Tạp chí Công nghệ Sinh học 7(4): 493-500, 2009

TỐI ƯU HÓA SINH TỔNG HỢP LIPASE TỪ *PICHIA ANOMALA* VTCC Y0787 SỬ DỤNG MA TRẬN PLACKETT-BURMAN VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT - PHƯƠNG ÁN CẤU TRÚC CÓ TÂM

Bùi Hồng Quân[1, 2], Nguyễn Đức Lượng[3]

[1]*Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh*
[2]*Trường Cao đẳng Kinh tế Kỹ thuật Bình Dương*
[3]*Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh*

TÓM TẮT

Nấm men *Pichia anomala* VTCC Y7087 đã được tối ưu hóa quá trình nuôi cấy nhằm thu được sản lượng lipase cực đại. *P. anomala* VTCC Y7087 có khả năng sinh tổng hợp lipase ở pH tối ưu 9,0; điều này hứa hẹn lipase có khả năng hoạt động ở pH kiềm (pH > 9) và có thể ứng dụng trong công nghiệp chất tẩy rửa. Chúng tôi đã sử dụng thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman để kiểm tra mức độ ảnh hưởng của các yếu tố lý hóa khác nhau lên sản lượng lipase. Trong đó, dịch chiết nấm men, tỷ lệ giống và dầu ăn là ba yếu tố có tác động mạnh nhất. Thiết kế thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)- phương án cấu trúc có tâm (CCD) đã được thực hiện và tìm ra giá trị tối ưu của ba yếu tố chiết nấm men (3,0%), tỷ lệ giống (2,37%; 10^8 tế bào/ml) và dầu ăn (4,19%) cho sản lượng lipase cực đại theo mô hình 18,8078 (U/ml). Mô hình đã được áp dụng vào thực tế với kết quả 100 ml nuôi cấy lắc là 18,95 (U/ml) và 3 l trong nồi lên men tự động là 22,52 (U/ml).

Từ khóa: *Lipase, nồi lên men, Pichia anomala* VTCC *Y0787, Plackett -Burman, RSM-CCD*

MỞ ĐẦU

Lipase (EC 3.1.1.3) là một nhóm enzyme thủy phân các triacylglycerol. Mối quan tâm cũng như việc sử dụng lipase trong các ngành công nghiệp đã gia tăng trong những năm gần đây. Việc ứng dụng lipase gia tăng đồng thời với những phát hiện ứng dụng lipase trong các lĩnh vực mới làm gia tăng nhu cầu lipase. Thị phần lipase trên thị trường thế giới ngày càng tăng. Trong đó, lipase từ các vi sinh vật có một ý nghĩa vô cùng quan trọng trong các ngành công nghiệp công nghệ sinh học hiện nay. Lipase vi sinh vật đang được ứng dụng trong các lĩnh vực như: thực phẩm, hóa học, dược phẩm, mỹ phẩm, thuộc da, công nghiệp tẩy rửa (Starace *et al.*, 1983), sản xuất biodiesel (de Vieira *et al.*, 2006), sản xuất các polymer phân hủy sinh học, y học ứng dụng, công nghiệp giấy và chế tạo các biosensor (Hasan *et al.*, 2006).

Trên thế giới, nghiên cứu về lipase vi sinh vật đã đạt được những thành tựu đáng kể. Nghiên cứu lipase vi sinh vật tập trung vào vi khuẩn (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.) (Hou, 1994; Jäeger *et al.*, 1994); nấm mốc (*Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp.); nấm men (*Candida* spp., *Geochitrum* spp., *Yarrowia* spp.) (Hou, 1994; Vakhlu, Kour, 2006).

