

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT LEVAN TỪ *BACILLUS SUBTILIS* NATTO D

Vũ Kim Dung¹, Hồ Thị Thủy², Nguyễn Thị Nhân³

^{1,2,3}Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Levan là hợp chất exopolysaccharide được tổng hợp từ nhiều loại vi sinh vật, có độ kết dính mạnh, khả năng tương thích sinh học tốt, chống ung thư và khả năng tạo màng. Ngoài ra, levan còn làm giảm cholesterol và điều hòa miễn dịch. Levan được tổng hợp từ một số loại vi khuẩn trên môi trường có thành phần chính là sucrose. Nghiên cứu này nhằm tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp levan từ *Bacillus subtilis* natto D bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Trong điều kiện khảo sát ảnh hưởng của đơn yếu tố, hàm lượng levan thu được cao nhất (74,56 g/l) trên nguồn carbon sucrose với nồng độ 225 g/l, pH 6 ở nhiệt độ 37°C thời gian lên men 21 giờ và tốc độ lắc 200 vòng/phút. Bằng việc sử dụng phần mềm Design-Expert 7.15 và quy hoạch thực nghiệm bậc 2 Box-Benken với 3 nhân tố nghiên cứu pH (5 – 7), nhiệt độ (33 – 41°C) và thời gian (15 – 27 giờ), đã xác định được điều kiện tối ưu sinh tổng hợp levan cao nhất đạt 80,83 g/l với điều kiện nuôi cấy: pH 7, nhiệt độ 40°C và thời gian 24,6 giờ. Hàm lượng levan tăng 6,27 g/l trong khi lượng sucrose vẫn giữ nguyên (225 g/l) so với trước khi tối ưu.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, Levan, polymer, sinh tổng hợp, tối ưu.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Levan là polymer của fructose được tạo ra bởi liên kết β - (2 - 6) fructo – furanosidic (Ki-Hyo J. và cộng sự, 2001; Mardo K. và cộng sự, 2014). Các vi sinh vật có khả năng tổng hợp levan gồm: *Lactobacillus gasseri*, *B. circulans*, *E.amylovora*, *Seraria* sp., *Acetobacter xylinum* NCI 1005, *Z. mobilis* và *B. subtilis* (Anwar M.A. và cộng sự, 2010; Devi G.K. và Alamu A., 2013; Oliveira M.R. và cộng sự, 2007). Levan là polysaccharide ngoại bào được tổng hợp từ vi khuẩn trên môi trường có thành phần chính là sucrose. Do các vi khuẩn này có khả năng sinh tổng hợp levansucrase để chuyển hóa sucrose thành levan (Mardo K. và cộng sự, 2014). Trong đó chủng *B. subtilis* (natto) có khả năng sinh tổng hợp levan cao hơn cả với 40 g/l trên môi trường có chứa 200 g/l sucrose (Shih I.L. và cộng sự, 2005). Nhưng nhìn chung, hiệu suất thu levan từ các nguồn vi sinh vật chưa cao.

Các nghiên cứu chỉ ra levan có khả năng chống ung thư (Calazans và cộng sự, 2000; Yoo và cộng sự, 2004). Levan sản xuất từ *Microbacterium laevaniformans*, *Rahnella aquatilis* và *Zymomonas mobilis* có khả năng chống lại tám dòng khác nhau của tế bào ung thư (El-Safty M.M. và cộng sự, 2012). Nhiều

nghiên cứu về levan đã được thúc đẩy bởi vai trò của chúng trong điều trị sâu răng (S.A. Aridson và cộng sự, 2006) và làm giảm cholesterol (Yamamoto Y. và cộng sự, 1999), điều hòa các hoạt động miễn dịch trong cơ thể (Calazans G.M.T. và cộng sự 1997; Yamamoto Y. và cộng sự, 1999). Levan có thể được sử dụng để sản xuất DFA IV (di - D - fructose - 2,6: 6.2 - dianhydride) với độ ngọt bằng một nửa độ ngọt của sucrose và có tính ổn định. Vì vậy, levan được ứng dụng như một chất làm ngọt trong các sản phẩm sử dụng cho bệnh nhân tiểu đường (Jaecho C. và cộng sự, 2001).

