NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SẢN XUẤT B-GLUCAN TỪ CHỦNG *AUREOBASIDIUM PULLULANS APX1.5.4.1* SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT

RESEARCH ON DETERMINING FERMENTATION CONDITIONS FOR B-GLUCAN PRODUCTION FROM *AUREOBASIDIUM PULLULANS STRAIN APX1.5.4.1* USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Hoàng Thị Ngọc Anh, Vũ Văn Hạnh

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

Đến Tòa soạn ngày 15/03/2023, chấp nhận đăng ngày 27/04/2023

Tóm tắt: Khả năng sản xuất exo-polysaccharide (*β-glucan và pullulan)* bởi chủng A. pullulans APX1.5.4.1 bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, thời gian lên men và pH môi trường. Mục đích của nghiên cứu này là xác định được điều kiện lên men để sản xuất *β*-glucan cao bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). Kết quả cho thấy, điều kiện lên men với nhiệt độ 28°C, thời gian lên men 3 ngày và pH 6 cho lượng β-glucan cao nhất đạt 11,215±0,083 g/L, cao hơn 6,02 lần so với lượng β-glucan (1,862 g/L) từ chủng A. pullulans KSY-0516 và 1,22 lần so với lượng β-glucan (9,2 g/L) từ chủng A. pullulans M-2. Ở điều kiện lên men này cũng cho hàm lượng pullulan thu được cũng khá cao đạt 20,48±0,15 g/L. Sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng đã giúp xác định được điều kiện lên men phù hợp để sản xuất β-glucan và pullulan với giá trị R2 lần lượt là 0,9955 và 0,9960.

Từ khóa: β-glucan, pullulan, A. pullulans APX1.5.4.1.

Abstract: The production of exo-polysaccharide (β-glucan and pullulan) by A. pullulans strain APX1.5.4.1 was affected by temperature, fermentation time and pH of fermentation medium. The aim of this study was to determine the fermentation conditions for high β-glucan production performed by response surface method (RSM). The results showed that the suitable fermentation conditions for high β-glucan production (11,215±0.083 g/L) were determined as fermentation temperature at 28°C, fermentation time 3 days and pH 6. In this fermentation condition, the obtained pullulan content is quite high (20.48±0.15 g/L). The content of β-glucan produced from strain A. pullulans APX1.5.4.1 in this study was 6.02 times higher than the amount of β-glucan (1,862 g/L) from strain A. pullulans KSY-0516 and 1.22 times higher than that of strain A. pullulans KSY-0516. with β-glucan (9.2 g/L) from A. pullulans M-2 strain. The use of response surface method helped determine the suitable fermentation conditions for β-glucan and pullulan production with R2 values of 0.9955 and 0.9960, respectively.

Keywords: β-Glucan, pullulan, Aureobasidium pullulans APX1.5.4.1.

1. GIỚI THIỆU

Aureobasidium pullulans là một loại nấm giống như nấm men, thường được biết đến với khả năng sản xuất pullulan hòa tan tốt trong nước [1]. Các chất thu được từ dịch lên men chủng *A. pullulans* gồm β-1,3-glucan (β-glucan), poly(β-L-malic acid), dầu nặng, siderophore, cũng như một số enzyme công nghiệp trong các điều kiện cụ thể khác nhau [2]. Pullulan và β-glucan đều là

exopolysacarit được tìm thấy có trong dịch ngoại bào của A. pullulans [3].

Pullulan không độc hại, không gây đột biến, không gây ung thư, không gây miễn dịch và hiện nay được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực phụ gia thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm [4]. β-glucan đã được chứng minh là có một số hoạt tính sinh học như chống ung thư, điều trị đái tháo đường, chống viêm và điều hòa miễn dịch [5] và các ứng dụng trong thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm và các sản phẩm có giá trị gia tăng tiềm năng khác là rất có triển vọng [6].

Các yếu tố ảnh hưởng đến sản xuất pullulan, β-glucan từ loài nấm men này [7] như nguồn cacbon [8] và nguồn nitơ [9],... trong môi trường nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan [10]. Ngoài ra, các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sản xuất pullulan, β-glucan như nhiệt độ [11], thời gian lên men [12] và pH ban đầu [13] cũng cần được xác định.

Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM: Response surface methodology), được sử dụng để nghiên cứu các điều kiện tối ưu cho một hệ thống đa biến, là một kỹ thuật tối ưu hóa hiệu quả. Phương pháp này đã được áp dụng thành công trong việc tối ưu hóa các thành phần môi trường [14], các điều kiện của quá trình lên men [15]. RSM có thể cho thấy sự tương tác giữa các biến, cung cấp thông tin cần thiết cho thiết kế và tối ưu hóa quy trình.

