

Tối ưu hóa sinh tổng hợp lactase từ *Aspergillus oryzae* sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt- phương án cấu trúc có tâm

Nguyễn Thúy Hương*, Mai Thục Di

Bộ môn Công nghệ Sinh học, trường Đại học Bách Khoa Tp.HCM
268 Lý Thường Kiệt, Phường 14, Quận 10, Thành phố Hồ Chí Minh

Nhận ngày 11 tháng 12 năm 2012

Chỉnh sửa ngày 25 tháng 12 năm 2012; chấp nhận đăng ngày 15 tháng 4 năm 2013

Tóm tắt. Từ 6 chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* chúng tôi đã chọn được chủng *Aspergillus oryzae* BK0 sinh lactase cao nhất. Lên men bán rắn (SSF) với cơ chất là cám gạo và trấu được sử dụng để thực hiện quá trình lên men. *Aspergillus oryzae* BK0 đã được tối ưu hóa quá trình nuôi cấy để thu được sản lượng lactase cực đại. Chúng tôi thiết kế thí nghiệm theo phương pháp bề mặt (RSM) – phương án cấu trúc có tâm (CCD) đã thực hiện và tìm ra giá trị tối ưu của 5 yếu tố lactose (13.3%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.7%), pH (5.94), độ ẩm (61.04%), tỉ lệ giống (1.05%) cho sản lượng lactase cực đại theo mô hình 4.120 U/g. Chúng tôi thử nghiệm nuôi cấy với điều kiện của mô hình và kết quả thu được sản lượng lactase là 3.947 U/g.

Từ khóa: lactase, *Aspergillus oryzae*, RSM – CCD, solid state fermentation.

1. Mở đầu

Lactase (EC 3.2.1.23) hay còn gọi là lactase - phlorizin hydrolase hoặc lactose galactohydrolase, là một loại enzyme thuộc họ β - galactosidase. Lactase là enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân lactose thành β - D - galactose và α - D - glucose và phản ứng galactosyl chuyển hóa các gốc β - D - galactosyl của lactose tạo ra galactose-oligosaccharide (GOS). Vì vậy, việc ứng dụng lactase là một trong những ứng dụng hứa hẹn nhất trong các enzyme ngành công nghiệp thực phẩm [1-3]. Trên thế giới đã sản xuất lactase và ứng dụng rất rộng rãi trong thực phẩm [4]. Tuy

nhiên ở Việt Nam, lactase vẫn chưa được sản xuất với qui mô công nghiệp, chỉ bước đầu nghiên cứu ở qui mô phòng thí nghiệm.

Lactase có thể được tạo ra từ nhiều chủng nấm mốc như *A. oryzae*, *A. niger*, *Aspergillus fonsecaeus*, *Aspergillus alliaceus*. Lactase còn có thể tổng hợp từ các loại nấm men như *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida pseudotropicalis*. Tuy nhiên lactase từ nấm mốc rất ổn định và không cần ion kim loại (cofactor) cho hoạt động của mình [5], đồng thời nấm mốc sản xuất enzyme ngoại bào nên dễ dàng cho việc thu nhận enzyme. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng nấm mốc *Aspergillus oryzae*. Để giảm chi phí sản xuất enzyme thì việc lựa chọn cơ chất rẻ tiền và sẵn có cùng với vi sinh vật sản xuất phù hợp,

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-966008067.
E-mail: nthuong13567@yahoo.com

tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy là rất cần thiết. 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 lactase vào trong công nghiệp. Các nghiên cứu tối ưu hóa được thực hiện bằng phương pháp tối ưu đơn yếu tố không phản ánh được sự tương tác lẫn nhau giữa các yếu tố và phương pháp tối ưu này không hiển thị ảnh hưởng thực của các yếu tố lên hoạt tính enzyme. Để khắc phục vấn đề này, chúng tôi sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt RSM để tối ưu hóa giá trị các yếu tố đang được nghiên cứu. Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) là một phương pháp sử dụng toán học và thống kê được áp dụng rộng rãi để xác định ảnh hưởng của các yếu tố và để tối ưu hóa quá trình lên men sinh học [6, 7]. RSM đã được áp dụng rộng rãi để tối ưu thông số quá trình nuôi cấy để sản xuất lipase [8], tannase [9], α -amylase [10], β -cyclodextrin glucanotransferase [11], lactase [6, 12].