Ở Việt Nam, nhóm nghiên cứu của Quyền Đình Thi đã nghiên cứu tương đối nhiều về lipase từ phân lập các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp lipase (Quyền Đình Thi *et al.*, 2003), tối ưu sinh tổng hợp lipase từ chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 (Nguyễn Sỹ Lê Thanh *et al.*, 2006) và từ *Ralstonia* M1 (Quyen *et al.*, 2007), đánh giá các tính chất lý hóa của lipase từ chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 (Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Quyền Đình Thi, 2007), *Ralstonia* M1 (Quyen *et al.*, 2007) cho tới nhân dòng lipase (Quyen *et al.*, 2004) và biểu hiện lipase tái tổ hợp từ chủng *Ralstonia* M1 với mức độ cao ở *E. coli* (Quyền Đình Thi *et al.*, 2004; Quyen *et al.*, 2005). Quyền Đình Thi và đồng tác giả (2007) cũng đã nhân dòng, biểu hiện và đánh giá một enzyme có hoạt tính thủy phân lipid là esterase EstM cũng từ chủng *Ralstonia* M1 (Quyen *et al.*, 2007). Tuy nhiên, tối ưu sinh tổng hợp lipase theo ma trận Plackett-Burman và phương pháp đáp ứng bề mặt - phương án cấu trúc có tâm chưa được áp dụng ở Việt Nam và việc tìm kiếm nguồn lipase mới có khả năng chịu kiềm, chịu acid, chịu nhiệt vẫn là một chủ đề thu hút sự chú ý của các nhà khoa học.

Tối ưu hóa quá trình lên men để xây dựng mô hình nhằm thu được sản lượng lớn và gia tăng quy mô sản xuất có một ý nghĩa quan trọng trong việc ứng dụng những nghiên cứu cơ bản lipase vào trong

công nghiệp. Bất cứ một quá trình lên men nào cũng bị ảnh hưởng bởi các yếu tố vật lý cũng như sinh hóa học khác nhau. Bước đầu tiên để tối ưu hóa là sàng lọc các yếu tố quan trọng. Một cách đơn giản và thuận tiện là tối ưu từng yếu tố trong khi giữ nguyên các yếu tố khác. Cách thực hiện này tốn thời gian và không xác định được sự tác động qua lại của các yếu tố. Một phương pháp thực hiện hiệu quả, chi phí thấp, cho phép nghiên cứu sự tương tác và đồng thời tiên đoán được giá trị tối ưu của các yếu tố- thiết kế thí nghiệm tối ưu đa yếu tố theo Plackett-Burman (Plackett, Burman, 1946; Dennis, 1995) đã được đưa ra và sử dụng rộng rãi để sàng lọc thành phần môi trường trong điều kiện nuôi cấy lắc (Li *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008). Sau bước sàng lọc ban đầu, thí nghiệm tối ưu theo phương pháp RSM-CCD được dùng để tối ưu hóa giá trị các yếu tố đang được nghiên cứu.

Nấm men *P. anomala* đã được nghiên cứu sâu về sinh tổng hợp ethyl acetate, độc tố giết, phytase, khả năng kháng nấm và điều khiển sinh học trong quá trình bảo quản ngũ cốc (Fredlund *et al.*, 2002). Lipase từ chủng *P. anomala* hoạt động ở pH 5,5 và 7,5 (Hou, 1994). Lipase *P. anomala* chưa được nghiên cứu nhiều như các lipase từ nấm men khác như *C. rugosa*. Ở Việt Nam, *P. anomala* đã được phân lập từ bánh men trong một số nghiên cứu gần đây (Dung *et al.*, 2007; Vu Nguyen Thanh *et al.*, 2008).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu hóa các yếu tố lý hóa trong quá trình nuôi cấy theo thiết kế Plackett-Burman và RSM-CCD để thu được sản lượng lipase cực đại từ dịch nuôi cấy nấm men *P. anomala* VTCC Y0787.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Môi trường nuôi cấy và giữ giống

Nấm men *P. anomala* VTCC Y0787 do Viện vi sinh vật và Công nghệ sinh học (IBMT-VNU) cung cấp, được giữ trên môi trường thạch nghiêng Sabouraund 2% glucose ở 13°C và trong glycerol ở –20/–80°C. Môi trường cơ bản gồm (g/l): 1 g K_2HPO_4; 0,5g $MgSO_4$ được dùng để kiểm tra ảnh hưởng của nguồn N và nguồn C.

Nhũ tương dầu - nước

Nhũ tương dầu - nước có thành phần: 2 g arabic, 80 ml nước cất hai lần, 20 ml dầu ăn, pH 9. Hỗn hợp được tạo nhũ bằng máy Sonicator® 3000 ở mức 75 ± 3 W trong thời gian 10 phút. Nhũ tương được chuẩn bị mới ngay trước khi thí nghiệm và dùng hết trong ngày.