Mục đích của nghiên cứu này là sử dụng phương pháp RSM để tối ưu các điều kiện lên men nhằm nâng cao khả năng sinh tổng hợp pullulan, β-glucan từ chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chủng vi sinh vật

Aureobasidium pullulans APX1.5.4.1 được sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp từ Phòng Các chất chức năng sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chủng này được duy trì ở 4℃ trên môi trường thạch khoai tây dextrose (PDA) và được cấy truyền 2 tuần một lần. Để bảo quan lâu dài, chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1 được bảo quản trong glyxerol 30% ở -80℃.

2.2. Chuẩn bị môi trường

Môi trường hoạt hoá chủng nấm APX1.5.4.1 PDA (g/L): dịch chiết khoai tây 200 g, glucose 20, nước l000 mL pH 6,0±0,2.

Môi trường lên men chứa (g/L): glucose 25, sucrose 25, K_2HPO_4 1, $MgSO_4.7H_2O$ 2, nước l000 mL, pH 6,0±0.2. Tất cả môi trường được hấp khử trùng trong 15 phút ở 121℃ trước khi sử dụng.

2.3. Lên men

Chủng *Aureobasidium pullulans* APX1.5.4.1 được lấy từ ống giống sau đó được hoạt hoá trên đĩa thạch PDA 28℃, 4 ngày. Các miếng thạch kích thước 1×1 cm chứa chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1 được cấy vào bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường lên men đã chuẩn bị, nuôi lắc 150 vòng/phút trong 3 ngày, 28℃.

2.4. Tách chiết và thu nhận polysacharide ngoại bào

Dịch nuôi cấy chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1 được ly tâm ở 5800 vòng trong 20 phút để loại bỏ tế bào và thu dịch nổi. Phần dịch nổi sau đó được bổ sung ethanol lạnh tỉ lệ 1: 2(v/v), vortex đều, giữ -20℃ qua đêm để kết tủa polysacharide ngoại bào (EPS). Ethanol sau đó được loại bỏ bằng cách li tâm 5800 vòng trong 20 phút, kết tủa thu được sau đó được sấy ở 60℃ đến khối lượng không đổi và xác định khối lượng khô [16]. Khối lượng khô

được tính theo công thức:

$m (g) = m_1 – m_2$

Trong đó:

m_1: Khối lượng EPS ướt trước khi sấy (g);

m_2: Khối lượng EPS sau khi sấy (g).

2.5. Xác định hàm lượng β-glucan

Để xác định hàm lượng β-glucan có trong tủa EPS(exo-polysaccharide), bộ kit xác định β-Glucan (Megazyme International, Ireland) được sử dụng [17]. Đầu tiên, để xác định glucan tổng số cân 90 mg EPS vào ống thuỷ tinh sau đó bổ sung 2 ml H_2SO_4 12M làm lạnh đến –20℃ trong 2h để hoà tan hỗn hợp gồm 1,3:1,6-β-glucan, 1,3-β-glucan và α-glucan có trong EPS. Hỗn hợp sau đó được bổ sung 10 mL H_2O ủ 100℃ trong 2 h để thuỷ phân một phần thành D-glucose. Dung dịch sau đó được trung hoà bằng NaOH 8 M và bổ sung natri-acetate 200 mM pH4,5 đến 100 mL. 100 µL dịch thuỷ phân được li tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ phần cặn, sau đó bổ sung 100 µL hỗn hợp exo-1,3-β-glucanase (100 U/mL), β-glucosidase (20 U/mL) ủ 40℃ trong 1h để thuỷ phân hoàn toàn thành D-glucose. Glucan tổng số được xác định bằng cách ủ 100 µL dịch sau li tâm với 3ml thuốc thử GOPOD 40℃ trong 20 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng và đo độ hấp phụ tại bước sóng 510 nm. Tiếp theo, để xác định α-glucan, 100 mg EPS được bổ sung 2 mL NaOH 1,7 M để hoà tan α-glucan sau đó được bổ sung hỗn hợp 0,2 ml amyloglucosidase (1.630 U/ ml) cộng với invertase (500 U/ml), ủ ở 40°C trong 30 phút. Dung dịch sau đó được li tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ phần cặn. Hàm lượng α-glucan được xác định bằng cách ủ 100 µL dịch sau li tâm với 3 ml thuốc thử GOPOD ở 40℃ trong 20 phút sau đó đo độ hấp phụ tại bước sóng 510 nm. Dung dịch D-glucose làm dung dịch chuẩn, mẫu blank làm đối chứng là mẫu trắng. Hàm lượng glucan tổng số, α-glucan được xác định theo các bước được hãng sản xuất hướng dẫn [17].