Trong vài thập kỷ qua, một số nghiên cứu tối ưu điều kiện nuôi cấy các chủng vi khuẩn để tăng cường khả năng tổng hợp levan đã được thực hiện. Oliveira M.R. và cộng sự (2007) tiến hành tối ưu điều kiện nuôi cấy *Zymomonas mobilis* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt với 2 nhân tố thay đổi, thu được hàm lượng levan cao nhất 21,68 g/l. Santos L.F.D. và cộng sự (2013) cũng tối ưu điều kiện nuôi cấy *Bacillus subtilis* NATTO bằng phương pháp này cho hàm lượng levan đạt 111,6 g/l với nồng độ sucrose (400 g/l) và thời gian nuôi 16 giờ.

Hiện nay, levan đang được rất nhiều nhà khoa học và sản xuất quan tâm bởi các đặc tính

vượt trội như: khả năng hòa tan tốt trong dầu và nước, độ kết dính mạnh, khả năng tương thích sinh học tốt, chống ung thư và khả năng tạo màng (Santos L.F.D. và cộng sự, 2013). Vì vậy, levan được ứng dụng trong mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm (Jaecho C. và cộng sự, 2001; Santos L.F.D. và cộng sự, 2013). Tuy nhiên, cho đến nay các sản phẩm chứa levan còn rất ít do sản lượng lên men thấp. Vì thế, nghiên cứu tìm kiếm chủng, tăng cao năng suất chủng, đáp ứng sản xuất trên quy mô công nghiệp và tạo ra các sản phẩm tăng cường sức khỏe con người là vấn đề cấp thiết hiện nay.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* natto D từ bộ sưu tập giống của bộ môn Công nghệ vi sinh – hóa sinh do Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp - Đại học Lâm nghiệp cung cấp.

Môi trường L1 (cao thịt 3 g/l, peptone 5 g/l) được sử dụng để hoạt hóa *B. subtilis* natto D. Môi trường nhân giống (L2): cao thịt (3 g/l), peptone (1,5 g/l), NaCl (5 g/l). Môi trường cơ bản (MTCB): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g/l), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (3 g/l), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (3 g/l).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng sinh tổng hợp levan (Santos L.F.D. và cộng sự, 2013; Szwengiel A. và cộng sự, 2004; Shih I.L. và cộng sự, 2005)

Chủng *B. subtilis* natto D được hoạt hóa trên môi trường L1 qua đêm, sau đó nhân giống trên môi trường L2 nuôi ở 37°C trong 48 giờ và lắc với tốc độ 150 vòng/phút.

Sau khi hoạt hóa, vi khuẩn được cấy 5% (v/v) vào bình 250 ml chứa 100 ml môi trường sinh tổng hợp levan với các thông số nghiên cứu:

Nguồn cacbon: được khảo sát trên các nguồn lactose, maltose, sucrose, glucose, tinh bột nồng độ 20% (w/v). Chủng được nuôi lắc ở 180 vòng/phút, 37°C ở pH 7 trong 21 giờ.

Nồng độ sucrose: được khảo sát ở các nồng

độ 150 - 300 g/l (tương ứng với 15 - 30% (w/v)) với tốc độ lắc 180 vòng/phút, pH 7, sau 21 giờ nuôi ở 37°C mẫu được lấy để đánh giá hàm lượng levan.

Giá trị pH ban đầu: được khảo sát ở các giá trị 5 - 9. Các thông số khác được giữ ở tốc độ lắc 180 vòng/phút, 37°C trong 21 giờ và nồng độ sucrose 22,5% (w/v).

Nhiệt độ: được thử nghiệm với các nhiệt độ 25 - 41°C trong môi trường bổ sung sucrose 22,5% (w/v) và pH 6, tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 21 giờ.

Thời gian nuôi cấy: được khảo sát ở các thời điểm 10,5 - 52,5 giờ, khi nuôi chủng thí nghiệm trong môi trường có bổ sung sucrose 22,5% (w/v) và pH 6, tốc độ lắc 180 vòng/phút.

