

TỐI ƯU HOÁ KHẢ NĂNG TẠO CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC CỦA CHỦNG NẤM MEN *CANDIDA TROPICALIS* 1214-BK14 PHÂN LẬP TỪ GIẾNG KHAI THÁC DẦU Ở MỎ BẠCH HỒ - VŨNG TÀU, VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT

Kiều Thị Quỳnh Hoa, Nguyễn Thị Yên, Đặng Thị Yến

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ktquynhhoa@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 11.9.2016

Ngày nhận đăng: 20.12.2016

TÓM TẮT

Chủng nấm men *Candida tropicalis* 1214-BK14, phân lập tại giếng khai thác dầu ở mỏ Bạch Hồ-Vũng Tàu, có khả năng sử dụng dầu thô như nguồn carbon duy nhất và tạo chất hoạt động hóa bề mặt sinh học (CHHBMSH) với chỉ số nhũ hóa E₂₄ là 57 %. Để nâng cao khả năng tạo CHHBMSH của chủng này, chúng tôi áp dụng phương pháp đáp ứng bề mặt sinh học sử dụng phần mềm DX7 dựa vào 3 yếu tố ảnh hưởng chính với khoảng giá trị lựa chọn: 2,5 - 5 (w/v) dầu thô, 0,35 - 0,45 % (w/v) (NH₄)₂SO₄ và pH từ 5 đến 8. Dựa trên tính toán của phần mềm tối ưu DX7, ma trận thực nghiệm với 20 thí nghiệm (6 thí nghiệm lặp lại tại tâm và 14 thí nghiệm tại các điểm khác nhau) được tạo ra. Kết quả phân tích từ 20 thí nghiệm cho thấy, 3 yếu tố dầu thô, (NH₄)₂SO₄ và pH đều ảnh hưởng (riêng rẽ và tương tác) đến sự tạo thành CHHBMSH của chủng *Candida tropicalis* 1214-BK14 (với giá trị *p*-value < 0,05 so với chuẩn F). Từ các khảo sát trên, 30 giải pháp được đưa ra nhằm xác định sự tạo thành CHHBMSH của chủng nghiên cứu. Ở giá trị 3,97 % (w/v) dầu thô, 0,37 % (NH₄)₂SO₄ (w/v) và pH 6,1, hàm lượng CHHBMSH tạo ra cao nhất với chỉ số nhũ hóa E₂₄ là 80,2%. Trong điều kiện tối ưu với CHHBMSH tạo ra, hàm lượng dầu tổng số được phân hủy là 89,8%, hiệu quả phân hủy n-alkan từ C₁₀ đến C₄₃ đạt 80,47 đến 98,58 %. Điều này cho thấy, phương pháp đáp ứng bề mặt là công cụ hữu hiệu được sử dụng nhằm nâng cao khả năng tạo CHHBMSH của chủng nấm men *Candida tropicalis* 1214-BK14 trên nguồn cơ chất khó phân hủy là dầu thô.

Từ khóa: Chất hoạt động bề mặt sinh học, dầu thô, nấm men, phương pháp đáp ứng bề mặt

MỞ ĐẦU

Chất hoạt động bề mặt sinh học (CHĐBMSH) là hợp chất có chứa cả nhóm chức ưa nước và ưa dầu trong cùng một phân tử do vi sinh vật (VSV) như vi khuẩn, nấm men và nấm mốc tạo ra. Với đặc tính như hoạt động bề mặt, nhũ hóa và tạo bọt, chúng có thể tác động tương hỗ làm giảm sức căng bề mặt giữa pha dầu và nước. CHĐBMSH không những đóng vai trò quan trọng trong ngành công nghiệp dầu khí (nâng cao hiệu suất khai thác, thu hồi dầu, xử lý ô nhiễm dầu) mà còn được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp (mỹ phẩm, thực phẩm, dược), nông nghiệp và môi trường bởi những ưu điểm như khả năng tự phân hủy, không gây độc với môi trường, có thể duy trì hoạt tính ổn định trong các điều kiện (nhiệt độ, pH, độ muối) khác nhau (Ron *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2006; Saharan *et al.*, 2011; Cassia *et al.*, 2014). Vì phần lớn các CHĐBMSH là hợp chất trao đổi thứ cấp nên việc tối ưu hóa thành

phần môi trường và điều kiện lên men là rất quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp của chúng. Trước đây, để nghiên cứu ảnh hưởng của một tập hợp gồm nhiều yếu tố khác nhau người ta thường nghiên cứu ảnh hưởng của từng yếu tố, phương pháp này không những mất nhiều thời gian mà còn cho kết quả thiếu chính xác. Hiện nay, việc ứng dụng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response surface methods-RSM) gồm tập hợp các công cụ toán học nhằm thiết kế và phân tích các thí nghiệm cho quá trình tối ưu đã giải quyết được các mặt hạn chế của các phương pháp cổ điển (Tamilarasan *et al.*, 2012; Khayati *et al.*, 2013; Abbasi *et al.*, 2013). Ưu điểm của phương pháp này là có thể nghiên cứu đồng thời nhiều yếu tố trong cùng một thời gian, từ đó đánh giá ảnh hưởng đơn lẻ và tương tác giữa các yếu tố đến khả năng tạo CHĐBMSH của VSV. Kết hợp sử dụng phần mềm tin sinh để phân tích số liệu có thể đánh giá sự chính xác, tin cậy trong thực nghiệm (Gundogdu *et al.*, 2014). Trên thế giới, phương pháp RSM đã được