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Chủng vi sinh vật. 6 chủng nấm mốc thuộc loài *Aspergillus oryzae* của bộ môn Công nghệ Sinh học – Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh. Giống được nuôi trên môi trường PGA ở 30⁰C trong 6 ngày và giữ giống ở 4⁰C.

Môi trường nuôi cấy. Môi trường giữ giống PGA. Môi trường lên men: môi trường bán rắn với tỉ lệ cám/trấu là 1/3, lactose, amonium sulphate.

Hóa chất

ONPG(o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) của Duchefa, Hà Lan.

2.2. Phương pháp

Phương pháp vi sinh. Khảo sát các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến quá trình lên men bằng phương pháp tối ưu đơn yếu tố, các kết quả của thí nghiệm trước là tiền đề cho thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp hóa sinh

Phương pháp thu enzyme thô. Dùng nước cất pha trộn với môi trường nuôi cấy với tỉ lệ 1:4 về thể tích ở nhiệt độ phòng. Lắc đều (180rpm) trong 1h. Đem hỗn hợp thu được lọc qua 2 lớp vải, ly tâm dịch sau lọc ở 5000 vòng/phút trong 20 phút, phần dịch thu được là enzyme thô [3].

Phương pháp xác định hoạt tính lactase. Hoạt tính lactase được xác định dựa trên phản ứng với cơ chất ONPG, khi cơ chất này bị lactase thủy phân sẽ tạo ra galactose và o-nitrophenol (màu vàng). Thành phần oNP hấp thụ bước sóng 420nm. Hoạt độ lactase được xác định là lượng enzyme thủy phân 1micromol ONPG thành galactose và o-nitrophenol trong 1 phút ở 30⁰C trong một đơn vị thể tích (hoặc 1 đơn vị khối lượng cơ chất) [13-15].

2.3. Bố trí thí nghiệm

2.3.1. Khảo sát khả năng sinh lactase của 6 chủng *Aspergillus oryzae*

A. oryzae BK0, BK1, BK2, BK3, BK4, BK5 được nuôi trên môi trường cơ bản, tỉ lệ cám/trấu là 3/1, hàm lượng lactose 12.5%, hàm lượng amonium sulphate 1.5%, pH 5.5, độ ẩm 65%, tỉ lệ giống 1%. Sau 5 ngày thu và xác định hoạt tính enzyme lactase.

2.3.2. Thiết kế thí nghiệm tìm yếu tố ở tâm và phương pháp RSM-CCD

Để thiết kế thí nghiệm tối ưu bằng mô hình CCD, trước tiên ta tìm thí nghiệm ở tâm của 5

yếu tố cần khảo sát là hàm lượng lactose, hàm lượng amonium sulphate, pH, độ ẩm, tỉ lệ giống theo bảng 2. Điểm ở tâm được chọn là điểm mà ở đó cho hoạt tính enzyme cao nhất khi ta khảo sát từng yếu tố riêng lẻ.

Sau khi có các điểm ở tâm, ta thiết kế thí nghiệm theo mô hình CCD, chọn nhân phương án là yếu tố từng phần 2^{5-1} và được nghiên cứu ở 5 mức (- α , -1, 0, +1, + α) (Bảng 3), có 32 thí nghiệm được tiến hành (Với $\alpha = \sqrt{(5-1)} = 2$) [7].