Tốc độ lắc: chủng được nuôi theo các điều kiện thích hợp tìm được ở trên, với các tốc độ lắc 160 - 240 vòng/phút, sau 21 giờ mẫu canh trường được lấy và xác định hàm lượng levan.

2.2.2. Tối ưu hóa các điều kiện môi trường sinh tổng hợp levan (Santos L.F.D. và cộng sự (2013), Oliveira M.R. và cộng sự (2007))

Nghiên cứu tối ưu hóa sinh tổng hợp levan theo phương pháp bề mặt đáp ứng, sử dụng phần mềm Design-Expert 7.15. Ma trận thực nghiệm bao gồm 17 thí nghiệm với khoảng chạy của 3 yếu tố khảo sát: pH (5 - 7), nhiệt độ (33 - 41°C) và thời gian (15 - 27 giờ).

Quá trình sinh tổng hợp levan được tiến hành theo phương pháp nuôi cấy trong bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường có bổ sung sucrose 22,5% (w/v), tỉ lệ giống cấy 5% (w/v) và tốc độ lắc 180 vòng/phút. Sau đó, thu và xác định hàm lượng levan.

2.2.3. Thu nhận và xác định hàm lượng Levan (Santos L.F.D. và w, 2013)

Sau khi lên men, tiến hành ly tâm loại bỏ sinh khối tế bào và thu nhận dịch canh trường chứa levan. Levan được thu nhận bằng phương

pháp kết tủa dung môi hữu cơ (ethanol 96°) theo tỉ lệ V dịch chiết levan: V dung môi là 1:3, ủ hỗn hợp ở 4°C trong 60 phút, ly tâm 13000 vòng/phút, thu kết tủa. Để cặn khô tự nhiên và xác định hàm lượng levan trong kết tủa thu được.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu: Các kết quả thí nghiệm được xử lý và đánh giá bằng phần mềm Excel 5.0.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới sinh tổng hợp levan

3.1.1. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Tiến hành nuôi chủng *B. subtilis* natto D trong môi trường cơ bản có bổ sung 5 nguồn carbon khác nhau với hàm lượng 20% (w/v). Kết quả bảng 1 cho thấy môi trường bổ sung thành phần đường sucrose thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp levan. Do *B. subtilis* có khả năng sinh tổng hợp levansucrase để chuyển hóa sucrose thành levan (Mardo K. và cộng sự,

2014) nên khi bổ sung sucrose vào môi trường cơ bản (MTCB), hàm lượng levan trong dịch môi trường nuôi cấy cao hơn nhiều lần (43,0 g/l) so với các nguồn carbon khác (maltose 4,64 g/l, lactose 4,5 g/l). Với nguồn cacbon tinh bột, lượng levan sinh ra không đáng kể (0,25 – 0,5 g/l). MTCB bổ sung nguồn carbon là đường glucose, chủng *B. subtilis* natto D không đồng hóa loại đường này để sinh tổng hợp levan. Shih I.L. và cộng sự (2005) đã công bố rằng khi nuôi cấy chủng *B. subtilis* (Natto) Takahashi trong môi trường nuôi cấy có bổ sung nguồn cacbon sucrose thì khả năng sinh tổng hợp levan là cao hơn so với các nguồn carbon khác (40 g/l, gấp 2 lần so với sử dụng fructose làm nguồn cacbon).

Như vậy, đối với chủng *B. subtilis* natto D thì nguồn sucrose có khả năng kích thích sử dụng và đồng hóa để sinh tổng hợp levan cao, còn các nguồn carbon khác hàm lượng levan tạo ra là không đáng kể hoặc không thể tạo ra.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nguồn carbon trong môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp levan từ *B. subtilis* natto D

Nguồn carbon	Hàm lượng levan (g/l)				
	Lactose	Maltose	Sucrose	Glucose	Tinh bột
	4,50 ± 0,14	5,64 ± 0,22	43,0 ± 1,20	0	0,50 ± 0,01