Định lượng lipase

Hoạt tính lipase được định lượng theo phương pháp chuẩn độ liên tục với 10 ml nhũ tương dầu - nước bằng 0,1 N NaOH trên máy Metrohm 702 SM Titrino (Metrohm Ltd. Switzerland) với điện cực pH (Vario pH). Một đơn vị hoạt tính lipase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 µmol acid béo trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm (pH 9,0 và nhiệt độ phòng).

Thiết kế Plackett-Burman và phương pháp RSM-CCD

Để xác định được các yếu tố và các mức ảnh hưởng đến sinh tổng hợp lipase của nấm men *P. anomala* VTCC Y0787, 11 yếu tố được chọn là mật rỉ đường, glucose, $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, pH, nhiệt độ, chiết nấm men, tuổi giống, tỷ lệ giống, dầu ăn để làm thí nghiệm. Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman (Plackett, Burman 1946; Dennis, 1995) với 11 yếu tố trong 12 thí nghiệm (Bảng 2) để sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sản lượng lipase (U/ml). Mức thấp (-1) và cao (+1) của 11 yếu tố được liệt kê trong bảng 1.

Ba yếu tố chính RSM-CCD được xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu ở 5 mức (-α, -1, 0, +1, +α) (Bảng 3) trong CCD 20 thí nghiệm (Bảng 4) (Castillo, 2007).

Hàm đáp ứng được chọn là sản lượng lipase (Y, U/ml dịch nuôi cấy). Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2:

$$Y = b_o + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{23}x_2x_3 + b_{13}x_1x_3$$

Trong đó b_1, b_2, b_3 là các hệ số bậc 1; b_{11}, b_{22}, b_{33} là các hệ số bậc 2; b_{12}, b_{23}, b_{13} là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; x_1, x_2, x_3, x_{11}, x_{22}, x_{33}, x_{12}, x_{23}, x_{13} là các biến độc lập. Số liệu được phân tích bằng chương trình Design expert 7.0.0® của Stat-Ease Inc. USA. Từ kết quả phân tích xác định mức tối ưu của các yếu tố cho sản lượng lipase đạt cực đại.

Bảng 1. Các biến trong ma trận Plackett-Burman và ảnh hưởng của chúng.

Yếu tố		Mức		Mức độ ảnh hưởng	
Ký hiệu	**Tên yếu tố**	**Thấp (-1)**	**Cao (+1)**	**Ảnh hưởng**	**Prob > F**
X_1	Rỉ đường (%)	0,0	10,0	-1,92[a]	0,0184
X_2	Glucose (%)	0,0	2,5	0,75[b]	
X_3	$NaNO_3$ (%)	0,2	1,2	0,25[b]	
X_4	$(NH_4)_2SO_4$ (%)	0,0	0,9	0,25[b]	
X_5	$(NH_4)_2HPO_4$ (%)	0,1	0,8	-2,22[a]	0,0106
X_6	Chiết nấm men (%)	0,5	1,0	7,35[a]	< 0,0001
X_7	Nhiệt độ (°C)	25,0	37,0	0,75[b]	
X_8	pH	5,0	10,0	-1,82[a]	0,0224
X_9	Tuổi giống (h)	12,0	24,0	-0,55[b]	
X_{10}	Tỷ lệ giống (%)	1,0	3,0	3,58[a]	0,0014
X_{11}	Tỷ lệ dầu ăn (%)	2,0	5,0	3,28[a]	0,002

[a] Có ý nghĩa ở độ tin cậy α = 0,05; [b] Không có ý nghĩa ở độ tin cậy α = 0,05.

Bảng 2. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman.

Thí nghiệm	Các biến											Lipase (U/ml) (105 h)	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	**Thực nghiệm**	**Mô hình**
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	3,2	3,48
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	3,5	3,78
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	9,0	8,58
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	16,0	16,23
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	4,1	3,08
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	5,6	5,33
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	12,0	11,28
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	4,0	3,48
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	9,5	10,53
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	10,2	10,73
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	17,1	16,33
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3,2	3,93

Bảng 3. Nồng độ ba yếu tố dùng trong RSM-CCD.