Hàm đáp ứng được chọn là hoạt tính enzyme lactase (Y, U/g). Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{15}x_1x_5 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{25}x_2x_5 + b_{34}x_3x_4 + b_{35}x_3x_5 + b_{45}x_4x_5 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_3x_3^2 + b_4x_4^2 + b_5x_5^2$$

Trong đó, Y là sản lượng lactase (U/g); x_1, x_2, x_3, x_4, x_5 lần lượt là hàm lượng lactose, hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH, độ ẩm và tỉ lệ giống; b_1, b_2, b_3, b_4, b_5 là các hệ số bậc 1; $b_{12}, b_{13}, b_{14}, b_{15}, b_{23}, b_{24}, b_{25}, b_{34}, b_{35}, b_{45}$ là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; $x_1, x_2, x_3, x_4, x_5, x_1x_2, x_1x_3, x_1x_4, x_1x_5, x_2x_3, x_2x_4, x_2x_5, x_3x_4, x_3x_5, x_4x_5$ là các biến độc lập. Tính toán, lập phương trình hồi quy, chọn điểm tối ưu của các yếu tố cho sản lượng lactase đạt cực đại bằng chương trình

Design-Expert 8.0.7, từ đó áp dụng vào thực nghiệm [7].

2.3.3. Đánh giá mô hình thực nghiệm

Lên men thử nghiệm mô hình tối ưu và so sánh với kết quả dự đoán của mô hình.

3. Kết quả

3.1. Kết quả tuyển chọn chủng nấm mốc tổng hợp lactase mạnh

Từ 6 chủng *Aspergillus oryzae* của phòng thí nghiệm bộ môn Công nghệ Sinh học Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh, ta thu được chủng *Aspergillus oryzae* BK0 có khả năng sinh lactase mạnh nhất (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả khảo sát khả năng sinh lactase của 6 chủng *Aspergillus oryzae*

Chủng <i>Aspergillus oryzae</i>	Hoạt tính enzyme lactase (U/g)
BK0	3.736
BK1	3.293
BK2	1.325
BK3	0.557
BK4	2.279
BK5	3.276

Bảng 2. Mức khảo sát của hàm lượng lactose, nitơ, pH, độ ẩm và tỉ lệ giống để tìm thí nghiệm tại tâm

Các mức	Hàm lượng lactose (% w/w)	Hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%w/w)	pH	Độ ẩm	Tỉ lệ giống (%w/w)
Mức 1	7.5	0.5	4.5	55	0.5
Mức 2	10	1.0	5.0	60	0.75
Mức 3	12.5	1.5	5.5	65	1.0
Mức 4	15	2.0	6.0	70	1.25
Mức 5	17.5	2.5	6.5	75	1.5
Mức 6	20	3.0	7.0	80	2

Bảng 3. Nồng độ 5 yếu tố dùng trong RSM – CCD

Biến	Nhân tố	Hệ số mã hóa và tự nhiên tương ứng				
		$-\alpha$	-1	0	1	α
x_1	Hàm lượng lactose (% w/w)	10	12.5	15	17.5	20
x_2	Hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% w/w)	0,5	1	1,5	2	2,5
x_3	pH	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
x_4	Độ ẩm (%)	55	60	65	70	75
x_5	Tỉ lệ giống (%)	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5