Glucan tổng số (%w/w)= $\Delta A \times F/W \times 90$

A-glucan (%w/w)= $\Delta A \times F/W \times 90$

Trong đó:

ΔA: $OD_{510\ nm}$ mẫu – $OD_{510\ nm}$ blank;

F: hệ số chuyển đổi độ hấp phụ sang khối lượng D-glucose (mg); F= $100/OD_{510}$ glucose chuẩn;

W: khối lượng mẫu (mg);

90: hệ số chuyển đổi.

Hàm lượng β-glucan được xác định theo công thức: *β-glucan (g/L)* = (Glucan tổng số) – (α-glucan).

2.6. Nghiên cứu điều kiện lên men trong sản xuất β-glucan

Để xác định điều kiện lên men tối ưu trong sản xuất β-glucan, các điều kiện lên men được nghiên cứu riêng rẽ bao gồm nhiệt độ, thời gian lên men, pH ban đầu nhằm xác định ảnh hưởng của các đơn yếu tố này đến việc sinh tổng hợp β-glucan, pullulan. Các thông số khảo sát cụ thể được trình bày tại bảng 1.

2.7. Tối ưu điều kiện lên men sử dụng thiết kế Box-Behnken (BBD) trong sản xuất β-glucan

Dựa trên kết quả của các thử nghiệm đơn yếu tố, đánh giá sự tương tác của các nhân tố đã được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp RSM (Design-Expert 13). Bảng 1 thể hiện các nhân tố nhiệt độ, thời gian lên men và pH ban đầu cho RSM.

Bảng 1. Mức độ thử nghiệm khác nhau của các nhân tố trong Box-Behnken

Kí hiệu	Nhân tố	Mức độ thử nghiệm của các yếu tố		
		–1	0	1
A	Nhiệt độ	26	28	30
B	Thời gian	2	3	4
C	pH	5,5	6,0	6,5

2.8. Xử lý số liệu

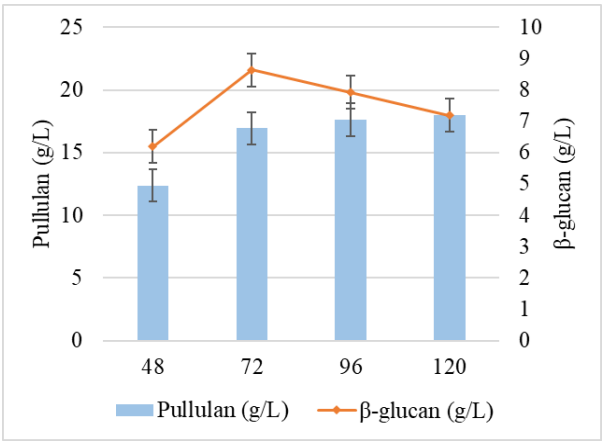
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và các số liệu được xử lý bằng hàm ANOVA. Mối tương quan giữa các biến độc lập được thực hiện bằng phương pháp đáp ứng bề mặt 3-D với phần mềm Design-Expert 13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

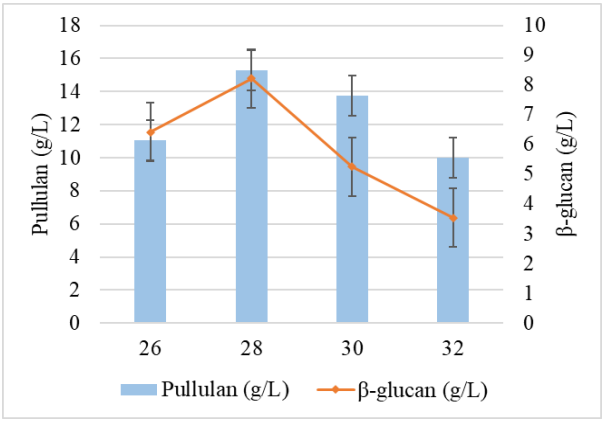
3.1. Nghiên cứu điều kiện lên men đơn biến ảnh hưởng đến sản xuất pullulan và β-glucan của chủng APX1.5.4.1

Lượng pullulan, β-glucan tạo ra liên quan trực tiếp đến giai đoạn tăng trưởng của nấm men. Do vậy, thời gian lên men chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1 được khảo sát. Thời gian lên men từ 1 đến 3 ngày thì hàm lượng β-glucan tăng, sau 4 ngày thì không đổi. Điều này có thể giải thích do khi thời gian lên men tăng sau 4 ngày, tế bào chuyển sang dạng bào tử chlamydospores, sắc tố melanin tăng, độ nhớt môi trường lên men tăng dẫn đến việc sinh tổng hợp β-glucan giảm. Sau 3 ngày lên men, hàm lượng β-glucan cao nhất đạt 8,639±0,13 g/L, hàm lượng pullulan đạt 16,940±0,5 g/L. Nghiên cứu cũng cho thấy hàm lượng pullulan đạt cao nhất sau 5 ngày lên men (hình 1). Kết quả nghiên cứu cũng tương đồng với các nghiên cứu trước đó [18].