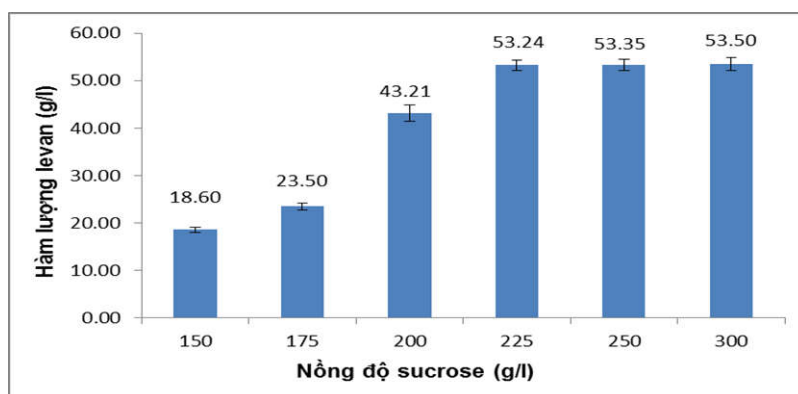
3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ sucrose

Nồng độ sucrose trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh tổng hợp levan. Khi bổ sung vào MTCB nguồn sucrose tăng từ 150 - 300 g/l, hàm lượng của levan thu được tăng dần. Khi tăng lượng sucrose đến mức 225 g/l thì hàm lượng levan đạt 53,24 g/l, tiếp tục tăng nồng độ sucrose lên tới 250 - 300 g/l thì hàm lượng levan thu được không tăng thêm (hình 1). Với chủng *B. subtilis* natto D, hàm lượng levan thu được cao hơn một số công bố như: Szwengiel A. và cộng sự (2004), Shih I.L. và cộng sự (2005) đã nuôi cấy *B. subtilis* DSM 347 và *B. subtilis* (Natto)

Takahashi trên môi trường có sucrose (150 - 200 g/l) thu được levan với hàm lượng 35 - 40 g/l.

Abdel-Fattah và cộng sự (2005) cho biết nồng độ đường trên 10% có thể gây ra những vấn đề về sự tăng trưởng của vi khuẩn này trong môi trường có độ nhớt cao gây ra bởi polymer. Tuy nhiên, việc sử dụng 30% sucrose của *B. subtilis* natto D, trong nghiên cứu này, không can thiệp vào sự phát triển của vi khuẩn trong môi trường và sản xuất levan với hàm lượng cao.

Như vậy lựa chọn nồng độ sucrose 225 g/l (22,5%) cho các nghiên cứu tiếp theo.



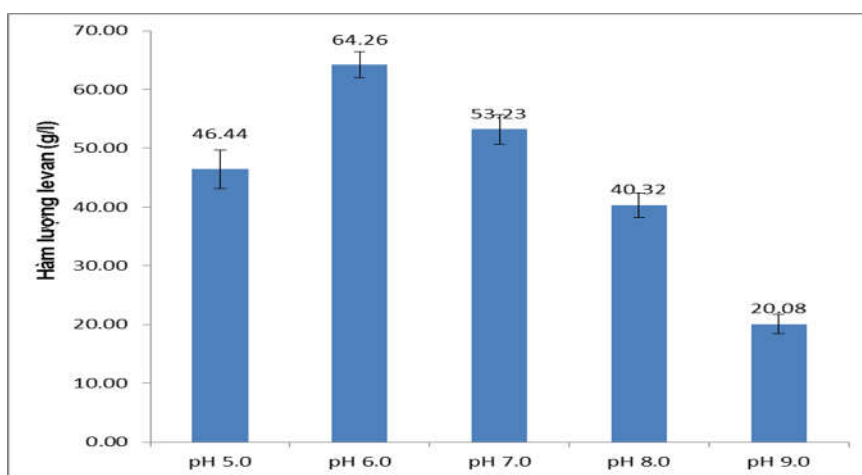
Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ sucrose trong môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp levan từ *B. subtilis* natto D

3.1.3. Ảnh hưởng của pH ban đầu

pH là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới quá trình tăng trưởng của tế bào vi khuẩn cũng như khả năng sinh tổng hợp levan của *B. subtilis* natto D. Thí nghiệm nhằm khảo sát sự ảnh hưởng của điều kiện pH giúp vi sinh vật tổng hợp levan với hàm lượng cao được thực hiện trên môi trường cơ bản chứa sucrose nồng độ 225 g/l và pH 5 – 9.