Bảng 4. Kế hoạch thực hiện RSM – CCD để tối ưu hóa sản lượng lactase

Thí nghiệm	Môi trường cơ bản					Hoạt tính lactase (U/g) – 5 ngày	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	Thực nghiệm	Suy từ mô hình
1	12.50	1.00	5.00	60.00	1.25	0.662	0.715
2	17.50	1.00	5.00	60.00	0.75	0.127	0.120
3	12.50	2.00	5.00	60.00	0.75	0.129	0.1100
4	17.50	2.00	5.00	60.00	1.25	0.951	0.915
5	12.50	1.00	6.00	60.00	0.75	3.927	3.880
6	17.50	1.00	6.00	60.00	1.25	0.803	0.780
7	12.50	2.00	6.00	60.00	1.25	3.879	3.798
8	17.50	2.00	6.00	60.00	0.75	0.694	0.625
9	12.50	1.00	5.00	70.00	0.75	0.856	0.803
10	17.50	1.00	5.00	70.00	1.25	0.934	0.925
11	12.50	2.00	5.00	70.00	1.25	0.261	0.277
12	17.50	2.00	5.00	70.00	0.75	0.24	0.204
13	12.50	1.00	6.00	70.00	1.25	1.936	1.899
14	17.50	1.00	6.00	70.00	0.75	3.825	3.789
15	12.50	2.00	6.00	70.00	0.75	1.134	1.099
16	17.50	2.00	6.00	70.00	1.25	0.515	0.431
17	10.00	1.50	5.50	65.00	1.00	1.489	1.513
18	20.00	1.50	5.50	65.00	1.00	0.635	0.707
19	15.00	0.50	5.50	65.00	1.00	2.607	2.666
20	15.00	2.50	5.50	65.00	1.00	0.44	0.514
21	15.00	1.50	4.50	65.00	1.00	0.396	0.480
22	15.00	1.50	6.50	65.00	1.00	2.76	2.810
23	15.00	1.50	5.50	55.00	1.00	2.098	2.160
24	15.00	1.50	5.50	75.00	1.00	1.04	1.112
25	15.00	1.50	5.50	65.00	0.50	0.511	0.532
26	15.00	1.50	5.50	65.00	1.50	0.953	0.987
27	15.00	1.50	5.50	65.00	1.00	3.796	3.721
28	15.00	1.50	5.50	65.00	1.00	3.779	3.721
29	15.00	1.50	5.50	65.00	1.00	3.721	3.721
30	15.00	1.50	5.50	65.00	1.00	3.727	3.721
31	15.00	1.50	5.50	65.00	1.00	3.798	3.721
32	15.00	1.50	5.50	65.00	1.00	3.716	3.721

3.2. Kết quả thí nghiệm ở tâm của mô hình CCD để tối ưu hóa lượng lactase

Sau khi tối ưu từng yếu tố riêng lẻ bằng phương pháp cổ điển để tìm điểm tại tâm của mô hình CCD, ta thu được kết quả như bảng 5. Các điểm tại tâm là hàm lượng lactose 15%, hàm lượng amonium sulphate 1.5%, pH 5.5, độ ẩm 65% và tỉ lệ giống 1%. Theo S. Nizamuddin và cộng sự (2008) thì hàm lượng lactose bổ sung là 12.5%. Trong nghiên cứu của nhóm

cộng sự này, môi trường nuôi cấy có bổ sung thêm glucose vì vậy có sự sai khác với kết quả của chúng tôi. Kết quả pH 5.5. phù hợp với nghiên cứu của S.Mirdamadi và cộng sự (1997), theo nhóm tác giả này pH tối ưu của *A. oryzae* từ 4.5 đến 5.4. Độ ẩm của môi trường nuôi cấy theo nghiên cứu của S. Nizamuddin và cộng sự (2008) là 90%, Điều này có thể giải thích vì môi trường bán rắn trong nghiên cứu của nhóm tác giả này tỉ lệ cám gạo và trấu là 1:1.

Bảng 5. Kết quả khảo sát các điểm tại tâm của mô hình CCD

Các mức	Hàm lượng lactose (% w/w)	Hoạt tính lactase (U/g)	Hàm lượng nguồn nitơ (%w/w)	Hoạt tính lactase (U/g)	pH	Hoạt tính lactase (U/g)	Độ ẩm	Hoạt tính lactase (U/g)	Tỉ lệ giống (% w/w)	Hoạt tính lactase (U/g)
Mức 1	7.5	0.821	0.5	1.206	4.5	0.859	55	1.830	0.5	1.830
Mức 2	10	1.760	1.0	2.732	5.0	1.596	60	2.792	0.75	2.792
Mức 3	12.5	3.717	1.5	3.791	5.5	3.779	65	3.793	1.0	3.793
Mức 4	15	3.794	2.0	2.660	6.0	2.491	70	2.469	1.25	2.469
Mức 5	17.5	2.795	2.5	1.603	6.5	2.428	75	1.589	1.5	1.589
Mức 6	20	1.740	3.0	1.010	7.0	2.296	80	1.101	2	1.101