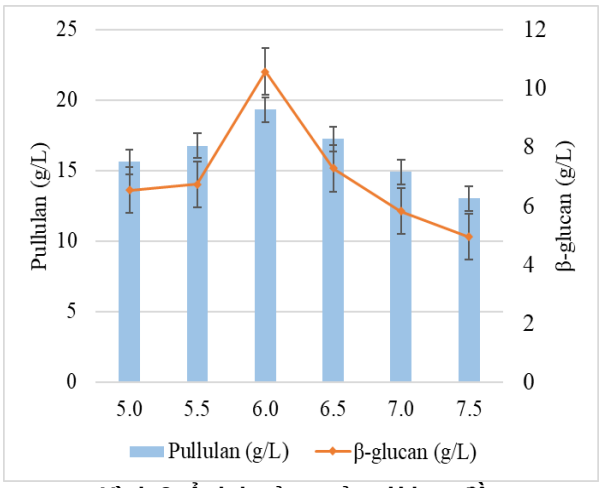
Nhiệt độ lên men là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình lên men sản xuất β-glucan và pullulan bởi chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1. Hàm lượng pullulan và β-glucan thu được lần lượt là 15,3±0,2 và 8,214±0,11 g/L ở 28℃, ở nhiệt độ lên men này cho khả năng sinh pullulan và β-glucan là cao nhất (hình 2). Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với nghiên cứu trước đó [19].



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian lên men (ngày)



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men (℃)



Hình 3. Ảnh hưởng của pH ban đầu

Độ pH ban đầu của môi trường lên men ảnh hưởng khác nhau đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1 đồng thời ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp pullulan và β-glucan của chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1.

Hình 3 cho thấy hàm lượng pullulan và β-glucan tăng khi pH môi trường tăng từ 5,0-6,0 và có xu hướng giảm từ pH 6,5. Ở pH 6,0 cho hàm lượng pullulan và β-glucan cao nhất lần lượt là 19,3±0,23 và 10,569±0,15 g/L.

3.2. Nghiên cứu tương tác của các điều kiện lên men đến sản xuất β-glucan của chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1

Dựa trên các thông số đơn biến, ba nhân tố được chọn cho nghiên cứu tối ưu hóa với thiết kế Box-Behnken Design (BBD) liên quan đến β-glucan. Thí nghiệm được tiến hành nhằm nghiên cứu ảnh hưởng tương tác của các yếu tố nhiệt độ, thời gian lên men và pH đến khả năng sản xuất β-glucan. Bên cạnh đó tác động đến sinh tổng hợp β-glucan, nghiên cứu thu cũng được được lượng pululan tăng lên đáng kể. Thiết kế thí nghiệm và kết quả thu được từ thí nghiệm được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Thiết kế Box-Behnken và kết quả thực nghiệm

	Nhân tố			Thực nghiệm	
Thí nghiệm	**A (℃)**	**B (ngày)**	**C (pH)**	**Pullulan (g/L)**	**β – glucan (g/L)**
1	28	3	6.0	19.300	10.738
2	26	2	6.0	21.000	11.162
3	28	3	6.0	20.480	11.215
4	28	4	5.5	26.200	10.527
5	30	3	6.5	18.220	7.703
6	30	2	6.0	21.960	7.951
7	30	3	5.5	18.740	4.001
8	30	4	6.0	11.080	5.828
9	28	2	6.5	20.160	10.338
10	26	3	5.5	23.360	6.547
11	28	3	6.0	19.500	10.941
12	26	4	6.0	13.460	6.311
13	26	3	6.5	22.500	10.116
14	28	2	5.5	21.880	10.973
15	28	4	6.5	17.220	8.709

Phân tích dữ liệu thí nghiệm chỉ ra rằng mối quan hệ giữa biến phụ thuộc và các biến độc lập sẽ được cho bởi phương trình đa thức bậc hai sau:

**β-glucan* (g/L) = 10,96 – 1,24A – 0,5188B – 0,6134C + 0,6823AB + 0,0333AC –

$0{,}2955BC - 3{,}10A^2 - 0{,}0534B^2 - 0{,}7746C^2 - 1{,}22A^2B + 2{,}43A^2C + 0{,}3163AB^2$

*$Pullulan$ (g/L) $= 19{,}76 - 2.23A + 0{,}3450B - 2{,}67C - 0{,}8350AB + 0{,}0850AC - 1{,}81BC - 1{,}77A^2 - 1{,}11B^2 + 2{,}72C^2 - 4{,}95A^2B + 2{,}33A^2C + 1{,}87AB^2$

3.3. Phân tích tương tác các yếu tố đến sản xuất β-glucan và pullulan từ chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1

Tương tác giữa nhiệt độ (A) và thời gian (B) tại pH trung tâm (hình 4A, 5A phụ lục) cho thấy, tại cùng nhiệt độ khi thời gian lên men lâu hơn hàm lượng β-glucan và pullulan đều có xu hướng giảm mạnh. Cụ thể, thí nghiệm số 2 và 12 bảng 2 chỉ ra rằng lượng pullulan giảm từ 21,00 g/L xuống 13,46 g/L; lượng β-glucan giảm từ 11,162 g/L xuống 6,311 g/L. Kết quả tương tự khi nhiệt độ tăng ở cùng thời gian lên men (2 ngày hoặc 4 ngày).

Sự tương tác giữa nhiệt độ (A) và pH (C) (hình 4B, 5B) cho thấy, khi nhiệt độ tăng (giữ nguyên pH ban đầu) hàm lượng β-glucan giảm từ 6,547 g/L xuống 4,001 g/L, hàm lượng pullulan giảm từ 23,36 g/L xuống 18,74 g/L (thí nghiệm số 7, 10), khi pH tăng (nhiệt độ cố định) hàm lượng β-glucan tăng mạnh từ 6,547 g/L đến 10,116 g/L trong khi hàm lượng pullulan giảm từ 23,36 g/L xuống 22,5 g/L (thí nghiệm số 10, 13 bảng 2). Kết quả tương tự ở thí nghiệm số 5 và 7. Nghiên cứu cho thấy, khi nhiệt độ lên men tăng, sắc tố melanin tăng dẫn đến ức chế quá trình sinh tổng hợp EPS. Việc sinh tổng hợp EPS thích hợp trên môi trường có pH axit yếu.

Tương tác giữa thời gian (B) và pH (C) (hình 4C, 5C) cho thấy, sau lên men 4 ngày, khi tăng pH thì lượng pullulan giảm mạnh từ 26,2 g/L xuống 17,22 g/L và lượng β-glucan cũng giảm từ 10,527 g/L xuống 8,709 g/L; trong khi sau lên men 2 ngày, pH môi trường tăng dẫn đến lượng EPS giảm không đáng kể (thí nghiệm số 4; 9; 14 và 15). Ngược lại, ở cùng pH khi tăng thời gian lên men cho thấy lượng β-glucan cũng giảm không đáng kể, trong khi lượng pullulan giảm rõ rệt (bảng 2) thí nghiệm số 4; 9; 14 và 15.

Kết quả thực nghiệm cho thấy hàm lượng β-glucan cao nhất là 11,215±0,083 g/L ở thí nghiệm số 3 với các giá trị trung tâm (28℃, pH 6,0; thời gian 3 ngày); đồng thời hàm lượng pullulan cũng đạt khá cao (20,48±0,15 g/L) cao hơn chủng *A. pullulans* AP4 (18,55 g/L) [20] trong nghiên cứu của Đặng Thị Hà Thu và cs. (2022). Hàm lượng β-glucan tạo ra từ chủng *A.pullualans* APX1.5.4.1 cao hơn 6,02 lần so với lượng β-glucan (1,862 g/L) từ chủng *A. pullulans* KSY-0516 [21] và cao hơn 1,22 lần so với lượng β-glucan (9,2 g/L) từ chủng *A. pullulans* M-2 [22].

Ngoài ra, phân tích phương sai của mô hình là có khác biệt ($P< 0{,}05$) (bảng 3, 4 phụ lục); giá trị CV là 2,7%, chỉ ra rằng thí nghiệm có độ chính xác cao. Giá trị R^2 là 0,9985 cho thấy rằng 99,85% sự thay đổi có thể được giải thích bằng mô hình phản hồi, mô hình có độ tin cậy cao. Tất cả các thông số này đều có sự thống nhất và hợp lý giữa các giá trị thử nghiệm và dự đoán, cho nên mô hình có thể được sử dụng trong thực tế để điều hướng nhằm nâng cao sản xuất β-glucan của chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1.