ứng dụng để tối ưu quá trình sinh tổng hợp CHĐBMSH của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*... (Liu *et al.*, 2015; Turbakar *et al.*, 2015, Kumar *et al.*, 2015). Tuy nhiên, các nghiên cứu này mới chỉ tập trung vào tối ưu quá trình tạo CHĐBMSH trên nguồn cơ chất dễ phân hủy như glucose, dầu oliu, dầu đậu nành...(Fontes *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2014, Rufino *et al.*, 2014, Solaiman *et al.*, 2001). Sử dụng phương pháp RMS để tối ưu quá trình tạo CHĐBMSH của nấm men trên nguồn cơ chất dầu thô là mới ở trên thế giới và hiện chưa được nghiên cứu ở Việt Nam.

Chủng nấm men *Candida tropicalis* 1214-BK14 được phân lập từ giếng khai thác dầu ở mỏ Bạch Hổ, Vũng Tàu có khả năng tạo CHĐBMSH trên nguồn cơ chất dầu thô với chỉ số nhũ hóa E24 ban đầu là 57%. Ở công bố trước, nhóm nghiên cứu đã chỉ ra ba yếu tố quan trọng tác động đến khả năng tạo CHĐBMSH của chủng nấm men này là dầu thô, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và pH. Trong nghiên cứu này, phương pháp RSM với thiết kế tại tâm (CCD) kết hợp với phần mềm tin sinh DX7 được sử dụng nhằm xác định các điều kiện tối ưu của ba yếu tố trên đến quá trình tạo CHĐBMSH, từ đó đánh giá khả năng phân hủy dầu thô trong điều kiện môi trường tối ưu tìm được.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng nấm men *C. tropicalis* 1214-BK14 được phân lập từ giếng khai thác dầu ở mỏ Bạch Hổ - Vũng Tàu trên môi trường khoáng đặc hiệu (Kiều Thị Quỳnh Hoa *et al.*, 2016).

Thí nghiệm tối ưu được tiến hành trong bình tam giác có thể tích 500 ml chứa 150 ml môi trường. Thành phần môi trường bao gồm (g.L⁻¹): KH₂PO₄ 0,5; NaCl 10; MgCl₂ 1; MgSO₄ 0,4, hàm lượng dầu thô, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, và pH được bổ sung vào môi trường

theo bảng 1 với khoảng giá trị: dầu thô (2,5-5 % w/v); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,35-0,45 % w/v) và pH (5-8).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp quy hoạch thực nghiệm

Xác định các yếu tố ảnh hưởng bằng cách sử dụng quy hoạch trực giao đối xứng cho 3 yếu tố: hàm lượng dầu thô, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và pH, mỗi yếu tố tiến hành tại 5 mức (- α , -1, 0, +1, + α). Quy hoạch thực nghiệm gồm 20 thí nghiệm, trong đó có 6 thí nghiệm lặp lại tại tâm, và 14 thí nghiệm tại các điểm khác nhau được tạo ra với 1 hàm mục tiêu là hàm lượng CHĐBMSH thông qua chỉ số nhũ hóa E₂₄ (Bảng 2).

Xử lý số liệu

Xử lý số liệu thực nghiệm bằng phần mềm thống kê Design-Expert 7.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA), để phân tích các hệ số quy hồi, bề mặt đáp ứng và tối ưu hóa với thuật toán hàm mong đợi.

Phương pháp phân tích

Hàm lượng CHĐBMSH tạo ra được xác định dựa vào chỉ số nhũ hóa E₂₄ (Cooper, Goldenberg, 1987). Hiệu quả phân hủy dầu thô trong điều kiện tối ưu sau khi sử dụng RMS được phân tích bằng phương pháp GC-MS.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chọn miền khảo sát

Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã xác định được 3 yếu tố chính ảnh hưởng tới khả năng tạo CHĐBMSH của chủng nấm men *C. tropicalis* 1214-BK14 là dầu thô, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và pH (Kiều Thị Quỳnh Hoa *et al.*, 2016). Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn miền khảo sát của các yếu tố trên để tiến hành tối ưu quá trình tạo CHĐBMSH với các giá trị như sau: dầu thô (2,5-5% w/v); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,35-0,45% w/v) và pH (5-8) (Bảng 1).