3.3. Tối ưu hóa giá trị các yếu tố ảnh hưởng đến sản lượng lactase bằng phương pháp RSM - CCD

Sau khi có các điểm ở tâm, thực hiện thí nghiệm theo RSM – CCD, xử lý bằng Design expert 8.0.7. Giá trị hàm đáp ứng theo thực nghiệm và tiên đoán theo mô hình được trình bày trong bảng 4. Dựa vào số liệu thống kê ta phân tích những yếu tố ảnh hưởng đến kết quả tối ưu so với kết quả ở tâm phương án theo tiêu chuẩn Student.

Bảng 6. Phân tích thí nghiệm ở tâm phương án

N ₀	y ₀ ^u	y ⁰	y ⁰ - y ⁻⁰	(y ⁰ - y ⁻⁰) ²
1	3.796		0.040	0.0016
2	3.779		0.023	0.0005
3	3.721		-0.035	0.0012
4	3.727	3.756	-0.029	0.0009
5	3.798		0.042	0.0018
6	3.716		-0.040	0.0016

$$S_{th}^2 = \frac{\sum_{u=1}^6 (y^0 - y^{-0})^2}{N_0 - 1} = 0.0015,$$

$$S_{b_j} = \sqrt{\frac{S_{th}^2}{N}} = 0.0069$$

Với N₀ là số thí nghiệm ở tâm, N là tổng số thí nghiệm

Tra bảng Student: t_p(f)

với p = 0,05;

$$f = N_0 - 1 = 5; t_{0.05}(5) = 2.015$$

Tính ý nghĩa được tính theo công thức

$$t_j = \frac{|b_j|}{S_{b_j}}$$

Bảng 7. So sánh tính ý nghĩa của các hằng số hồi quy theo tiêu chuẩn Student

Các biến số hồi quy	Các hằng số hồi quy	Tính ý nghĩa	Kiểm định ý nghĩa
x ₀	3.64	529.583	+
x ₁	-0.267	38.846	+
x ₂	-0.400	58.196	+
x ₃	0.720	104.753	+
x ₄	-0.149	21.678	+
x ₅	-0.004	0.582	-
x ₁ x ₂	-0.082	11.930	+
x ₁ x ₃	-0.336	48.885	+
x ₁ x ₄	0.459	66.780	+
x ₁ x ₅	-0.148	21.532	+
x ₂ x ₃	-0.204	29.680	+
x ₂ x ₄	-0.346	50.339	+
x ₂ x ₅	0.488	70.999	+
x ₃ x ₄	-0.145	21.096	+
x ₃ x ₅	-0.244	35.500	+
x ₄ x ₅	-0.239	34.772	+
x ₁ ²	-0.559	81.329	+
x ₂ ²	-0.444	64.597	+
x ₃ ²	-0.430	62.561	+
x ₄ ²	-0.433	62.997	+
x ₅ ²	-0.642	93.404	+

Ghi chú: +: hằng số có ý nghĩa, -: hằng số không ý nghĩa

Vậy hệ số có ý nghĩa là: $l = 20$

Phương trình hồi quy có dạng: $Y = 3.64 - 0.267x_1 - 0.400x_2 + 0.720x_3 - 0.149x_4 - 0.082x_1x_2 - 0.336x_1x_3 + 0.459x_1x_4 - 0.148x_1x_5 - 0.204x_2x_3 - 0.346x_2x_4 + 0.488x_2x_5 - 0.145x_3x_4 - 0.244x_3x_5 - 0.239x_4x_5 - 0.559x_1^2 - 0.444x_2^2 - 0.430x_3^2 - 0.433x_4^2 - 0.642x_5^2$

Hệ số hồi qui (R^2) tính được là 0.9608. Điều này thể hiện rằng có 96.08% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán theo mô hình.