Qua hình 2 cho thấy, khoảng pH thích hợp để

B. subtilis natto D sinh tổng hợp levan cao là 5 - 8. Tuy nhiên, kết quả cho thấy ở pH = 6 thì lượng levan thu được là cao nhất 64,26 g/l. Kết quả này khác với giá trị pH = 7 khi nuôi cấy *B. subtilis* của các tác giả khác để thu được hàm lượng levan cao nhất. Szwengiel A. và cộng sự (2004) nuôi cấy *B. subtilis* DSM 347 trên môi trường có pH 6,8 còn Shih I.L. và cộng sự (2005) đã sinh tổng hợp levan từ chủng *B. subtilis* (Natto) Takahashi ở pH 7. Do đó, lựa chọn pH 6 cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo.

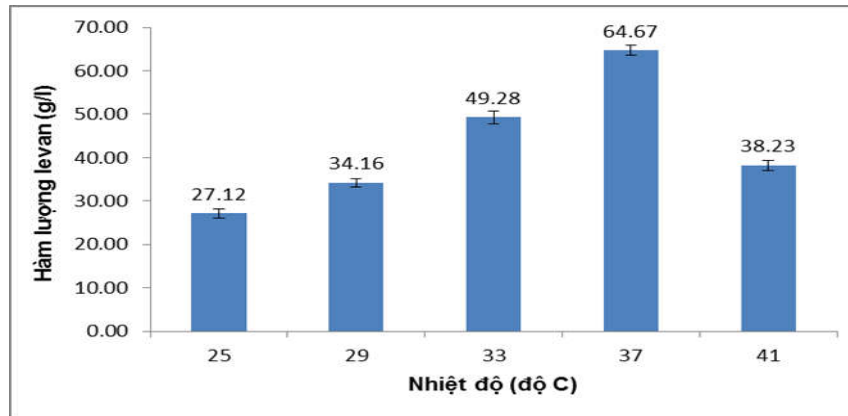


Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh tổng hợp Levan từ *B. subtilis* natto D

3.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng mạnh mẽ đến tốc độ tăng trưởng cũng như khả năng sinh tổng hợp các chất của đa số các loài vi sinh vật. Vi khuẩn *Bacillus* hầu hết là loại ưa nhiệt trung bình với khoảng nhiệt độ dao động từ 25

– 41°C. Tiến hành thực hiện thí nghiệm nghiên cứu sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh levan từ chủng *B. subtilis* natto D bằng cách nuôi vi khuẩn trên môi trường chứa sucrose 22,5% (w/v) và điều chỉnh pH ban đầu đến pH = 6 ở các nhiệt độ 25 - 41°C.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp levan từ *B. subtilis* natto D

Kết quả ở hình 3 cho thấy, ở các nhiệt độ khác nhau khả năng sinh tổng hợp levan của chủng vi khuẩn *B. subtilis* natto D trong môi trường nuôi cấy rất khác nhau. Hàm lượng levan thu được cao khi vi khuẩn được nuôi cấy trong khoảng nhiệt độ từ 33 – 41°C và cao nhất là ở 37°C (64,67 g/l).