Bảng 1. Giá trị mã hóa và giá trị thực nghiệm của các biến số lựa chọn.

Biến số	Ký hiệu	Đơn vị	Ký hiệu giá trị mã hóa				
			- α	-1	0	+1	+ α
Dầu thô (A)	X ₁	(%)	1,65	2,5	3,75	5	5,858
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B)	X ₂	%	0,32	0,35	0,4	0,45	0,48
pH (C)	X ₃		3,98	5	6,5	8	9,02

Thiết lập mô hình

Giá trị mã hóa, kết quả thiết kế với ma trận thực nghiệm được trình bày trên bảng 2. gồm 20 thí

th nghiệm tương ứng với 20 giá trị khác nhau của 3 yếu tố dầu thô, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH và hàm lượng CHĐBMSH (hàm mục tiêu) thu được từ thực nghiệm.

Ảnh hưởng của các yếu tố dầu thô, $(NH_4)_2SO_4$ và pH cũng như sự tương tác giữa các yếu tố đến hàm mục tiêu được tiến hành xây dựng bởi hàm hồi quy bậc 2 như sau:

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Trong đó, Y_i hàm mục tiêu, β_0 hệ số tự do, β_i , β_{ii} , β_{ij} là các vectơ tham số của mô hình được xác định qua thực nghiệm. Mô hình thống kê chỉ có ý nghĩa và được sử dụng sau khi thỏa mãn các tiêu chuẩn thống kê (Fisher).

Bảng 2. Bảng ma trận thực nghiệm với các yếu tố lựa chọn.

Thí nghiệm	Giá trị mã hóa			Giá trị thực			CHĐBMSH (E24%)	
	X_1	X_2	X_3	Dầu thô (% w/v)	$(NH_4)_2SO_4$ (% w/v)	pH	Giá trị thực nghiệm	Giá trị dự đoán
1	0	0	0	3,75	0,4	6,5	80	80,1
2	-1	+1	0	2,5	0,35	5	56,1	56,6
3	0	0	0	3,75	0,4	6,5	79	80,1
4	0	- α	0	3,75	0,32	6,5	75	76,7
5	0	0	0	3,75	0,4	6,5	81,05	80,1
6	-1	+1	+1	2,5	0,45	5	51,85	51,8
7	+1	+1	+1	5	0,35	5	73	70,88
8	-1	+1	+1	2,5	0,45	8	61,53	63,91
9	0	0	0	3,75	0,4	6,5	81,5	80,1
10	+ α	0	0	5,85	0,4	6,5	68	68,43
11	0	0	+ α	3,75	0,4	9,02	54	53,4
12	0	+ α	0	3,75	0,48	6,5	74,3	72,26
13	0	0	0	3,75	0,4	6,5	80,5	80,1
14	+ α	+1	- α	5	0,45	5	58,02	59,5
15	-1	+1	+1	2,5	0,35	8	59,06	57,81
16	+1	+1	+1	5	0,45	8	64,98	64,78
17	- α	0	0	1,65	0,4	6,5	56,45	55,66
18	0	0	0	3,75	0,4	6,5	78,53	80,1
19	0	0	- α	3,75	0,4	3,98	47,67	47,91
20	+1	-1	+1	5	0,35	8	65	65,29

Phân tích sự có nghĩa của các hệ số hồi quy và sự tương quan của mô hình

Phân tích sự có nghĩa của các hệ số hồi quy và sự tương quan của mô hình được đánh giá qua phân tích ANOVA (Bảng 3) cũng như các chỉ số tương quan (Bảng 4). Sự có nghĩa của các hệ số hồi quy được kiểm định bởi chuẩn F, với các giá trị $p < 0,05$ cho biết các hệ số hồi quy là có nghĩa.

Ở bảng 3, giá trị phương sai của mô hình là 2343,32 tương ứng với giá trị F của mô hình (Model - F-value) là 89,03, giá trị này cho thấy mô hình hoàn toàn có ý nghĩa thống kê với độ tin

cậy 99,99% ($p < 0,0001$). Tương tác của từng yếu tố (dầu thô, $(NH_4)_2SO_4$ và pH) cũng như tương tác từng cặp của các yếu tố này đều có nghĩa đến sự tạo CHĐBMSH trong mô hình bởi giá trị $p < 0,05$ (Bảng 3). Điều này được minh chứng rõ hơn khi quan sát bề mặt đáp ứng trên hình 1a, 1b và 1c. Kết quả phân tích cũng cho thấy sự lựa chọn các yếu tố cũng như khoảng giá trị của các yếu tố để thiết lập mô hình là phù hợp. Chuẩn F của mô hình ở “sự không tương thích” là 4,51 với giá trị $p > 0,05$ chỉ ra “sự không tương thích” ở đây là vô nghĩa và chỉ có 10,48% ($p = 0,10488$) xảy ra độ nhiễu. Điều này cho thấy quá trình thiết lập mô hình mô phỏng

thực nghiệm rất tốt. Sự phù hợp của mô hình với thực nghiệm cũng được kiểm chứng bằng hệ số tương quan bội R^2 (R-Squared) ở bảng 4. Giá trị R^2 càng gần 1 thì giá trị thực nghiệm càng gần với giá trị dự đoán của mô hình, $R^2 = 0,99$ chứng tỏ

chỉ có 0,01% tổng giá trị của các yếu tố không được giải thích bằng mô hình. Giá trị Adj R-Squared và Pred R-Squared ở bảng 4 khá cao lần lượt là 0,98 và 0,92 cho thấy mô hình mô phỏng đúng với thực nghiệm.