Kiểm tra sự tương thích của phương trình theo tiêu chuẩn Fisher

$$F = \frac{S_{du}^2}{S_{th}^2} \text{ với } S_{th}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - l}$$

Trong đó: y_i : giá trị đo được trong thực nghiệm; \bar{y}_i : giá trị tính toán theo phương trình.

$$S_{th}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - l} = 0.007; F = \frac{S_{du}^2}{S_{th}^2} = 4.622$$

Tra bảng $F_{1-p}(f_1, f_2)$

với $p = 0,05$;

$$f_1 = N - l; f_2 = N_0 - 1,$$

$$F_{1-0,05}(12, 5) = 4.6777$$

$F < F_{1-p}(f_1, f_2)$ do đó, phương trình tương thích với thực nghiệm.

Kết quả phân tích hồi quy cho thấy hàm lượng lactose, hàm lượng $(NH_4)_2SO_4$, pH, độ ẩm là bốn yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp lactase, trong đó pH được xem là yếu tố ảnh hưởng lớn nhất.

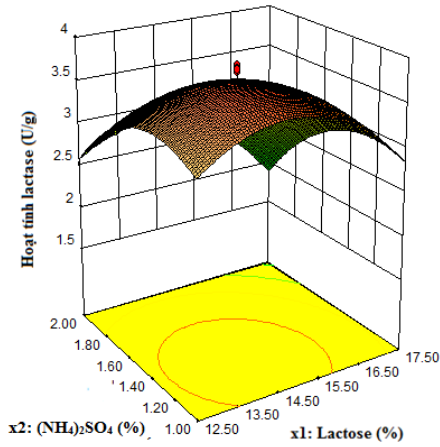
Mặt đáp ứng (Hình 1, Hình 2, Hình 3, Hình 4) thể hiện sự tương tác của từng cặp yếu tố và từ biểu đồ này có thể xác định được giá trị tối ưu của từng yếu tố làm cho hàm đáp ứng cực đại. Đồ thị hình 1, 2, 3, 4 cho thấy 3 yếu tố là hàm lượng lactose, hàm lượng $(NH_4)_2SO_4$ và độ ẩm đều tác động âm còn yếu tố pH tác động dương đến quá trình sinh tổng hợp lactase. pH càng tăng thì sản lượng lactase càng tăng. Tuy nhiên khi hàm lượng lactose, hàm lượng $(NH_4)_2SO_4$, độ ẩm tăng đến một mức độ nào đó thì sản lượng lactase bắt đầu giảm dần.

Mô hình đã dự đoán sản lượng lactase tối đa đạt được 4.120U/g khi hàm lượng lactose 13.3%, hàm lượng $(NH_4)_2SO_4$ 1.7%, pH 5.94, độ ẩm 61.04%, tỉ lệ giống 1.05%.

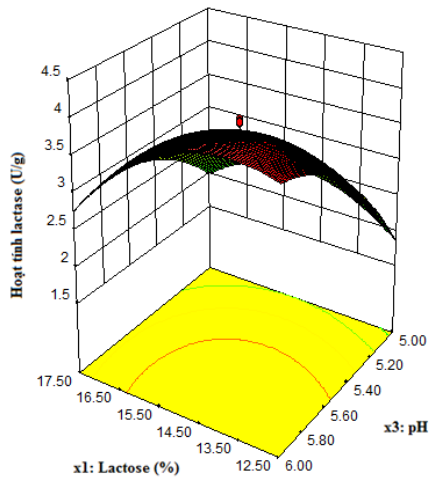
Đánh giá mô hình thực nghiệm

Để kiểm tra kết quả của mô hình, tiến hành thí nghiệm với các giá trị dự đoán để thu lactase cực đại. Hoạt tính lactase nhận được từ kết quả thực nghiệm là 3.947U/g, hoạt tính lactase thu