4. KẾT LUẬN

Tối ưu điều kiện lên men sử dụng phương pháp thống kê (RSM) có khả năng khắc phục những hạn chế của phương pháp thực nghiệm trước đây, là một công cụ tốt để tối ưu quá trình sản xuất β-glucan từ chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1. Phương pháp bề mặt đáp ứng đã được đề xuất để nghiên cứu ảnh hưởng đồng

thời của các thành phần môi trường nuôi cấy và điều kiện lên men. Trong nghiên cứu này, đã xác định được điều kiện lên men phù hợp như: nhiệt độ 28℃; thời gian lên men 3 ngày và pH ban đầu 6.0 cho hàm lượng β-glucan đạt cao nhất (11,215±0,083 g/L) và pullulan đạt tương đối cao (20,48±0,15 g/L).

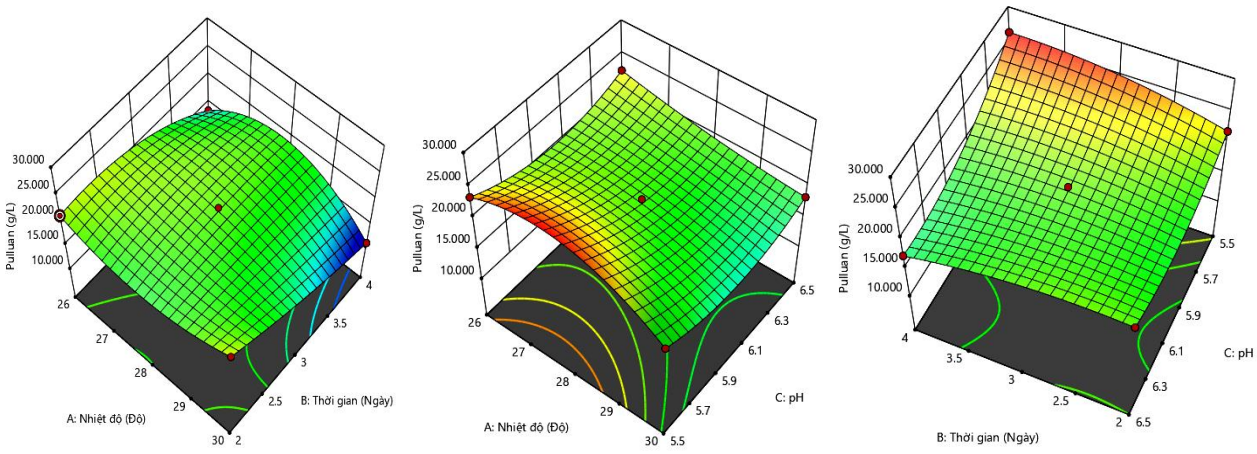
Lời cảm ơn

Công trình nghiên cứu được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài Mã số 01C-06/01-2021-3 của Sở Khoa học và Công nghệ, Thành phố Hà Nội.

PHỤ LỤC

Bảng 3. Phân tích phương sai của mô hình bậc hai bề mặt đáp ứng trong sản xuất pullulan từ chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1