Bảng 3. Kết quả phân tích hồi quy trong tối ưu hóa hàm lượng CHĐBMSH.

Nguồn gốc	Phương sai	Bậc tự do	Mean Square	Giá trị-F	Giá trị (khả năng>F)	
Mô hình	2343,32	9	260,37	89,03	< 0,0001	Có nghĩa
X_1 (Đầu thô)	197,12	1	197,12	67,39	< 0,0001	
X_2 (NH ₄)	23,61	1	23,62	8,07	0,0175	
X_3 (pH)	36,24	1	36,24	12,39	0,0055	
X_1X_2	21,85	1	21,85	7,46	0,0211	
X_1X_3	23,39	1	23,39	7,99	0,0179	
X_2X_3	58,75	1	58,75	20,09	0,0012	
X_1^2	587,51	1	587,51	200,88	< 0,0001	
X_2^2	57,19	1	57,19	19,55	0,0013	
X_3^2	1562,29	1	1562,29	534,18	< 0,0001	
Sự không tương thích	22,54	5	4,51	3,36	0,1048	không có nghĩa

Bảng 4. Kết quả phân tích sự phù hợp của mô hình với thực nghiệm.

Thông số	Giá trị	Thông số	Giá trị
Std. Dev.	1,71	R-Squared	0,99
Mean	67,27	Adj R-Squared	0,98
C.V. %	2,54	Pred R-Squared	0,92
PRESS	194,21	Adeq Precision	26,62

Ảnh hưởng các yếu tố lựa chọn đến quá trình tạo CHĐBMSH

Kết quả phân tích các hệ số hồi quy và sự tương quan của mô hình cho thấy ảnh hưởng của các yếu tố đầu thô, (NH₄)₂SO₄ và pH đến giá trị hàm mong đợi được biểu diễn theo phương trình bậc 2 sau:

$$Y_{\text{CHĐBMSH (E24\%)}} = -276,239 + 50,19X_1 + 475,43X_2 + 50,21X_3 - 26,44X_1X_2 - 0,912X_1X_3 + 36,133X_2X_3 - 4,086X_1^2 - 796,807X_2^2 - 4,627X_3^2 \quad (2)$$

Trong đó $Y_{\text{CHĐBMSH}}$ là hàm lượng mong đợi, X_1, X_2, X_3 lần lượt là giá trị của các biến đầu thô, (NH₄)₂SO₄ và pH.

Theo số liệu phân tích bảng 3, tất cả các yếu tố đầu thô, (NH₄)₂SO₄ và pH đều có ảnh hưởng đến khả năng tạo CHĐBMSH của chủng *C. tropicalis* 1214-BK14 ($p < 0,05$) trong đó đầu thô là yếu tố có ảnh hưởng mạnh nhất với giá trị $p < 0,0001$. Điều này còn được minh chứng bởi sự dao động mạnh của hàm lượng CHĐBMSH tạo ra ở mỗi bước nhảy khác

nau của giá trị đầu thô ở bảng 2 và phương trình (2). Cũng trên bảng 3, hàm lượng (NH₄)₂SO₄ và pH có ảnh hưởng lớn đến quá trình tạo CHĐBMSH của chủng *C. tropicalis* 1214-BK14 thể hiện ở giá trị $p < 0,05$. Kết quả nghiên cứu này giống với nghiên cứu của Mady *et al.*, (2012), các chủng nấm men *Candida* ưa thích nguồn nitơ là (NH₄)₂SO₄, và pH cũng là yếu tố tác động rất lớn đến quá trình tạo CHĐBMSH. Tuy nhiên, khác với chủng *C. tropicalis* 1214-BK14, trong nghiên cứu của Mady, nguồn carbon ưa thích để tạo CHĐBMSH cao nhất của chủng *Candida* là sucrose chứ không phải là đầu thô, nguồn carbon này thường được nấm men thuộc chi *Candida* sử dụng (Mady *et al.*, 2012).