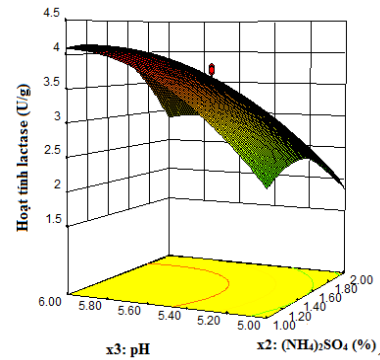
được theo dự đoán của mô hình là 4.120 U/g (Hình 5). Sự tương quan chặt chẽ giữa hai kết quả tính toán giúp khẳng định tính chính xác của mô hình và sự tồn tại của điểm tối ưu [16].



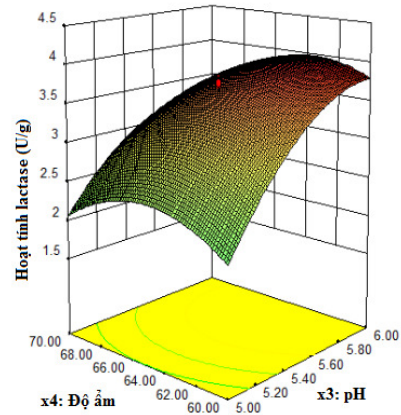
Hình 1. Đồ thị bề mặt đáp ứng biểu diễn sự phụ thuộc của hoạt tính lactase (U/g) vào hàm lượng của lactose (%) và $(NH_4)_2SO_4$ (%).



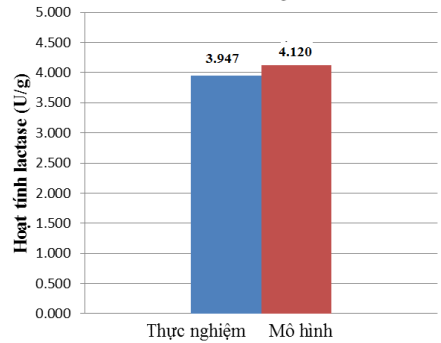
Hình 2. Đồ thị bề mặt đáp ứng biểu diễn sự phụ thuộc của hoạt tính lactase (U/g) vào hàm lượng của lactose (%) và pH.



Hình 3. Đồ thị bề mặt đáp ứng biểu diễn sự phụ thuộc của hoạt tính lactase (U/g) vào hàm lượng của $(NH_4)_2SO_4$ (%) và pH.



Hình 4. Đồ thị bề mặt đáp ứng biểu diễn sự phụ thuộc của hoạt tính lactase (U/g) vào độ ẩm và pH.



Hình 5. So sánh hoạt tính lactase (U/g) giữa kết quả thực nghiệm và mô hình.

4. Kết luận

Với mục tiêu nghiên cứu sản xuất chế phẩm lactase ở Việt Nam, bài báo đã chọn được chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* BK0 có khả năng sinh tổng hợp lactase cao nhất trong 6 chủng của bộ môn Công nghệ Sinh học – ĐH Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh.

Công cụ thiết kế thí nghiệm tối ưu đa yếu tố theo 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 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.

Qua áp dụng phương pháp mô hình hóa RSM – CCD và kiểm tra bằng thực nghiệm, đã xác định môi trường lên men bán rắn tối ưu để nuôi cấy *Aspergillus oryzae* BK0 thu lactase cực đại là (4.120 U/g) ở giá trị hàm lượng lactose 13.3%, hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 1.7%, pH là 5.94, độ ẩm là 61.04^0 , tỉ lệ giống là 1.05%.