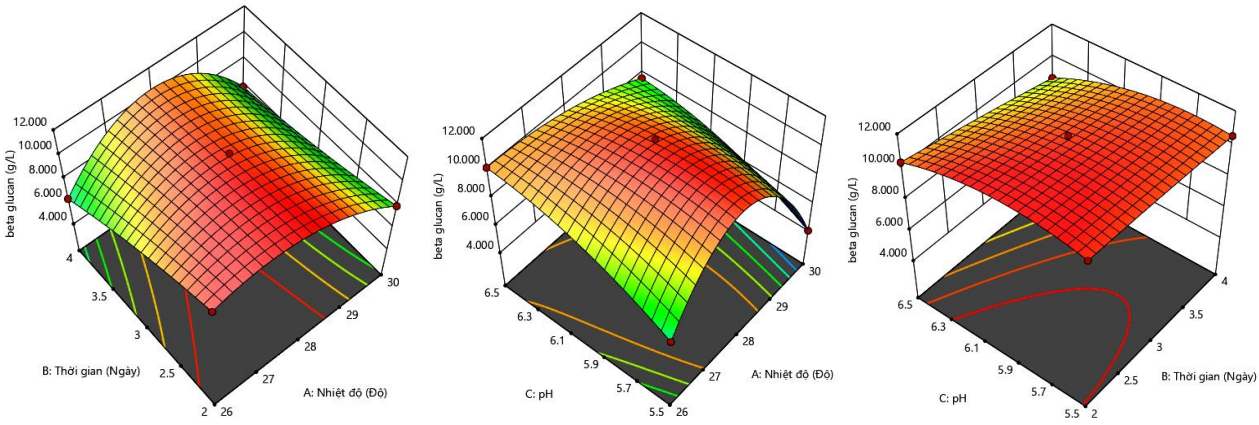
Nguồn	Tổng bình phương	Df	Bình phương trung bình	Giá trị F	Giá trị *P*
Mô hình	197,75	12	16,48	41,32	0,0239
A-Nhiệt độ	19,80	1	19,80	49,66	0,0196
B-Thời gian	0,4761	1	0,4761	1,19	0,3886
C-pH	28,62	1	28,62	71,77	0,0136
AB	2,79	1	2,79	6,99	0,1182
AC	0,0289	1	0,0289	0,0725	0,8130
BC	13,18	1	13,18	33,04	0,0290
A^2	11,60	1	11,60	29,09	0,0327
B^2	4,57	1	4,57	11,46	0,0773
C^2	27,27	1	27,27	68,37	0,0143
A^2B	49,01	1	49,01	122,88	0,0080
A^2C	10,86	1	10,86	27,23	0,0348
AB^2	6,99	1	6,99	17,54	0,0526
Sai số	0,7976	2	0,3988		
Tổng tương quan	198,55	14			
R^2 = 0,9960; R^2 điều chỉnh = 0,9719; CV= 3,21%.					



Hình 4. Biểu đồ bề mặt đáp ứng tương ứng về ảnh hưởng của ba biến độc lập đến việc lên men sản xuất pullulan. Khi tác động của hai biến được vẽ biểu đồ, biến còn lại được đặt ở mức 0. (A) Tương tác giữa nhiệt độ và thời gian; (B) Tương tác giữa nhiệt độ và pH; (C) Tương tác giữa thời gian và pH

Bảng 4. Phân tích phương sai của mô hình bậc hai bề mặt đáp ứng để sản xuất β-glucan từ chủng *A. pullulans* APX1.5.4.1

Nguồn	Tổng bình phương	Df	Bình phương trung bình	Giá trị F	Giá trị *P*
Mô hình	76,43	12	6,37	111,24	0,0089
A-Nhiệt độ	6,15	1	6,15	107,39	0,0092
B-Thời gian	1,08	1	1,08	18,81	0,0493
C-pH	1,51	1	1,51	26,29	0,0360
AB	1,86	1	1,86	32,52	0,0294
AC	0,0044	1	0,0044	0,0775	0,8069
BC	0,3494	1	0,3494	6,10	0,1322
A^2	35,45	1	35,45	619,09	0,0016
B^2	0,0105	1	0,0105	0,1841	0,7097
C^2	2,22	1	2,22	38,69	0,0249
A^2B	3,00	1	3,00	52,39	0,0186
A^2C	11,82	1	11,82	206,43	0,0048
AB^2	0,2001	1	0,2001	3,50	0,2025
Sai số	0,1145	2	0,0573		
Tổng tương quan	76,54	14			
R^2 = 0,9985; R^2 điều chỉnh = 0,9895; CV= 3,21%.					



Hình 5. Biểu đồ bề mặt đáp ứng tương ứng về ảnh hưởng của ba biến độc lập đến việc lên men sản xuất β-glucan. Khi tác động của hai biến được vẽ biểu đồ, biến còn lại được đặt ở mức 0. (A) Tương tác giữa nhiệt độ và thời gian; (B) Tương tác giữa nhiệt độ và pH; (C) Tương tác giữa thời gian và pH

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] K.C. Cheng, A. Demirci, and J.M. Catchmark, "Pullulan: Biosynthesis, production, and applications," *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011. doi: 10.1007/s00253-011-3477-y.

[2] S. Prasongsuk, P. Lotrakul, I. Ali, W. Bankeeree, and H. Punnapayak, “The current status of Aureobasidium pullulan in biotechnology,” *Folia Microbiologica*. 2018. doi: 10.1007/s12223-017-0561-4.

[3] K.I. Shingel, “Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan,” *Carbohydrate Research*. 2004. doi: 10.1016/j.carres.2003.10.034.

[4] R.S. Singh, N. Kaur, V. Rana, and J. F. Kennedy, “Pullulan: A novel molecule for biomedical applications,” *Carbohydrate Polymers*. 2017. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.089.