Yếu tố	Tên	Phạm vi nghiên cứu	Mức				
			-α	-1	0	+1	+α
x_1	Chiết nấm men (%w/v)	0,32 - 3,68	0,32	1,0	2,0	3,0	3,68
x_2	Tỷ lệ giống (%v/v)	0,82 - 4,18	0,82	1,5	2,5	3,5	4,18
x_3	Dầu ăn (%v/v)	0,98 - 6,02	0,98	2,0	3,5	5,0	6,02

Bảng 4. Kế hoạch thực nghiệm theo RSM-CCD để tối ưu hóa sản lượng lipase.

Thí nghiệm	Môi trường cơ bản			Lipase (U/ml) - 105 h	
	x_1	x_2	x_3	Thực nghiệm	Suy từ mô hình
1	-1	-1	-1	9,23	9,53
2	+1	-1	-1	16,81	16,11
3	-1	+1	-1	13,45	13,50
4	+1	+1	-1	17,61	17,17
5	-1	-1	+1	13,52	13,72
6	+1	-1	+1	18,41	18,12
7	-1	+1	+1	15,12	15,58
8	+1	+1	+1	17,61	17,08
9	-α	0	0	12,51	11,79
10	+α	0	0	17,53	18,58
11	0	-α	0	13,45	13,63
12	0	+α	0	15,93	16,09
13	0	0	-α	13,61	13,96
14	0	0	+α	17,42	17,40
15	0	0	0	17,25	17,52
16	0	0	0	18,01	17,52
17	0	0	0	17,52	17,52
18	0	0	0	17,13	17,52
19	0	0	0	18,22	17,52
20	0	0	0	17,02	17,52

Đánh giá mô hình thực nghiệm

Lên men thử nghiệm mô hình tối ưu được thực hiện với quy mô 100 ml nuôi cấy lắc và 3 l trên nồi lên men Bioflo 110 Fermentor/Bioreactor 5 l (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey USA). Nồi lên men được điều khiển tự động ở pH 9,0; nhiệt độ 25°C; 300 rpm và tốc độ khí 1 vvm. Mẫu được lấy và kiểm tra ở thời điểm thích hợp.

KẾT QUẢ

P. anomala VTCC Y0787 có thể phát triển ở pH khá rộng từ 5 - 12. Điều này phù hợp với nghiên cứu trước đây về nấm men này (Fredlund *et al.*, 2003). Giá trị pH thích hợp nhất để sinh tổng hợp lipase là 9,0; điều này hứa hẹn lipase *P. anomala* VTCC Y0787 có khả năng hoạt động ở pH kiềm (pH > 9) và có thể ứng dụng trong công nghiệp tẩy rửa.

Nhiệt độ phát triển của nấm men từ 13 - 37°C. Ở nhiệt độ cao hơn 37°C nấm men phát triển chậm và yếu. Nhiệt độ dưới 13°C không được thực hiện. Nhiệt độ thích hợp cho sinh tổng hợp lipase khoảng 25°C.

Thời gian sinh tổng hợp lipase mạnh nhất sau 96 h và giảm xuống sau 168 h.

Khi có mặt cơ chất, *P. anomala* VTCC Y0787 nuôi trong môi trường glucose sinh tổng hợp lipase yếu. Môi trường chỉ có dầu ăn như là nguồn carbon duy nhất, *P. anomala* VTCC Y0787 sinh tổng hợp lipase mạnh. Để kiểm tra ảnh hưởng của các nguồn nitrogen khác nhau lên sản lượng lipase, các nguồn nitrogen được bổ sung ở mức 0,2% nitrogen vào môi trường cơ bản với 3,0% dầu ăn như là nguồn cơ chất cảm ứng và nguồn C duy nhất. Trong số các nguồn nitrogen, dịch chiết nấm men (YE), $(NH_4)_2HPO_4$, $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$ có ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp lipase của *P. anomala* VTCC Y0787.

Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng quan trọng đến sản lượng lipase *P. anomala* VTCC Y0787

Ma trận Plackett-Burman thu được sản lượng lipase từ 3,08 - 16,33 U/ml dịch nuôi cấy (Bảng 2). Giá trị ảnh hưởng của từng yếu tố lên sản lượng

lipase được tính toán bằng phần mềm Design expert® 7.0.0 (Bảng 1). Yếu tố nào có giá trị ảnh hưởng dương và lớn sẽ ảnh hưởng tới sản lượng lipase *P. anomala* VTCC Y0787. Dịch chiết nấm men, dầu ăn và tỷ lệ giống ảnh hưởng mạnh nhất đến sản lượng lipase với mức ý nghĩa α= 0,05. Do đó, dịch chiết nấm men, dầu ăn và tỷ lệ giống được chọn cho thiết kế thí nghiệm theo RSM-CCD.

Tối ưu hóa giá trị các yếu tố cho sản lượng lipase cực đại

Sau khi sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng chính đến sản lượng lipase, kế hoạch hóa thực nghiệm được thực hiện theo RSM-CCD, xử lý bằng Design expert® 7.0.0. Giá trị hàm đáp ứng theo thực nghiệm và tiên đoán theo mô hình được trình bày trong bảng 4. Sau khi phân tích ANOVA, phương trình hồi quy được dùng như là một mô hình để tiên đoán sản lượng lipase thu được. Sản lượng lipase có thể được tiên đoán từ mô hình sau:

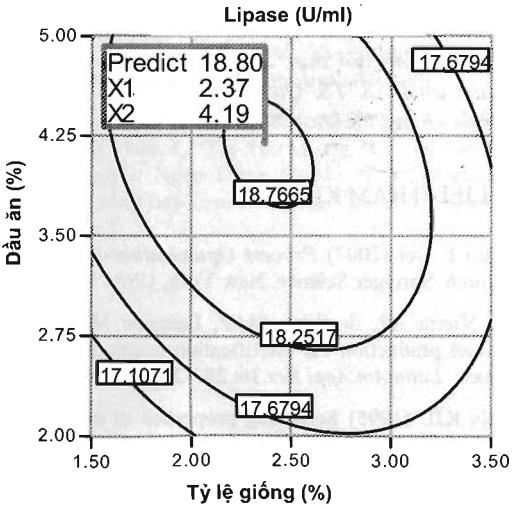
$$Y = 17,52 + 2,02x_1 + 0,73x_2 + 1,02x_3 - 0,73x_1x_2 - 0,54x_1x_3 - 0,53x_2x_3 - 0,82x_1^2 - 0,94x_2^2 - 0,65x_3^2$$

Trong đó, Y là sản lượng lipase (U/ml); x_1, x_2, x_3 lần lượt là tỷ lệ chiết nấm men, tỷ lệ giống và dầu ăn (%). Hệ số hồi quy (R^2) tính được là 0,9616. Điều này thể hiện rằng có 96,16% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán theo mô hình. Giá trị R^2 lớn hơn 0,75 thể hiện mô hình tương thích với thực nghiệm. Giá trị R^2 tiên đoán là 0,7714 phù hợp với R^2 điều chỉnh là 0,9270 (độ lệch 0,1556 < 0,2). Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 19,301 > 4 chỉ ra rằng tín hiệu đã đầy đủ.

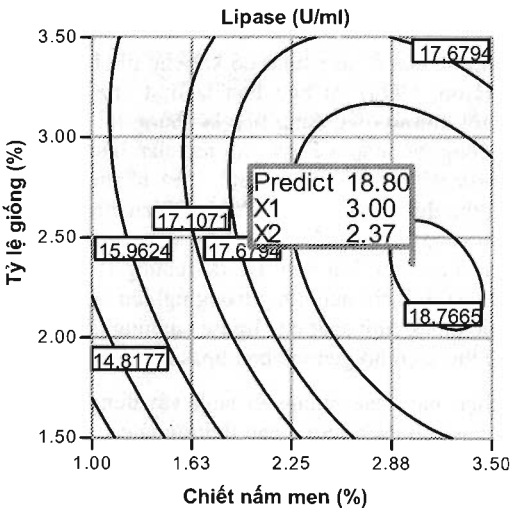
Biểu đồ đáp ứng bề mặt (Hình 1) thể hiện sự tương tác của từng cặp yếu tố và từ biểu đồ này có thể xác định được giá trị tối ưu của từng yếu tố làm cho hàm đáp ứng cực đại. Mô hình đã dự đoán sản lượng lipase tối đa đạt được (18,8078 U/ml) ở giá trị các yếu tố: chiết nấm men (3,0%), tỷ lệ giống (2,37%; 10^8 tế bào/ml), tỷ lệ dầu ăn (4,19%). Tỷ lệ chiết nấm men càng tăng thì sản lượng lipase càng tăng, nhưng ngược lại tỷ lệ dầu ăn và tỷ lệ giống chỉ tăng đến một mức độ nào đấy thì bắt đầu giảm.