Ảnh hưởng tương tác của các yếu tố đến quá trình tạo CHĐBMSH

Kết quả bảng 2 cho thấy, giá trị hàm mong đợi CHĐBMSH tối ưu theo mô hình dự đoán với chỉ số

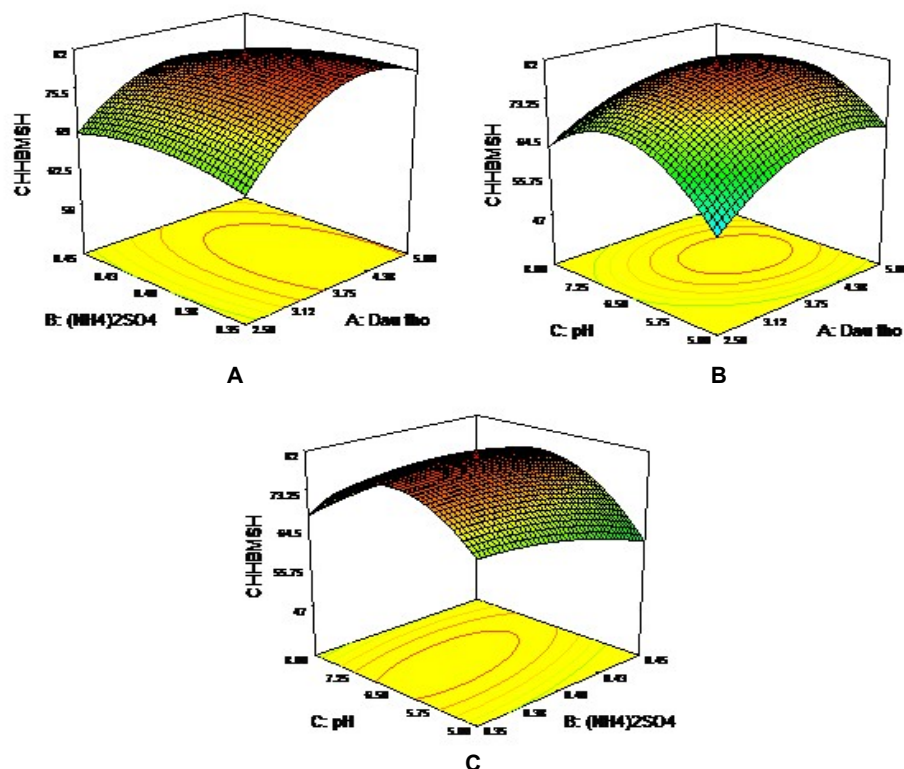
nhũ hóa E₂₄ là 81,05% ở các giá trị tại tâm: hàm lượng dầu thô, (NH₄)₂SO₄ và pH lần lượt là 3,75 (% w/v), 0,4 (% w/v) và 6,5 (thứ tự 1, 3, 5, 9, 13 và 18 trong bảng 2). Kết quả Hình 1a, 1b, và 1c mô phỏng ảnh hưởng tương tác của hai yếu tố đến quá trình tạo CHĐBMSH khi yếu tố còn lại được giữ ở giá trị tại tâm.

Ảnh hưởng tương tác của hai yếu tố dầu thô và (NH₄)₂SO₄ đến quá trình tạo CHĐBMSH khi giá trị pH được giữ tại tâm (pH 6,5) được thể hiện ở hình 1a và bảng 3. Với giá trị *p* < 0,0001 (Bảng 3) cho thấy tương tác của hai yếu tố dầu thô và (NH₄)₂SO₄ có ảnh hưởng mạnh đến quá trình tạo CHĐBMSH. Tại giá trị pH ở tâm, hàm lượng CHĐBMSH tạo ra với chỉ số nhũ hóa E₂₄ từ 73 đến 80,5% khi hàm lượng dầu thô và (NH₄)₂SO₄ lần lượt nằm trong khoảng 3,75 - 5% và 0,32 - 0,48%. Ngoài khoảng này, hàm lượng CHĐBMSH tạo ra thấp hơn và giảm đáng kể (chỉ số nhũ hóa E₂₄ nhỏ hơn 68 %) khi hàm lượng dầu thô nhỏ hơn 3,75%.

Hình 1b và bảng 3 cho thấy ảnh hưởng tương tác của dầu thô và pH đến quá trình tạo CHĐBMSH khi

(NH₄)₂SO₄ được giữ ổn định tại tâm (0,4% w/v). Sự tương tác của hai yếu tố này ảnh hưởng đáng kể đến sự tạo thành CHĐBMSH với giá trị *p* < 0,05 (*p* = 0,0179 (Bảng 3)). Hàm lượng CHĐBMSH tăng khi hàm lượng dầu thô tăng từ 3,75 đến 5%. Khi hàm lượng dầu thô thấp hơn 3,75% hay cao hơn 5% thì hàm lượng CHĐBMSH lại giảm. Tương tự với yếu tố pH thì hàm lượng CHĐBMSH được tạo ra cao nhất ở pH 6,1-6,5. Ngoài khoảng pH này (pH < 6,1 hoặc pH > 6,5), hàm lượng CHĐBMSH giảm, đặc biệt giảm mạnh ở pH < 5.

