định theo phương pháp của Miller (1959). Hỗn hợp chất phản ứng bao gồm 1% 3,5-dinitrosalicylic acid, 30% sodium potassium tartrate và 0,4 M NaOH. Các phản thể tích bằng nhau của mẫu và chất phản ứng được hòa trộn và đun sôi cách thủy trong 10 phút. Sau đó, hỗn hợp dung dịch được để nguội tới nhiệt độ phòng và pha loãng 10 lần bằng nước cất. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm, so sánh với đường chuẩn glucose đã chuẩn bị để tinh ra nồng độ đường khi.

Xác định sinh khối khô

Mẫu dịch nuôi được chỉnh pH về 4 để hòa tan CaCO₃, lọc qua giấy lọc rồi rửa lại bằng nước muối sinh lý. Lượng sinh khối cò trên giấy lọc được xác định bằng phương pháp sấy ở nhiệt độ 105°C đến trọng lượng không đổi.

Tối ưu hóa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box-Wilson

Chi tiêu để tối ưu là hoạt tính enzyme lignin peroxidase (sau đây viết tắt là LiP). Thí nghiệm lên men được tiến hành trong bình tam giác như đã mô tả ở trên. Môi trường thích hợp cho sinh tổng hợp LiP của chủng HX10.7 đã nêu ở trên được sử dụng làm cơ sở để tối ưu hóa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box-Wilson (Velaquez *et al.*, 2007). Cụ thể là, nồng độ của 3 thành phần (gọi là 3 biến) có ảnh hưởng lớn tới khả năng sinh LiP của chủng HX10.7 là: cao nấm men (ký hiệu X₁); glucose (X₂) và MnSO₄.H₂O (X₃) được tối ưu hóa. Các thành phần còn lại được giữ nguyên như trong môi trường cơ sở.

Nghiên cứu động thái lên men sinh tổng hợp LiP của chủng HX10.7

Động thái lên men chủng HX10.7 được nghiên cứu trong hệ thống lên men Bioflo 110 (New

Brunswick Scientific, USA) dung tích 7,5 lit. sử dụng môi trường đã tối ưu. Chế độ lên men là: pH ban đầu 7,5; tỷ lệ tiếp giống 4% theo thể tích; nhiệt độ nuôi 28 °C; tốc độ khuấy ban đầu 300 vòng/ phút; tốc độ cấp khí ban đầu 0.5 lít/ lít/ phút. Mẫu được lấy cách nhau 3 đến 6 h để phân tích. Quá trình lên men kéo dài khoảng 96 h.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Streptomyces chromofuscus HX10.7 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trên nhiều loại môi trường và trong khoảng biên độ rộng về nhiệt độ (20°C - 55°C) và pH (4,5 - 11), tốt nhất ở 28°C và pH ban đầu 7,5. Chủng này có hệ enzyme ngoại bào phong phú như lignin peroxidase, manganese peroxidase, xylanase và cellulase. Đặc biệt, hoạt tính LiP khá cao và ổn định

Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme

Việc lựa chọn các môi trường trên giống và môi trường lên men có ý nghĩa rất quan trọng trong công nghệ sản xuất và tách chiết enzyme. Khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng HX10.7 được kiểm tra trên một số môi trường nuôi cấy xạ khuẩn thông dụng.

Bảng 1. Hoạt tính LiP của chủng HX 10.7 trên các môi trường khác nhau.

Môi trường	Sinh trưởng (g/l)	Hoạt tính enzyme (U/l)
Gauze 1	3,2	12
Gauze 2	3,4	21
ISP1	3,5	15
ISP2	4,6	52
ISP4	3,6	13
ISP7	3,7	23
YS	4,8	41
Khoáng	3,1	25
79	4,1	37
AH-4	4,8	26