Thử nghiệm mô hình ở 100 ml và 3 l

Chúng tôi đã thử nghiệm mô hình ở 100 ml nuôi cấy lắc 200 rpm và 3 l trên nồi lên men tự động 5 l. Thí nghiệm lặp lại 3 lần 100 ml; 1 lần 3 l và được trình bày trong bảng 5. Kết quả cho thấy, ở chế độ nuôi cấy lắc đã đạt được sản lượng lipase (18,95 ± 1,5 U/ml) tương ứng với mô hình dự đoán (18,8078 U/ml). Ở chế độ nuôi trên nồi lên men nhiệt độ ở 25°C ± 3; pH 9,0 ± 0,2; lưu lượng khí 1 vvm; tốc độ cánh khuấy tuabin 300 rpm, sản lượng đạt được 22,52 U/ml.



Hình 1. Mặt đáp ứng sản lượng lipase theo tỷ lệ giống và dầu ăn.



Hình 2. Mặt đáp ứng sản lượng lipase theo tỷ lệ giống và chiết nấm men.

Bảng 5. Sinh tổng hợp lipase từ *P. anomala* VTCC Y0787 ghi nhận được từ 100 ml, 3 l môi trường tối ưu.

Thể tích môi trường	Chế độ nuôi cấy	Lipase (U/ml)
100 ml	Lắc 200 rpm	18,95 ± 1,5 (105 h)
3 l	Nồi lên men tự động	22,52 (96 h)

THẢO LUẬN

Công cụ thiết kế thí nghiệm tối ưu đa yếu tố của Plackett-Burman và phương pháp đáp ứng bề mặt - phương án cấu trúc có tâm (RSM-CCD) theo chúng tôi đánh giá là những công cụ mạnh trong việc sàng lọc và tối ưu hóa giá trị các yếu tố làm cho hàm đáp ứng cực đại. Việc sử dụng các công cụ này cùng với phần mềm chuyên dụng Design expert® giảm được thời gian tiêu tốn, giảm các thí nghiệm đồng thời có thể lựa chọn một trong những giải pháp tối ưu do phần mềm đề nghị.

Mặc dù chiết nấm men có thể cho sản lượng lipase cực đại nhưng chi phí của chiết nấm men khá cao so với các nguồn nitrogen khác. Điều này cũng là một cản trở khi tiến hành gia tăng quy mô sản xuất. Do điều kiện có hạn, chúng tôi chỉ chọn nguồn cơ chất là dầu lạc (đậu phộng). Theo như những nghiên cứu trước đây, lipase có tính đặc hiệu cơ chất rất cao, do đó cần phải tiến hành nghiên cứu trên các loại dầu khác nhau.

Lipase của *P. anomala* có khoảng pH hoạt động rộng (Hou, 1994) và hứa hẹn là một enzyme chịu kiềm tốt nhưng điều đáng tiếc là chúng tôi chưa tìm thấy công bố nào về sản lượng của lipase từ *P. anomala* để tiến hành so sánh. Tuy nhiên, với sản lượng thu được thấp như kết quả nghiên cứu đã trình bày thì sẽ rất khó khăn để áp dụng vào sản xuất công nghiệp ở quy mô lớn hơn. Do đó, chủng *P. anomala* VTCC Y0787 chỉ nên dùng trong nghiên cứu cơ bản các đặc điểm, tính chất của lipase và dùng làm nguồn để tạo thư viện bộ gen mã hóa lipase.