[5] J.S. Choi *et al.*, “Effect of a β-glucan from Aureobasidium on TGF-β1-modulated in vitro dermal wound repair,” *Toxicol. Environ. Health Sci.*, 2016, doi: 10.1007/s13530-016-0257-1.

[6] M. Jayachandran, J. Chen, S. S. M. Chung, and B. Xu, “A critical review on the impacts of β-glucans on gut microbiota and human health,” *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.06.010.

[7] R.W. Silman, W. L. Bryan, and T. D. Leathers, “A comparison of polyssacharides from strains of Aureobasidium pullulan,” *FEMS Microbiol. Lett.*, 1990, doi: 10.1016/0378-1097(90)90033-M.

[8] T.P. West, T.P. West, and B. Reed-hamer, “Ability of Aureobasidium pullulan to synthesize pullulan upon selected sources of carbon and nitrogen Ability ol Aureobasidium pullulan to synthesize pullulan upon selected sources of carbon and nitrogen,” no. January 1991, 2013.

[9] D.P.F. Auer and R.J. Seviour, “Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by Aureobasidium pullulan in batch culture,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32, no. 6, pp. 637–644, 1990, doi: 10.1007/BF00164732.

[10] P.A. Gibbs and R.J. Seviour, “Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by Aureobasidium pullulan in batch culture?,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, doi: 10.1007/s002530050851.

[11] B. McNeil and B. Kristiansen, “Temperature effects on polysaccharide formation by Aureobasidium pullulan in stirred tanks,” *Enzyme Microb. Technol.*, 1990, doi: 10.1016/0141-0229(90)90069-3.

[12] S.V.N. Vijayendra, D. Bansal, M. S. Prasad, and K. Nand, “Jaggery: A novel substrate for pullulan production by Aureobasidium pullulan CFR-77,” *Process Biochem.*, 2001, doi: 10.1016/S0032-9592(01)00214-X.

[13] K. Ono, N. Yasuda, and S. Ueda, “Effect of ph on pullulan elaboration by aureobasidium pullulan S-1,” *Agric. Biol. Chem.*, 1977, doi: 10.1080/00021369.1977.10862824.

[14] J.C. Roseiro, M.E. Esgalhado, M. T. Amaral Collaço, and A. N. Emery, “Medium development for xanthan production,” *Process Biochem.*, 1992, doi: 10.1016/0032-9592(92)87005-2.

[15] S.J. Kalil, F. Maugeri, and M. I. Rodrigues, “Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization,” *Process Biochem.*, 2000, doi: 10.1016/S0032-9592(99)00101-6.

[16] S. Wu, Z. Jin, Q. Tong, and H. Chen, “Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by Aureobasidium pullulan,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 76, no. 4, pp. 645–649, 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.11.034.

[17] C.-Y. Huang, Y.-C. Cheng, Y.-S. Lin, G.-Y. Liou, S.-J. Lin, and J.-T. Lai, “Aureobasidium pullulan, culturing medium and method for producing β-glucan, a culture of Aureobasidium pullulan and a composition comprising the same,” US 9,938,550 Bl, 2018.

[18] R. Singh *et al.*, “Production of Pullulan from a high yielding strain of Aureobasidium pullulan in non-stirred flask-type fermentation system,” *J. Microbiol. Biotechnol. Res.*, vol. 7, no. 1, p. 26, 2017, doi: 10.24896/jmbr.2017715.

[19] K.L. Yadav, D.K. Rahi, and S.K. Soni, “An indigenous hyperproductive species of Aureobasidium pullulan RYLF-10: Influence of fermentation conditions on exopolysaccharide (EPS) production,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, doi: 10.1007/s12010-013-0630-3.

[20] Đ.T.H. Thu, V.V. Hạnh, N.T. Nguyệt, and N.T.Q. Mai, "Phân lập, chọn lọc và nghiên cứu điều kiện lên men thích hợp của chủng giả nấm men sinh tổng hợp polysaccharide ngoại bào," *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc*, pp. 1136–1141, 2022.

[21] M.S. Kim, J. Kim, M.J. Ryu, S.H. Oh, K.H. Kim, and K. Hwang, "Optimization of β-1,3/1,6-glucan production of aureobasidium pullulan KSY-0516 strain," *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 2017, doi: 10.3746/jkfn.2017.46.12.1568.

[22] N. Moriya *et al.*, "Improved β-glucan yield using an Aureobasidium pullulan M-2 mutant strain in a 200-L pilot scale fermentor targeting industrial mass production," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2013, doi: 10.1007/s12257-013-0516-9.

Thông tin liên hệ: **Hoàng Thị Ngọc Anh**

Điện thoại: 0972839836 - Email: ngocanhhoang2412@gmail.com

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