Kết quả bảng 1 cho thấy, chủng HX10.7 phát triển tốt trên hầu hết các môi trường, tốt nhất là ISP 2, YS và AH-4 có thành phần dinh dưỡng hữu cơ như cao nấm men hoặc cao malt. Hoạt tính enzyme LiP đạt cao nhất trên môi trường ISP2 là 52 U/l. Môi

trường ISP2 được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu tối ưu nguồn dinh dưỡng cho sự phát triển và sinh tổng hợp enzyme của chủng xạ khuẩn HX 10.7. Kết quả cho thấy môi trường thích hợp để lên men sinh tổng hợp lignin peroxidase của chủng HX10.7 có thành phần gồm (g/l): glucose, 8; cao nấm men, 4; MgSO₄.7H₂O, 0,5; Na₂HPO₄, 0,6; KH₂PO₄, 0,5; CaCO₃, 0,5, và muối vi lượng. Trong môi trường này, sinh khối tế bào đạt cao nhất là 4,38 g/l ở 42 h rồi giảm nhẹ và giữ ổn định, còn hoạt tính enzyme đạt cao nhất là 128 U/l ở 66 h.

Tim các khoáng xác định có ý nghĩa công nghệ và mức thay đổi của biến ảnh hưởng

Mục đích tối ưu thành phần môi trường theo phương pháp thực nghiệm Box-Wilson trong thí nghiệm này là tìm hàm lượng nguồn carbon và nitrogen sao cho thu được lượng enzyme lớn nhất. Để có thể thực hiện theo phương pháp này, cần tìm ra giới hạn trong các khoáng xác định của các yếu tố. Trong thành phần của môi trường thích hợp, có 3 yếu tố cần xác định khoáng thay đổi là glucose, cao nấm men và MnSO₄, các yếu tố khác được giữ nguyên. Để tìm khoáng nồng độ có ý nghĩa công nghệ của cao nấm men (X₁), glucose (X₂) và MnSO₄ (X₃), từng biến được khảo sát riêng rẽ trong môi trường cơ sở với nồng độ thay đổi trong khoảng từ 2 - 10 g/l; 2 - 20 g/l và 0 - 6 mM tương ứng.

Kết quả trên hình 1 cho thấy hoạt tính LiP cao nhất ở khoảng nồng độ cao nấm men từ 3 - 5 g/l, glucose từ 5 - 9 g/l và MnSO₄ từ 2 - 4 mM. Đây là khoảng nồng độ có ý nghĩa công nghệ của các biến. Trong môi trường nuôi cấy, hàm lượng các nguồn dinh dưỡng nằm ở ngoài khoảng trên thì hoạt tính enzyme giảm đi rõ rệt. Kết quả trên hình 1 chỉ ra rằng với nồng độ glucose sử dụng từ 5 trở xuống và từ 10 cho đến 20, hoạt tính enzyme chỉ đạt từ 20 - 60 U/l. Tương tự với nồng độ cao nấm men và nồng độ MnSO₄. Bảng 2 trình bày các giá trị được sử dụng trong tối ưu thành phần môi trường theo phương pháp Box-Wilson

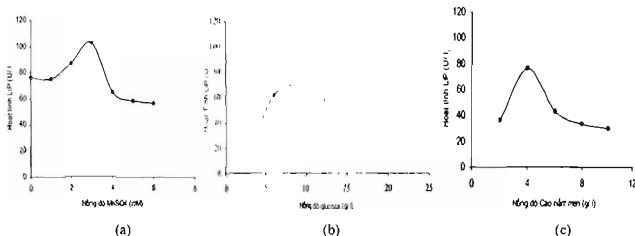
Kết quả thực nghiệm được đánh giá bằng cách xác định hàm mục tiêu là hoạt tính LiP, được ký hiệu là Y (U/lit). Số thí nghiệm là N = 2³ = 8. Ma trận thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.

Theo bảng 3, sự phối hợp của các thành phần môi trường là glucose, cao nấm men và MnSO₄ ở nồng độ cao (+) và thấp (-) khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt tới hoạt tính enzyme của chủng xạ khuẩn nghiên cứu. Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi nồng độ các thành phần môi trường ở mức thấp (-) thì hoạt

tính là 67,25 U/l, nhưng chỉ cần thay đổi nồng độ $MnSO_4$ ở mức cao, còn nồng độ glucose và cao nấm men ở mức thấp (-) thì hoạt tính enzyme thu được là 106 U/l. Dựa trên kết quả nhận được trong bảng 3, quá trình tối ưu tiếp theo được thực hiện nhằm tìm ra

một tương quan thích hợp nhất giữa glucose, cao nấm men và $MnSO_4$ trong môi trường nuôi cấy.