Hình 1c và bảng 3 thể hiện sự ảnh hưởng tương tác của hai yếu tố pH và (NH₄)₂SO₄ khi yếu tố dầu thô được giữ ở giá trị trung tâm (3,75% w/v). Theo bảng 3, tương tác giữa hai yếu tố này có ảnh hưởng lớn đến quá trình tạo thành CHĐBMSH thể hiện với giá trị *p* = 0,0012. Khi so sánh với ảnh hưởng tương tác của các cặp (dầu thô- (NH₄)₂SO₄ với giá trị *p* = 0,0211) và (dầu thô- pH với giá trị *p* = 0,0179) thì cặp tương tác (dầu thô-(NH₄)₂SO₄) ảnh hưởng lớn nhất đến sự tạo thành CHĐBMSH vì có giá trị *p* lớn hơn cả (*p* = 0,0012).



Hình 1. Bề mặt đáp ứng của hàm lượng CHĐBMSH dưới tác động của dầu thô, (NH₄)₂SO₄, và pH cũng như tương tác các yếu tố này dầu thô và (NH₄)₂SO₄, (b) dầu thô và pH, (c) (NH₄)₂SO₄ và pH.

Lựa chọn giá trị tối ưu cho quá trình tạo CHĐBMSH

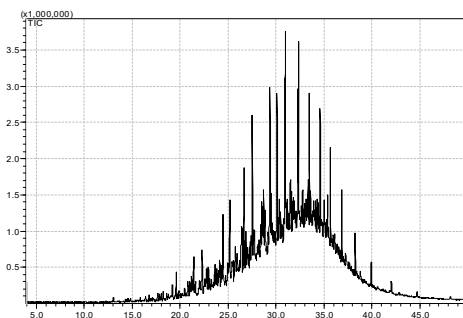
Như vậy, sau khi phân tích ảnh hưởng của từng yếu tố và tương tác của các cặp yếu tố lựa chọn đến khả năng tạo CHĐBMSH cho thấy hàm lượng CHĐBMSH cao nhất với chỉ số nhũ hóa E₂₄ dao động khoảng từ 78,11 đến 80,2% với các khoảng giá trị tìm được lần lượt là dầu thô 3,97 - 4,36%, (NH₄)₂SO₄ 0,36 - 0,43% và pH: 5,93 - 6,9.

Tuy nhiên, việc lựa chọn điều kiện nuôi cấy tối ưu để chủng *C. tropicalis* 1214-BK14 tạo ra hàm lượng CHĐBMSH cao nhất cần căn cứ vào 30 giải pháp phân mềm xác định được kết hợp với phương trình (3). Như vậy, các giá trị của 3 yếu tố tương ứng với 6 giá trị của hàm lượng CHĐBMSH theo tính toán của phần mềm tối ưu xếp theo thứ tự từ cao nhất được trình bày trên bảng 5.

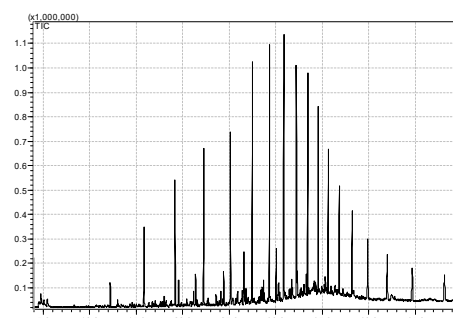
Bảng 5. Hàm lượng CHĐBMSH tạo ra ở các giá trị tối ưu.

STT	Dầu thô (% w/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (% w/v)	pH	CHĐBMSH (E ₂₄ %)
1	4,22	0,37	6,48	80,05
2	4,21	0,36	6,9	80,02
4	3,97	0,37	6,1	80,2
3	4,03	0,41	6,7	80,03
5	4,36	0,43	6,45	78,33
6	4,31	0,41	5,93	78,11

Ở các giải pháp trên, phần mềm DX7 xác định được hàm lượng CHĐBMSH tạo ra xấp xỉ nhau với chỉ số nhũ hóa E₂₄ từ 78,11 đến 80,2 với hàm lượng dầu thô từ 3,97 đến 4,36% (w/v), hàm lượng (NH₄)₂SO₄ từ 0,36 đến 0,43% (w/v), giá trị pH từ 5,93 đến 6,9. Tuy nhiên, để khẳng định giá trị của các yếu tố dầu thô, (NH₄)₂SO₄ và pH tối ưu mà ở đó chủng *C. tropicalis* 1214-BK14 tạo CHĐBMSH cao nhất, tiến hành lặp lại thí nghiệm ở các giá trị tìm được ở bảng 5. Kết quả thí nghiệm cho thấy, CHĐBMSH tạo ra cao nhất với chỉ số nhũ hóa E₂₄ là 80,2% với giá trị của các yếu tố dầu thô, (NH₄)₂SO₄, pH lần lượt là 3,97%, 0,37% và 6,1. Chỉ số nhũ hóa E₂₄ đạt được cao tương đương với một số chủng nấm men *Nocardiopsis* sp. B4 đã được nghiên cứu (Khopade *et al.*, 2012). Kết quả một lần nữa cho thấy mô hình mô phỏng được xây dựng hoàn toàn phù hợp với thực nghiệm, và các giá trị tối ưu được phân mềm tính toán đưa ra kết quả chính xác.