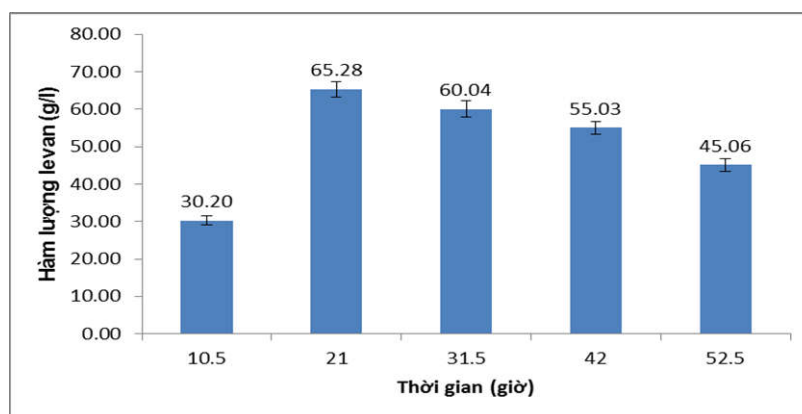
Nhiệt độ 35 - 37°C là nhiệt độ thích hợp cho sự sinh trưởng của *B. subtilis* nói chung và sinh tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất từ chủng này nói riêng, do đó, lựa chọn nhiệt độ 37°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh tổng hợp levan của chủng *B. subtilis* natto D. Qua số liệu thu được ở hình 4 cho thấy, khối lượng levan thu được cao nhất khi nuôi trong 21 giờ (65,28 g/l). Khi thời gian nuôi cấy tăng 10,5 giờ đến 21 giờ hàm lượng levan tăng, nhưng khi tiếp tục tăng thời gian nuôi lên thì hàm

lượng levan không tăng mà có xu hướng giảm dần, thấp nhất 45,06 g/l sau 52,5 giờ. Do vậy, để tiết kiệm năng lượng đề tài lựa chọn thời gian 21 giờ cho nuôi cấy thu nhận levan từ chủng *B. subtilis* natto D.

Đã có nhiều công bố khác nhau về ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp levan từ vi khuẩn (Santos L.F.D. và cộng sự, 2013; Shih I.L. và cộng sự, 2005; Szwengiel A. và cộng sự, 2004...). Khi nghiên cứu tìm điều kiện nuôi cấy để sinh levan cao từ vi khuẩn thì thời gian nuôi cấy càng kéo dài thì hàm lượng levan thu được càng tăng. Sau 10 ngày nuôi cấy thì tất cả các chủng vi khuẩn được thử nghiệm đều sản xuất levan ở mức độ tương tự nhau từ 42 - 52 (g/l). Tuy nhiên, đối với việc sinh tổng hợp levan từ *B. subtilis* natto D thì thời gian được rút ngắn hơn (21 giờ) nhưng vẫn cho kết quả cao, phù hợp với nhu cầu cũng như quy mô sản xuất công nghiệp cần hướng đến.



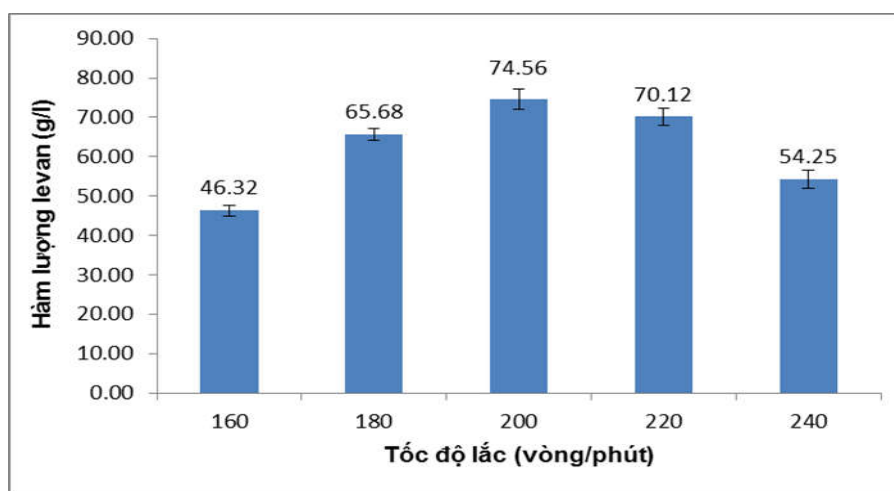
Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp levan

3.1.6. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Tốc độ lắc có vai trò khá quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển đối với các chủng vi khuẩn hiếu khí. Tốc độ lắc góp phần phân bố đều mật độ vi sinh vật và cung cấp đủ lượng oxy cho vi sinh vật sử dụng do đó tốc độ lắc có ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp levan của chủng *B. subtilis* natto D. Kết quả hình 5 cho thấy hàm lượng levan cao nhất ở

tốc độ lắc 200 vòng/phút (74,56 g/l).