Tổng trung bình hàm mục tiêu $\sum \bar{y} = 587,5$ và tổng phương sai đồng $\sum S_f^2 = 141,75$.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ $MnSO_4$ (a), glucose (b) và cao nấm men (c) đến hoạt tính enzyme LIP của chủng *Streptomyces* HX10.7

Bảng 2. Các yếu tố biến đổi của thành phần môi trường lên men

Biến ảnh hưởng	X_1 [g/l]	X_2 [g/l]	X_3 [mM]
Khoảng có ý nghĩa công nghệ	3 - 5	5 - 9	2 - 4
Mức gốc, x_0	4	7	3
Mức trên (+)	5	9	4
Mức dưới (-)	3	5	2

(Ký hiệu X đã được giải thích trong bài).

Bảng 3. Ma trận thí nghiệm và kết quả

STT	\tilde{X}_1	\tilde{X}_2	\tilde{X}_3	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	\bar{Y}	S_f^2
1	-	-	-	3	5	2	65	69,5	67,25	10,125
2				3	5	4	111	102,5	106,75	36,125
3				3	9	2	69	77,5	73,25	36,125
4				3	9	4	65	62,5	63,75	3,125
5				5	5	2	53	59	56	18
6				5	5	4	115,5	123	119,25	28,125
7				5	9	2	49,5	54	51,75	10,125
8	+	+	+	5	9	4	49,5	49,5	49,5	0

(Các ký hiệu đã được giải thích trong bài).

Kiểm tra độ đồng nhất của ma trận theo chuẩn Cochran:

Chuẩn Cochran theo tính toán:

$$G_n = \frac{\max S_j^2}{\sum S_j^2} = 0,254$$

Chuẩn Cochran theo tra bảng. $G_n(0,05, N, k) = 0,8159$

$$y = b_0 + b_1 \bar{X}_1 + b_2 \bar{X}_2 + b_3 \bar{X}_3 + \dots + b_n \bar{X}_n + b_{12} \bar{X}_1 \bar{X}_2 + b_{23} \bar{X}_2 \bar{X}_3 + \dots + b_{n-1,n} \bar{X}_{n-1} \bar{X}_n$$

Áp dụng công thức tính hệ số của mô hình: $b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i x_{ij}$

Ta được: $b_0 = 73,4375$; $b_1 = -4,3125$; $b_2 = -11,875$; $b_3 = 11,375$; $b_{12} = -4,625$; $b_{23} = -14,3125$

$$\text{và: } y = 73,4375 - 4,3125 \bar{X}_1 - 11,875 \bar{X}_2 + 11,375 \bar{X}_3 - 4,625 \bar{X}_1 \bar{X}_2 - 14,3125 \bar{X}_2 \bar{X}_3 \quad (1)$$

Lấy đạo hàm toàn phần của hàm số trên theo từng biến rồi cộng lại ta được hàm số sau:

$$Y = -4,8125 - 4,625 \bar{X}_1 - 18,9375 \bar{X}_2 - 14,3125 \bar{X}_3 \quad (2)$$

Kiểm tra sự có nghĩa của các hệ số trong mô hình theo chuẩn Student (t)

Tra bảng chuẩn Student (t) theo số bậc tự do $f_1 = N \cdot (k-1) = 8$, với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$, ta được $t = 2,306$

Phương sai cho từng thí nghiệm:

$$S_y^2 = \frac{1}{N} \sum S_j^2 = 17,718$$

Phương sai cùng loại cho mỗi lần đo.

$$S_y^2 = \frac{1}{k} S_y^2 = 8,859$$

Phương sai mà các hệ số xác định:

$$S_b^2 = \frac{1}{B} S_y^2 = 2,214 \rightarrow S_b = 1,487$$

Xét tích: $t.S_b = 1,487 \cdot 2,306 = 3,429$

Vậy $|B_0| = |-4,8125| = 4,8125 > t.S_b = B_0$ có nghĩa

$$|B_1| = |-4,625| > t.S_b = B_1 \text{ có nghĩa}$$

$$|B_2| = |-18,9375| > t.S_b = B_2 \text{ có nghĩa}$$

$$|B_3| = |-14,3125| > t.S_b = B_3 \text{ có nghĩa}$$

Vậy mô hình là:

Trong đó 0,05: mức ý nghĩa; k: số thí nghiệm n lặp lại; N: tổng số thí nghiệm.