A



B

Hình 2. Khả năng phân hủy dầu thô của chủng *C. tropicalis* 1214-BK14 sau 14 ngày nuôi cấy phân tích bằng GC-MS (A); Mẫu đối chứng (chỉ chứa dầu thô) phân tích bằng GC-MS (B).

Khả năng phân hủy dầu thô của chủng *Candida tropicalis* 1214-BK14 trong điều kiện tối ưu

Để đánh giá khả năng phân hủy dầu thô, chủng *C. tropicalis* 1214-BK14 được nuôi trên môi trường tối ưu với pH 6,1, hàm lượng dầu thô và (NH₄)₂SO₄ được bổ sung lần lượt là 3,97 và 0,37% (w/v).

Kết quả phân tích hàm lượng và thành phần dầu thô sau 14 ngày nuôi cấy chỉ ra rằng hiệu quả phân hủy dầu thô tổng số của chủng *C. tropicalis* 1214-BK14 đạt 89,8%. Bên cạnh đó, hiệu quả phân hủy n-alkan từ C₁₀ đến C₄₃ đạt từ 80,47 đến 98,58%. Kết quả phân hủy dầu thô của chủng *C. tropicalis* 1214-BK14 cao có thể là do lựa chọn được điều kiện tối

ưu thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy phù hợp. Zhang *et al.*, (2011) cũng đã chứng minh được vai trò của CHĐBMSH ramnolipids trong quá trình phân hủy hydrocarbon tổng số có mặt trong đất ô nhiễm với hiệu đạt 86,97% (Zhang *et al.*, 2011). Khả năng phân hủy dầu thô của chủng nấm men *Pseudozyma putida* bằng CHĐBMSH do chúng tạo ra cũng đã được minh chứng bởi Sajna *et al.*, (2015). Tuy nhiên, mạch hydrocarbon mà chủng này phân hủy được là C₁₀ đến C₂₃ ngắn hơn so với mạch carbon mà chủng *C. tropicalis* 1214-BK14 phân hủy được trong nghiên cứu này (Sajna *et al.*, 2015).

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm sử dụng bề mặt đáp ứng trong mô hình tối ưu bậc 2, dưới sự hỗ trợ của phần mềm tin sinh DX7, kết hợp các thí nghiệm thực nghiệm với các yếu tố được lựa chọn là dầu thô 2,5-5% (w/v); (NH₄)₂SO₄ 0,35-0,45% (w/v) và pH 5-8, đã phân tích được sự phù hợp giữa mô hình tối ưu với thực nghiệm với hệ số tương quan R² đạt 0,99. Từ sự phù hợp của mô hình với thực nghiệm, đã xác định được các giá trị tối ưu là dầu thô, (NH₄)₂SO₄, pH lần lượt là 3,97% (w/v), 0,37% (w/v) và 6,1. Trong điều kiện tối ưu này, hàm lượng CHĐBMSH tạo ra với chỉ số nhũ hóa E₂₄ đạt 80,2%, đồng thời hàm lượng dầu thô tổng số và n-alkan từ C₁₀ đến C₄₃ được phân hủy lần lượt là 89,8% và 80,47 - 98,58%. Kết quả một lần nữa khẳng định phương pháp quy hoạch thực nghiệm là công cụ hữu hiệu trong việc xác định các giá trị tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp CHĐBMSH cho chủng nấm men nghiên cứu.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí của phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abbasi H, Sharafi H, Alidost L, Bodagh A, Zahiri HS, Noghabi KA (2013). Response surface optimization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples. *Prep Biochem Biotechnol* 43: 398-414.

Cassia FSS, Almeida GD, Rufino DR., Luna MJ, Santos AV, Sarubbo AAL (2014). Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *Int J Mol Sci* 15: 12523-12542.

Cooper DG., Goldenberg BG (1987). Surface-active agents from two bacillus species. *Appl Environ Microbiol.* 53(2): 224-9.

Fontes CG, Amaral FFP and Coelhol ZAM (2010). Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *J Biomed Biotechnol*. DOI: 10.1155/2010/821360.

Gundogdu KT, Deniz I, Gulizar C, Sahin S E and Azbar N (2014). Experimental design methods for bioengineering applications. *Crit Rev Biotechnol*, Early Online: 1–21.