Hiện nay, các chủng vi sinh vật dùng để tổng hợp lipase cho sản lượng cao thường là các chủng tái tổ hợp (Pignède *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2008). Sản lượng lipase từ các chủng hoang dại thường không cao. Chúng tôi cũng đã gây đột biến chủng hoang dại bằng các tác nhân vật lý và/hoặc hóa học (kết quả không công bố) nhưng do số lượng sàng lọc lớn, không có dấu chuẩn khả dĩ có cơ sở khoa học vững chắc (chỉ dựa vào vòng phân giải trên môi trường cơ chất dầu) dẫn đến kết quả không rõ ràng. Do đó, với sự phát triển của công nghệ gen như hiện nay, cần thiết phải phân lập các gen mã hóa cho lipase có đặc điểm quý (chịu kiềm, chịu acid, chịu nhiệt, chịu dung môi hữu cơ) từ nhiều nguồn khác nhau (prokaryote và eukaryote) và tạo dòng bằng các hệ thống biểu hiện (vector và tế bào chủ) thích hợp để tăng sản lượng.

KẾT LUẬN

Đã xác định *P. anomala* VTCC Y0787 phát triển ở pH từ 5 - 12, nhiệt độ từ 13 - 37°C.

Đã xác định *P. anomala* VTCC Y0787 sinh tổng hợp lipase tối ưu ở pH 9,0; nhiệt độ 25°C; 96 h.

Từ 11 yếu tố ban đầu đã sàng lọc và chọn được 3 yếu tố là dịch chiết nấm men (3%), tỷ lệ giống (2,37%; 10^8 tế bào/ml) và dầu ăn (4,19%) cho sản lượng lipase từ chủng *P. anomala* VTCC Y0787 cực đại theo mô hình là 18,8078 (U/ml).

Đã lên men thử nghiệm mô hình tối ưu với quy mô 100 ml nuôi cấy lắc và 3 l trên nồi lên men Bioflo 110 Fermentor/Bioreactor 5 l (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey USA) thu được sản lượng lipase *P. anomala* VTCC Y0787 lần lượt là 18,95 (U/ml) và 22,52 (U/ml).

Lời cảm ơn: *Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban Chủ nhiệm Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện đề tài này. Chúng tôi xin cảm ơn PGS. TS. Quyền Đình Thi đã có những góp ý để chúng tôi hoàn thiện đề tài này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Castillo E Del (2007) *Process Optimization A Statistical Approach.* Springer Science. New York, USA: 118-122.

de A Vieira AP, da Silva MAP, Langone MAP (2006) Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. *Latin Am Appl Res* 36: 283-288.

Dennis KJL (1995) Screening properties of certain two-level designs. *Metrika* 42: 99-118.

Dung NTP, Rombouts FM, Nout MJR (2007). Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (men). *LWT* 40: 130-135.

Fredlund E, Druvefors U, Boysen ME, Lingsten KJ, Schnurer J (2002) Physiological characteristics of the

biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Res* 2: 395-402.

Hasan F, Shah AA, Hameed A (2006) Industrial application of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 39: 235-251.

Hou TC (1994) pH dependence and thermostability of lipases from cultures from the ARS Culture Collection. *J Ind Microbiol* 13: 242-248.

Jäeger EK, Ransac S, Dijkstra B, Colson C, Heuvel M, Misset O (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 15: 29-63.

Li Y, Liu Z, Cui F, Liu Z, Zhao H (2007) Application of Plackett-Burman experimental design and Doehlert design to evaluate nutritional requirements for xylanase production by *Alternaria mali* ND-16. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 285-291.

Liu C, Sun ZT, Du JH, Wang J (2008) Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger* SL-05. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 703-711.

Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Quyền Đình Thi, Trương Thị Bích Huệ (2006) Tối ưu một số điều kiện nuôi cấy chủng nấm *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 sinh tổng hợp lipase. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4: 455-462.

Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Quyền Đình Thi (2007) Một số tính chất hóa lý của lipase ngoại bào chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5: 31-40.

Pignède G, Wang HJ, Fudale F, Seman M, Gaillardin C, Nicaud JM (2000). Autocloning and amplification of *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 66(8): 3283-3289.