Như vậy, $G_n > G_n$, nghĩa là ma trận đồng nhất và được chấp nhận.

Xác định hệ số của mô hình:

Mô hình quy hoạch thực nghiệm có dạng:

$$Y = -4,8125 - 4,625 \bar{X}_1 - 18,9375 \bar{X}_2 - 14,3125 \bar{X}_3$$

Kiểm tra sự thích ứng của mô hình theo chuẩn Fisher

Phương sai thích ứng được tính theo công thức

$$S_{tu}^2 = \left(\frac{1}{N-B} \right) \sum_{i=1}^N (y_i^{tu} - y_i^{tn})^2 = 13280,78$$

B' là số hệ số có nghĩa (kể cả B_0)

$$F_{tt} = \frac{S_{tu}^2}{S_y^2} = 1499,129$$

Mô hình thích ứng khi $F_{tt} < F_b$.

F_b được tra trong bảng tiêu chuẩn Fisher với $F_b(f_1, f_2)$; $f_1 = 8$; $f_2 = N-B' = 4$. Ta có $F_b = 6,04$.

Mô hình không thích ứng vì $F_{tt} > F_b$, nhưng do tất cả các hệ số trong mô hình đều có nghĩa nên theo lý thuyết thì quá trình tối ưu vẫn được tiếp tục thực hiện.

Tối ưu hóa

X_1 : [3÷5]; X_2 : [5÷9] và X_3 : [2÷4] khi đó ta có: mức biến góc: 4, 7 và 3 vậy khoảng biến đổi sẽ là: 1, 2 và 1.

$$|B_1\lambda_1| = 4,625; |B_2\lambda_2| = 37,875; |B_3\lambda_3| = 14,3125$$

Với $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ lần lượt là khoảng thay đổi của biến X_1, X_2, X_3 .

Giá trị $|B_2\lambda_2|$ lớn nhất nên chọn X_2 là biến cơ sở.

Chọn $\Delta_{CS} = 0,5$ ta có:

$$\Delta_1 = \frac{|b_1\lambda_1|}{|b_{CS}\lambda_{CS}|} \Delta_{CS} = 0,1$$

$$\Delta_3 = \frac{|b_3\lambda_3|}{|b_{CS}\lambda_{CS}|} \Delta_{CS} = 0,1$$

Như vậy bước nhảy của các biến của cao nấm men là 0,1 g/l; của glucose là 0,5 g/l và $MnSO_4$ là 0,1 mM.

Thí nghiệm theo sơ đồ thiết kế:

Dựa vào hệ số của mô hình (2) và bước nhảy đã được tính toán của các biến, thiết lập ma trận như bảng 4.

Bảng 4 cho thấy, khả năng sinh tổng hợp lignin peroxidase cao khi nồng độ carbon và nitrogen ở mức thấp (glucose 5,5 g/l và cao nấm men 3,7 g/l). Kết quả trên hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả (Baecker, Shelver, 1998; Cullen, Kersten, 2004; Godden *et al.*, 1992).

Bảng 4 Ma trận thực nghiệm và kết quả

STT	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_m
1	4	7	3	86,5	91,5	89
2	3,9	6,5	2,9	97	103,5	100,25
3	3,8	6,0	2,8	109,5	111,5	110,5
4	3,7	5,5	2,7	154,5	158	156,25
5	3,6	5,0	2,6	91,5	101,5	96,5
6	3,5	4,5	2,5	112,5	109,5	111
7	3,4	4,0	2,4	113	111,5	112,25
8	3,3	3,5	2,3	102	102,5	102,25