Khi tốc độ lắc thấp 160 vòng/phút hàm lượng levan ít (46,32 g/l). Khi tốc độ lắc quá cao 240 vòng/phút hàm lượng levan thu được thấp (54,25 g/l). Do vậy lựa chọn tốc độ lắc 200 vòng/phút cho quá trình sinh tổng hợp levan của chủng *B. subtilis* natto D trên môi trường cơ bản bổ sung sucrose 225 g/l, ở pH 6, nhiệt độ 37°C, thời gian 21 giờ.



Hình 5. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng sinh tổng hợp levan

3.2. Tối ưu điều kiện sinh tổng hợp levan

Mục đích của nghiên cứu là tìm sự tương tác đồng thời của các yếu tố ảnh hưởng tới sinh tổng hợp levan, nhằm xác định môi trường tối ưu cho hàm lượng levan cao nhất. Với 17 thí nghiệm được thiết kế bằng phần mềm tối ưu (bảng 2), hàm lượng levan thu được thấp nhất 51 g/l (thí nghiệm số 3) và cao nhất 79 g/l (thí nghiệm số 8).

Kết quả phân tích phương sai (bảng 3) cho thấy cả 3 yếu tố pH, nhiệt độ và thời gian đều ảnh hưởng mạnh đến quá trình sinh tổng hợp levan. Giá trị F của mô hình là 23,61 với $p = 0,0002$ ($p < 0,05$) nên dạng mô hình đã lựa chọn là đúng. Giá trị p của “Không tương thích” là 0,2558 ($p > 0,05$) cho thấy mô hình này tương hợp với thực nghiệm. Phương trình

hồi quy biểu hiện hàm lượng levan mô tả ảnh hưởng của các yếu tố độc lập (X_1 – pH, X_2 – nhiệt độ, X_3 – thời gian) và các mối tương tác giữa chúng được biểu diễn như sau:

$$\text{Hàm lượng Levan} = +69,80 + 6,38X_1 + 4,25X_2 + 3,38X_3 + 7,25X_1X_2 + 6,00X_1X_3 - 1,75X_2X_3 - 4,40X_1^2 - 4,15X_2^2 - 2,40X_3^2$$

Sử dụng phương pháp hàm kì vọng để tối ưu hoá quá trình nuôi cấy thu nhận levan bằng phần mềm Design-Expert. Kết quả tìm được 43 phương án thí nghiệm trong đó phương án tốt nhất để cực đại hàm mục tiêu dự đoán là: pH 7; nhiệt độ 40°C và thời gian 24,6 giờ. Khi đó, hàm lượng levan đạt được trong các điều kiện theo tính toán là 81,02 g/l. Kết quả này có độ tương thích cao so với kiểm tra bằng thực nghiệm (pH 7; 40°C; 24,5 giờ; hàm lượng levan đạt 80,83 g/l).

Bảng 2. Ma trận thực nghiệm Box-Behnken và hàm lượng levan thu được

TT	pH	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Hàm lượng levan (g/l)	TT	pH	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Hàm lượng levan (g/l)
1	5	33	21	60	10	6	41	15	67
2	7	33	21	57	11	6	33	27	63
3	5	41	21	51	12	6	41	27	71
4	7	41	21	77	13	6	37	21	68
5	5	37	15	59	14	6	37	21	69
6	7	37	15	61	15	6	37	21	70
7	5	37	27	53	16	6	37	21	73
8	7	37	27	79	17	6	37	21	69
9	6	33	15	52					

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai mô hình tối ưu bằng phần mềm DX7.1.5

Thông số	Phương sai	Chuẩn F	Mức có nghĩa p	Thông số	Phương sai	Chuẩn F	Mức có nghĩa p
Mô hình	124,98	23,61	0,0002	X ₂ .X ₃	12,25	2,31	0,1720
X ₁	325,13	61,43	0,0001	X ₁ ²	81,52	15,40	0,0057
X ₂	144,50	27,30	0,0012	X ₂ ²	72,52	13,70	0,0076
X ₃	91,13	17,22	0,0043	X ₃ ²	24,25	4,58	0,0696
X ₁ .X ₂	210,25	39,72	0,0004	Không tương thích	7,42	2,00	0,2558
X ₁ .X ₃	144,00	27,21	0,0012				