Plackett RL, Burman JP (1946) The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 37: 305-325.

Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Bầy, Mai Thị Thanh, Nguyễn Thị Thảo, Lê Thị Thu Giang, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Ngọc Dũng (2003) Phân lập chủng vi khuẩn sinh tổng hợp lipase từ nước thải và khảo sát hoạt tính lipase của 102 chủng *Pseudomonas*. *Tạp chí Di truyền & ứng dụng* 4: 37-41.

Quyền Đình Thi, Lê Thị Thu Giang, Nguyễn Thị Thảo (2004) Biểu hiện cao lipase kiềm và chịu nhiệt của chủng *Ralstonia* sp. M1 ở *E. coli*. *Tạp chí Di truyền & ứng dụng* 4: 38-42.

Quyen DT, Nguyen TT, Le TTG, Kim HK, Oh TK, Lee JK (2004) A novel lipase/chaperone pair from *Ralstonia* sp. M1: Analysis of the folding interaction and evidence for gene loss in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Gen Genomics* 272: 538-554.

Quyen DT, Le TTG, Nguyen TT, Oh TK, Lee JK (2005) High-level heterologous expression and properties of a novel lipase from *Ralstonia* sp. M1. *Prot Expr Purif* 39: 97-106.

Quyen DT, Nguyen SLT, Dao TT (2007) A novel esterase from *Ralstonia* sp. M1: Gene cloning, sequencing, high-level expression and characterization. *Prot Expr Purif* 51: 133-140.

Quyen DT, Le TTG, Nguyen TT, Oh TK, Lee JK (2007) Production and properties of an extracellular alkaline, thermostable, highly organic-solvent-resistant and detergent-inducible lipase from *Ralstonia* sp. M1. *ASEAN J Sci Technol Dev* 24: 237-251.

Starace CA (1983) Detergent enzymes-past, present and future. *J Am Oil Chem Soc* 60(5): 1203-1207.

Vu Nguyen Thanh, Le Thuy Mai, Duong Anh Tuan (2008) Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE. *Int J Food Microbiol* 128(2): 268-273.

Vakhlu J, Kour A (2006) Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic J Biotechnol* 9(1): 69-85.

Zhao W, Wang J, Deng R, Wang Y (2008) Scale up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using GAP promoter. *J Ind Microbiol Technol* 35: 189-195.

LIPASE PRODUCTION BY *PICHIA ANOMALA* VTCC Y0787 USING DESIGN OF PLACKETT-BURMAN MATRIX AND CENTRAL COMPOSITE DESIGNS-RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Bui Hong Quan[1, 2], Nguyen Duc Luong[3, *]

[1]*Institute of Biotechnology and Food Technology, Ho Chi Minh University of Industry*
[2]*Binh Duong Economic and Technology College*
[3]*University of Technology, Vietnam National University, Ho Chi Minh City*

SUMMARY

The yeast *Pichia anomala* VTCC Y0787 was optimized for maximum lipase production. The pH optimum for this secretion was 9.0; this lipase was active in an alkaline pH range (pH > 9) and had a potential application in detergent industry. We used the design of optimum multifactorial experiments Plackett-Burman to estimate level effect of physical and chemical factors on lipase production. As the result, yeast (%), inoculum's size (%) and vegetable oil (%) were identified as significant factors. After screening, these factors were subsequently optimized using the response surface methodology (RSM) - Central Composite Designs (CCD). These optimal levels were found out yeast extract (3.0%), inoculum's size (2.37%; 10^8 cells/ml) and vegetable oil (4.19%) in which the lipase yield was the highest. The regression equations (model) obtained and predicted maximum lipase yield 18.8078 (U/ml). We also verified model in shaking flasks (100 ml) as well as automatic fermentor (3 litres). Lipase production for 100 ml and 3 litres recorded from supernatant was 18.95 (U/ml) and 22.52 (U/ml), respectively.

Keywords: *fermentor, lipase, Plackett-Burman, Pichia anomala VTCC Y0787, Response Surface Methodology (RSM)-Central composite designs (CCD)*

* *Author for correspondence*: Tel: *84-8-38607273*; E-mail: *buihongquan@hui.edu.vn*