Chú thích: Y_m : giá trị trung bình của Y_i

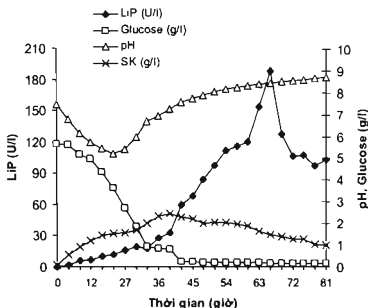
Môi trường tối ưu cho lên men sinh tổng hợp lignin peroxidase bởi chủng HX10.7 có thành phần như sau (g/l): glucose, 5,5; cao nấm men, 3,7; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5; KH_2PO_4 , 0,5; Na_2HPO_4 , 0,6; $CaCO_3$, 0,5; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2,7 mM và $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,8 mM.

Lên men sinh tổng hợp lignin peroxidase trên môi trường tối ưu

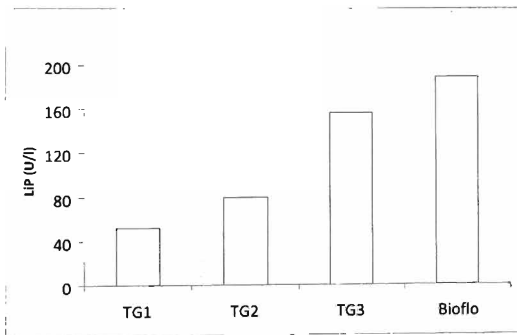
Hình 2 trình bày diễn biến của quá trình lên men sinh lignin peroxidase của chủng HX10.7 trong hệ thống Bioflo 110 với môi trường tối ưu. Pha lag kéo dài khoảng 4 h, sau đó chủng phát triển mạnh, sinh khối (SK) tăng nhanh, đạt nồng độ cao nhất 2,45 g SK/kg tại 39 h. Ở nửa sau của quá trình lên men, sinh khối giảm dần đến 1 g/l lúc kết thúc thí nghiệm. Khoảng 50% lượng đường glucose trong môi trường được tiêu thụ

trong 27 h đầu. Từ h thứ 42 thì nồng độ đường chỉ còn xấp xỉ 0,2 g/l. Có sự giảm pH của môi trường lên men trong 24 h đầu, từ 7,44 xuống tới 5,2, sau đó tăng dần liên tục tới 8,7 ở thời điểm kết thúc lên men.

Hoạt tính LiP trong dịch lên men xuất hiện khá sớm, nhưng ở mức rất thấp. Từ h thứ 36, hoạt tính enzyme tăng nhanh, đạt mức cao nhất ở 66 h (189 U/L), nhưng lại giảm nhanh trong 6 h tiếp theo rồi ổn định ở mức 110 U/L. Nguyên nhân của hiện tượng tạo ra đỉnh cực đại khá nhọn này chưa rõ. Có thể vì hàm lượng glucose và một số thành phần khác đã xuống rất thấp, gần như được sử dụng hết. Như vậy, đối với quá trình lên men theo mẻ (batch) trong hệ thống Bioflo 110 thì thời điểm thích hợp nhất để kết thúc lên men và thu hồi enzyme là khoảng 65-67 h.



Hình 2. Động thái lên men sinh tổng hợp lignin peroxidase của chủng xạ khuẩn HX10 7 trên môi trường tối ưu



Hình 3. Hoạt tính enzyme LiP trong các môi trường và điều kiện khác nhau. Chú thích: TG1, TG2 và TG3: Hoạt tính LiP trong bình tam giác tương ứng với môi trường ISP2, thích hợp và tối ưu. Bioflo: Hoạt tính LiP trong bình lên men Bioflo 110 dung tích 7.5 l với môi trường tối ưu

So sánh khả năng sinh tổng hợp LiP trên môi trường ban đầu, môi trường lựa chọn và môi trường tối ưu của chủng HX 0.7

Khả năng sinh LiP của chủng HX10.7 được khảo sát trong 3 môi trường như sau: môi trường ISP2 là môi trường nuôi xạ khuẩn kinh điển; môi

trường thích hợp được lựa chọn sau khi xác định ảnh hưởng của các thành phần môi trường tới sinh tổng hợp enzyme; và môi trường đã tối ưu theo phương pháp Box-Wilson như đã trình bày ở trên.