Tài liệu tham khảo

- [1] Holker U, Lenz J, Solid-state fermentation-biotechnological advantages. Curr. Opin. Microbiol. 8 (2005), pp.201-306.
- [2] Robert P. Tengerdy, Solid substrate fermentation. Trends in Biotechnology, vol 3, No. 4 (1985).
- [3] S. Nizamuddin, A. Sridevi and G. Narasimha, Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. African Journal of Biotechnology, vol. 7 (8), (2008), pp. 1096-1100.
- [4] Duarte P.M. Torres, Maria do Pilar F. Gonçalves, José A. Teixeira, and Lígia R. Rodrigues, Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. Comprehensive Reviews in Food. Science and Food Safety, Vol 9, Issue 5, (2010), pp. 438–454.
- [5] Gonzalez RR, Monsan P, Purification and some characteristics of β -galactosidase from *Aspergillus fonscaeus*. Enzyme Microb. Technol. 13 (1991), 349-352.
- [6] Seval Dagbagli, Yekta Goksungur, Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. Electronic Journal of Biotechnology, Vol.11, No.4. (2008).
- [7] Castillo E Del, Process Optimization A Statistical Approach. Springer Science. New York, USA: (2007), 118-122.
- [8] He, Y.Q. and Tan, T.W., Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 43, no. 1-4, (2006), pp. 9-14.
- [9] Battestin, V. and Macedo, G.A., Tannase production by *Paecilomyces variotii*. Bioresource Technology, vol. 98, no. 9, (2007), p. 1832-1837.
- [10] Uma Maheswar Rao, J.L. and Satyanarayana, T., Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications. Bioresource Technology, vol. 98, no. 2, (2007), p. 345-352.
- [11] Ibrahim H.M. et al., Optimization of medium for the production of β -cyclodextrin glucanotransferase using central composite design (CCD). Process Biochemistry, vol. 40, no. 2, (2005), p. 753-758.
- [12] Ana Paula Manera et al., Optimization of the Culture Medium for the Production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. Food Technol. Biotechnol, vol 46 (1), (2008), pp. 66–72.
- [13] Đặng Thị Thu, Nguyễn Văn Cách, Bùi Thị Hải Hòa, Tuyển chọn và nghiên cứu điều kiện lên men sinh tổng hợp β -Galactosidase từ chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae*. Tạp chí khoa học và công nghệ, tr 23 – 31, tập 45, (2007), số 1.
- [14] Nguyễn Cảnh, Quy hoạch thực nghiệm, NXB Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, (2004).
- [15] Park YK, DeSanti MSS, Pastore GM, Production and characterization of β - galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Journal of Food Science, vol 44(1), (1979), pp. 100.
- [16] S. Miradamadi, N. Moazami, M.N. gorgani, Production of β - galactosidase in submerged media by *Asp. oryzae* . PTCC 5163. J. Sci. Islamic Repub. Iran, vol 8(1), (1997), 23 -27.

Optimization of Lactase Production using *Aspergillus oryzae* by Response Surface Methodology-Central Composite Design

Nguyễn Thúy Hương, Mai Thục Di

*Department of Biotechnology, University of Technology, VNU – HCM
268 Lý Thường Kiệt Str., 14 Ward, 10 Dist., Hồ Chí Minh, Vietnam*

Abstract: *Aspergillus oryzae* BK0 strain producing lactase was selected from 6 *Aspergillus oryzae* strains of laboratory. *Aspergillus oryzae* BK0 has the ability of producing the highest activity of lactase and chosen to study the conditions of fermentation to produce lactase. from soil polluted with milk dairy factory effluents. Optimization of lactase (E.C 3.2.1.23) was carried out in Solid State Fermentation (SSF) with . rice bran and rice husk. Response surface methodology - Central composite design was used to investigate the effects of five fermentation parameters (lactose concentration, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration, pH, initial moisture and spore ratio) on lactase enzyme production. Results of the statistical analysis showed that the fit of the model was good in all cases. Maximum specific enzyme activity of 4.120 U/g was obtained at the optimum levels of process variables (lactose (13.3%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.7%), pH (5.94), moisture (61.04%), spore ratio (1.05%)). The response surface methodology was found to be useful in optimizing and determining the interactions among process variables in lactase enzyme production. Testing the model obtained with lactase activity of 3.947 U/g.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, lactase RSM – CCD, solid state fermentation.