Khayati G, Gilani HG, Kazemi M (2013). The effect of olive cake types on lipase production by isolated *Rhizopus* sp. and process statistical optimization. *J Biosci Biotechnol* 2: 45 - 55.

Kiều Thị Quỳnh Hoa, Nguyễn Thị Yên, Đặng Thị Yên (2016). Khả năng tạo chất hoạt hóa bề mặt và phân hủy dầu thô của chủng nấm men 1214-BK14 phân lập từ giếng khai thác dầu ở mỏ Bạch Hổ, Vũng Tàu. *Tạp chí Sinh học.* 38 (2): 179-185.

Kumar SS, Sharmila G, Muthukumaran C, Tamilarasan K, Gopinath M (2015). Statistical optimization of critical medium component for biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. *BioSci. Biotechnol.* 4(2):123-129.

Liu FJ, Mbadinga MS, Yang ZS, Gu DJ, Zhong B (2015). Chemical structure property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. *Int J Mol Sci* 16: 4814-4837.

Mahdy MH., Mohamed AF., Mohamed NH (2012). Production of biosurfactant from certain *Candida* strains under special conditions. *Researcher* 4(7): 39-55.

Mulligan CN (2005). Environmental application for biosurfactants. *Environ Poll* 133: 183-198.

Ron EZ, Rosenberg E (2001). A review of natural roles of biosurfactant. *Environ Microbiol* 3: 229-236.

Rufino DR., Luna MJ, Galba M, Asfora S (2014). Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Elec J of Biotech* 17: 34–38.

Saharan SB., Sahu KB, Sharma D (2011) A review on biosurfactant: Fermentation, current developments and perspectives. *Gen Eng and Biotech J Vol.* 2011: GEBJ-291.

Sajna KV, Sukumaran RK, Gottumukkala LD, Pandey A (2015). Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresour Technol* 191: 133-9.

Santos KF, Brandao BY, Rufino DR, Luna MJ, Salgueiro AA, Santos V, Sarubbo AL (2014). Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. *Biocatal Agric Biotechnol* 3: 48–57.

- Solaiman DKY., Ashby RD, Nuñez A. and Foglia TA (2004). Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. *Biotechnol Lett* 26: 1241-5.
- Tamilarasan K, Dharmendira KM (2011). Optimization of medium components and operating conditions for the production of solvent-tolerant lipase by *Bacillus sphaericus* MTCC 7542. *Afr J Biotechnol* 10: 15051-15057.
- Turbakar R, Malik N, Thakare D (2015). Optimization studies for enhancing rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* RT using response surface methodology. *Inter J of Research Studies in biosci* 3(5): 65-73.
- Zhang WL, Huang C, Song W, Huang Y (2011). An experiment study on the bio-surfactant-assisted remediation of crude oil and salt contaminated soils. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng* 46: 306-313.

OPTIMIZATION OF BIOSURFACTANT PRODUCTION FOR ENHANCED CRUDE-OIL DEGRADATION BY A *CANDIDA TROPICALIS* 1214-BK14 ISOLATED FROM WHITE TIGER OILFIELD - VUNG TAU, VIETNAM

Kieu Thi Quynh Hoa, Nguyen Thi Yen, Dang Thi Yen

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Biosurfactants are amphiphilic molecules with effective surface-active and biological properties applicable to replace synthetic surfactant in petroleum industry. Interest in microbial surfactants has been steadily increasing in recent years, as they have numerous advantages compared to chemical surfactants including a lower toxicity, better environmental compatibility and effective properties at extreme temperature, pH levels and salinity. A crude oil-degrading yeast strain (*C. 1214-BK14*) was selected among the isolated strains as a potential biosurfactant-producer from producing oil wells at White Tiger oilfield because of its ability to produce biosurfactant using crude oil as a sole carbon source. An emulsification index (E_{24%}) of 57% was obtained initially by *Candida tropicalis* 1214-BK14 in previous study. Therefore, the optimization of biosurfactant production of this strain for enhanced crude oil degradation was carried out based on central composite design and analyzed using response surface methodology (RSM). The biosurfactant production process was investigated as function of three independent variables: crude oil (2.5-5 % w/v), (NH₄)₂SO₄ (0.35-0.45% w/v), and solution pH (5-8). RSM analysis showed that the optimum condition for the biosurfactant production by *C. tropicalis* 1214-BK14 were 6.1, 3.97% (w/v) and 0.37% (w/v) for pH, concentration of carbon (crude oil) and nitrogen substrate ((NH₄)₂SO₄), respectively, with the emulsification index measured in the conditions was 80.2%. The total crude oil and C₁₀-C₄₃ alkanes degradation efficiency by this strain estimated using GC/MS were 89.8% and 80.47-98.58%, respectively. These results revealed that the strain *Candida tropicalis* 1214-BK14 exhibited a tremendous potential for contaminated-crude oil degradation and microbial enhanced oil recovery (MEOR).

Keywords: Biosurfactant, yeast, crude-oil, response surface methodology