Kết quả cho thấy, trong bình tam giác đường cong sinh trưởng của chủng HX10.7 trên các môi

trường khảo sát là tương tự như nhau, và hoạt tính LiP đều đạt cao nhất tại 70-72 h. Tuy nhiên, các giá trị cực đại lại khác nhau tùy theo môi trường, đạt lần lượt 52, 80 và 156 U/l tương ứng với môi trường ISP2, thích hợp và tối ưu. Như vậy, sử dụng môi trường thích hợp đã nâng hoạt tính LiP lên 1,54 lần, còn sau khi tối ưu hoạt tính LiP đã tăng lên 3 lần.

Thiết bị lên men cũng ảnh hưởng rất tới sinh tổng hợp LiP. Cùng sử dụng môi trường tối ưu nhưng trong bình tam giác hoạt tính LiP cao nhất đạt 156 U/l, còn trong hệ thống lên men Bioflo 110 dung tích 7,5 l thì LiP đạt 189 U/l, tăng khoảng 1,2 lần. So với điểm xuất phát là môi trường ISP2 thì tối ưu hóa và cải thiện điều kiện lên men, cụ thể là sử dụng hệ thống Bioflo 110 được điều khiển tối về nhiệt độ và cấp oxy đã nâng hoạt tính LiP lên 3,63 lần (hình 3). Tuy nhiên, vẫn có thể cải thiện quá trình sinh tổng hợp LiP nhằm đạt sinh khối nhiều hơn, nâng cao hoạt tính enzyme ở điểm cực đại và ngăn ngừa sự sụt giảm nhanh sau đó, bằng cách áp dụng kỹ thuật lên men có bổ sung cơ chất (fed-batch), sao cho kiểm soát được nồng độ nguồn carbon và nitrogen ở mức thấp, với tỷ lệ C:N trong khoảng 5 - 5,5. Kỹ thuật này đang được áp dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

KẾT LUẬN

Môi trường lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* HX10.7 sinh lignin peroxidase đã được tối ưu hóa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box-Wilson cho các thành phần glucose, cao nấm men và manganese sulphate. Môi trường tối ưu có thành phần: glucose, 5,5 g/l; cao nấm men, 3,7 g/l; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2,7 mM; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g/l; KH_2PO_4 , 0,5 g/l; Na_2HPO_4 , 0,6 g/l; $CaCO_3$, 0,5 g/l và $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,8 mM. So với hoạt tính LiP trong dịch lên men ở bình tam giác với môi trường ban đầu thì việc tối ưu hóa môi trường đã làm tăng đại lượng này lên 3 lần. Kết hợp với nâng cấp lên men lên hệ thống Bioflo 110 dung tích 7,5 lít thì kết quả này tăng lên 3,63 lần. Tuy nhiên, hoạt tính LiP vẫn còn có thể tăng hơn nữa nếu áp dụng kỹ thuật lên men có bổ sung cơ chất (fed-batch), sao cho kiểm soát được nồng độ nguồn carbon và nitrogen ở mức thấp, với tỷ lệ C:N trong khoảng 5-5,5.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của Bộ Công thương cấp cho đề tài mã số DT.07.08/CNSHCB thuộc đề án "Phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020". Xin chân thành cảm ơn sự