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã xác định được điều kiện môi trường tối ưu cho sinh tổng hợp levan của chủng *B. subtilis* natto D (80,83 g/l) bao gồm: sucrose (225 g/l), pH 7, nhiệt độ 40°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút và thời gian 24,5 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdel-Fattah A., Mahmoud D., Esawy M. (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Curr Microbiol*, (51), pp. 402 - 407.
2. Anwar M.A., Kralj S., Pique A.V., Leemhuis H., van der Maarel M.J.E.C., Dijkhuizen L. (2010). Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: Characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology-Sgm*, 156(4), pp. 1264-1274. DOI: 10.1099/mic.0.036616-0.
3. Devi G.K. & Alamu A. (2013). Production of Biopolymer Levan by *Bacillus subtilis* using Non-Ionic Surfactants. *Asian J. Pharm. Tech*, 3, pp. 37 - 41.
4. Jaecho C., Hee P.N., Jae Y.S. & Ho L.T. (2001). Molecular and enzymatic characterization of levan fructotransferase from *Microbacterium sp.* AL - 210. *J Biotechnol*, 91, pp. 49 - 61.

5. Ki-Hyo J., Ki-Bang S., Chul H.K., Bong H.C., Soon A.K., Uck-Han C., Ryo W.C., Sang-Ki R. (2001). Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett*, 23, pp. 339 - 344.

6. Mardo K., Visnapuu T., Gromkova M., Aasamets A., Viigand K., Vija H., Alamäe T. (2014). High-throughput assay of levansucrase variants in search of feasible catalysts for the synthesis of fructooligosaccharides and levan. *Molecules* 19, pp.8434-8455; doi:10.3390/molecules19068434.

7. Oliveira M.R., Silva R.S., Buzato J.B. & Celligol M.A.P.C (2007). Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low - cost carbohydrate sources. *Biochem Eng J*, 37, pp. 177 - 183.

8. Santos L.F.D., Melo F., Paiva W.J.M., Borsato D., Dasilva M. & Celligoi M. (2013). Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* (Natto). *Rom Biotech Lett*, 18, pp. 8413 - 8422.

9. Shih I.L., Yu Y.T., Shienh C.J. & Hsien C.Y. (2005). Selective Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi. *J. Agric. Food Chem*, 53 (21), pp. 8211 - 8215.

10. Szwengiel A., Czarnecka M., Roszyk H. & Czarnecki Z. (2004). Levan production by *Bacillus subtilis* DSM 347 strain. *Food Sci Technol Int*, 2, pp. 7 - 12.

LEVAN PRODUCTION BY *BACILLUS SUBTILIS* NATTO D STRAIN

Vu Kim Dung¹, Ho Thi Thuy², Nguyen Thi Nhan³

Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

Levan is an exopolysaccharide compound synthesized from a variety of microorganisms. Levan has strong adhesion, good biocompatibility, anti-cancer and film forming ability. In addition, levan also lowers cholesterol and regulates immunity. Levan is synthesized from several types of bacteria when cultured in high concentrations of sucrose. Research was carried out to optimize levan biosynthesis from *Bacillus subtilis* natto D by surface-response method. Under the conditions of single factor analysis, the levan content was highest (74.56 g/l) with sucrose at 225 g/l, pH 6 at 37°C, fermentation time of 21 hours and shake rate of 200 rpm. By using Design-Expert 7.15 software and Box-Benken Experimental Design with 3 factors of pH (5 - 7), temperature (33 - 41°C) and time (15 - 27 hours) The optimum conditions for levan biosynthesis were determined at 80.83 g/l with culture conditions: pH 7, 40°C and 24.6 hours. The levan content increased by 6.27 g/l while sucrose remained the same (225 g/l) compared to prior optimization.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Levan, optimization, polymer, production.

Ngày nhận bài : 17/8/2017

Ngày phản biện : 25/9/2017

Ngày quyết định đăng : 05/10/2017