hỗ trợ về trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baecker AAW, Shelver GD (1998) Methods of microbial pre-treating wood chips for paper making. *US Patent* N° 5851351.
- Bohast RJ, Saha BC (1997) Ethanol production from agricultural biomass substrates. *Adv Appl Microbiol* 44: 261-286.
- Crawford DL, Pometto AL, Crawford RL (1983) Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: Isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermediate. *Appl Environ Microbiol* 45(3): 898-904
- Cullen D, Kersten PJ (2004) Enzymology and molecular biology of lignin degradation. *The Mycota III*. In *Biochem Mol Biol* 2nd Edition. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
- Godden B, Ball AS, Helvenstein P, McCarthy AJ (1992) Towards elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes. *J Gen Microbiol* 138: 2441-2448.
- Hansen TT, Nielsen HP (2001) Method of treating mechanical pulp with a phenol-oxidizing enzyme system. *US Patent* N° 6207009 B1.
- Kumar R, Kumar A (2006) Process for bio-bleaching of Kraft pulp using bacterial consortia. *US Patent* N° 7018510 B2.
- Lund M, Felby C (2003) Process for treating pulp with laccase and a mediator to increase paper wet strength. *US Patent* N° 6610172 B1.
- Mercer DK, Iqbal M, Miller PGG, McCarthy AJ (1996) Screening actinomycetes for extracellular peroxidase activity. *Appl Environ Microbiol* 62(6): 2186-2190.
- Miller GL (1959) Use of diminosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(3): 426-428.
- Niladevi KN, Prema P (2005) Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes. *Actinomycetologica* 19: 40-47.
- Pometto AL, Crawford DL (1986) Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. *Appl Environ Microbiol* 52(2): 246-250.
- Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT (2009) Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbiol Biotechnol* 2(2): 164-177.
- Trupkin S, Levin L, Forchiassin F, Viale A (2003) Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme

production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 682-690.

Tuncer M, Ball AS, Rob A, Wilson MT (1999) Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enz Microb Technol* 25: 38-47.

Velaquez B, Marisnez-Luaces V, Vázquez A, Dee V, Massaldi H (2007) Experimental design techniques applied to study of oxygen consumption in a fermenter. *J Appl Quantitative Methods*, 2(1): 135-141.

Yee DC, Jahng D, Wood TK (1996) Enhanced expression and hydrogen peroxide dependence of lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporis* T7A. *Biotechnol Prog* 12: 40-46.

OPTIMIZATION OF FERMENTATION MEDIUM FOR PRODUCTION OF LIGNIN PEROXIDASE BY *STREPTOMYCES* HX10.7

Vu Van Loi, Phan Thi Hong Thao, Do Tat Thinh, Pham Thanh Huyen, Ho Tuyen, Pham Thi Bích Hóp*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Strain *Streptomyces* HX10.7 was isolated from forest soil of Vietnam and selected for its high and stable lignin peroxidase activity. The physiological and taxonomical characteristics of strain HX10.7 were studied in earlier works and favorable cultivation conditions were investigated. It was shown that the most favorable medium for shake flask cultivation of strain HX10.7 contained (g/L): glucose, 8; yeast extract, 4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; Na_2HPO_4 , 0.6; KH_2PO_4 , 0.5; $CaCO_3$, 0.5, and trace elements. The most suitable cultivation temperature was 28 °C. In this paper, the synthesis of lignin peroxidase by strain HX10.7 was further enhanced as the results of optimization of the medium composition using Box-Wilson experimental design method. The experimental design was made with three independent variables, e.g. glucose, yeast extract and manganese sulphate concentrations, resulting in the optimal cultivation medium of following composition (g/L): glucose, 5.5; yeast extract, 3.7; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; KH_2PO_4 , 0.5; Na_2HPO_4 , 0.6; $CaCO_3$, 0.5; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2.7 mM; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.8 mM; pH 7-7.2. Lignin peroxidase synthesis by *Streptomyces* HX10.7 was remarkably influenced by the medium composition and the cultivation conditions. In shake flask cultures, lignin peroxidase activity reached 52 U/L in medium ISP2 - a basic medium for streptomycetes. In both the favorable and optimal media mentioned above, lignin peroxidase synthesis was enhanced to 1.5 and 3 times, respectively. When grown in the 7.5-L Bioflo 110 fermenter, strain HX10.7 gave the highest lignin peroxidase activity of 189 U/L, which was about 3.6 times higher than that in the shaking flask cultures before optimization. Further improvement of lignin peroxidase production seems feasible if fed-batch cultivation techniques were applied, enabling the control of comparatively low carbon and nitrogen concentrations at the C:N ratios around 5.5.

Keywords: Lignin degradation, lignin peroxidase, streptomycetes, medium optimization, Box-Wilson experimental design method.

* Author for correspondence: Tel: +84-4-38363257; Fax: +84-4-38363144; E-mail: phamhop@ibt.ac.vn