

Sàng lọc môi trường nuôi cấy và điều kiện lên men tối ưu cho sinh tổng hợp transglutaminase của chủng *Streptomyces* sp. TG1G1

Võ Nguyễn Thanh Thảo^{1,2}, Nguyễn Thành Vũ¹, Nguyễn Thị Dung¹, Bùi Lê Khả Tú¹, Nguyễn Đặng Phước Ngọc³, Trần Quốc Tuấn^{2*}

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, 2374 quốc lộ 1A, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/6/2023; ngày chuyển phản biện 2/6/2023; ngày nhận phản biện 19/6/2023; ngày chấp nhận đăng 9/7/2023

Tóm tắt:

Transglutaminase từ vi sinh vật (MTGase) xúc tác tạo ra liên kết isopeptide giữa nhóm γ -carboxamide của gốc glutamine là chất cho acyl và nhóm ε -amine của các hợp chất khác nhau như là chất nhận làm thay đổi cấu trúc protein. Mục tiêu của nghiên cứu là lựa chọn môi trường nuôi cấy phù hợp và tối ưu hóa điều kiện lên men nhằm tăng hoạt tính transglutaminase của chủng *Streptomyces* sp. TG1G1. Nghiên cứu tiến hành theo các công thức môi trường khác nhau, sau đó các giá trị tối ưu điều kiện lên men bao gồm pH, nhiệt độ và thời gian cũng được khảo sát. Kết quả cho thấy, hoạt tính MTGase cao nhất được ghi nhận ở môi trường chứa peptone (1%), cao nấm men (0,2%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2%), KH_2PO_4 (0,4%), Na_2HPO_4 (0,5%), bột đậu nành (1,5%), tinh bột khoai tây (1,5%), glucose (0,5%). Hoạt tính MTGase đạt mức cao nhất (43,6 mU/ml) với điều kiện nuôi ở pH 7,5, nhiệt độ 30°C trong 4 ngày. Hoạt tính MTGase tăng lên khi môi trường nuôi cấy chứa hỗn hợp ba nguồn carbon gồm bột đậu nành, tinh bột khoai tây và glucose. Trong nghiên cứu đã đưa ra điều kiện nuôi cấy và yếu tố môi trường phù hợp cho chủng *Streptomyces* sp. TG1G1 sinh tổng hợp transglutaminase.

Từ khóa: môi trường lên men, phương pháp đáp ứng bề mặt, *Streptomyces*, tối ưu hóa điều kiện, transglutaminase từ vi sinh vật.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.8

Screening the culture medium and optimal fermentation conditions for the production of transglutaminase by the *Streptomyces* sp. strain TG1G1

Nguyen Thanh Thao Vo^{1,2}, Thanh Vu Nguyen¹, Thi Dung Nguyen¹, Le Kha Tu Bui¹, Dang Phuoc Ngoc Nguyen³, Quoc Tuan Tran^{2*}

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, 2374 Highway 1A, Quarter 2, Trung My Tay Ward, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, 277 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

³International University, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 1 June 2023; revised 19 June 2023, accepted 9 July 2023

Abstract:

Microbial transglutaminase (MTGase) catalyses the creation of isopeptide bonds between the γ -carboxamide group of the glutamine residues as acyl donors and the ε -amine group of different compounds as a receptor that modifies protein structure. This research objective was to improve the transglutaminase activity produced by a strain of *Streptomyces* sp. TG1G1 by choosing an appropriate medium and optimising fermentation conditions. The study started with screening different media formulations and then various fermentation conditions, including pH, temperature, and time for optimal MTGase production. The findings of these studies revealed that the maximum MTGase activity was shown in the medium composed of peptone (1%), yeast extract (0.2%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2%), KH_2PO_4 (0.4%), Na_2HPO_4 (0.5%), soybean powder (1.5%), potato starch (1.5%), and glucose (0.5%). MTGase activity reached the highest level (43.6 mU/ml) under the following culture conditions: pH 7.5, temperature of 30°C, for 4 days of culture. In addition, MTGase activity increased when the culture medium contained three carbon sources, including soybean meal, potato starch, and glucose. These results propose appropriate culture conditions and medium factors for transglutaminase biosynthesis of *Streptomyces* sp. strain TG1G1.

Keywords: conditions optimisation, fermentation environment, microbial transglutaminase, response surface methodology, *Streptomyces*.

Classification numbers: 1.6, 2.8

*Tác giả liên hệ: Email: trqtuan@hcmus.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Transglutaminase (EC 2.3.2.13; protein-glutamine γ -glutaminyltransferase) là một nhóm enzyme xúc tác cho phản ứng chuyển acyl, hình thành liên kết cộng hoá trị giữa nhóm ε -amino của lysine gắn với protein hoặc peptide và nhóm γ -carboxamide của glutamine gắn với protein hoặc peptide [1]. Từ đó, cấu trúc của protein được cải thiện thông qua các liên kết ngang được hình thành trong hoặc giữa các phân tử, giúp thay đổi các đặc tính của protein [1, 2]. Do đó, transglutaminase được ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp chế biến thực phẩm, với mục đích phát triển và cải thiện đặc tính chức năng protein có trong các sản phẩm như tăng thời hạn sử dụng, tăng giá trị dinh dưỡng cũng như cải thiện độ nhớt, độ đàn hồi và khả năng giữ nước [1, 2].

Transglutaminase có trong các mô tế bào động vật, thực vật và vi sinh vật. Do quy trình thu nhận và tinh sạch enzyme từ tế bào động vật, thực vật khá phức tạp và chỉ thu được lượng nhỏ sản phẩm nên nguồn transglutaminase từ vi sinh vật (microbial transglutaminase, MTGase) được nghiên cứu như một nguồn thay thế tiềm năng [1, 2]. Quá trình nuôi cấy vi sinh vật giúp sản xuất MTGase với số lượng lớn từ các thành phần môi trường có chi phí thấp [3]. Theo đó, tối ưu hóa quá trình lên men là cần thiết bởi vì các thành phần môi trường nuôi cấy hay các điều kiện lên men đều ảnh hưởng đến quy trình sản xuất công nghiệp [4].

Kỹ thuật được sử dụng để tối ưu hóa môi trường dựa trên việc tối ưu từng nhân tố (one-at-a-time) có ưu điểm là đơn giản và dễ thực hiện, trong đó mức độ của một yếu tố được thay đổi trong khi giữ nguyên các yếu tố khác được trình bày trên đồ thị mà không cần phải phân tích thống kê [2, 5]. Đồng thời, phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) và mô hình thực nghiệm được thiết kế theo phương pháp Box-Behnken, mô tả bằng thuật toán các mối quan hệ tồn tại giữa các điều kiện nuôi (pH, nhiệt độ và thời gian) một cách độc lập và thu nhận hàm mục tiêu là hoạt tính MTGase. Từ đó đánh giá tác động của các biến khác nhau, đồng thời thiết lập các điều kiện tối ưu của một hệ thống đa biến để đạt được các phản ứng có ý nghĩa [5]. Trong nghiên cứu này với mục tiêu thực hiện là tối ưu hóa quá trình lên men của chủng *Streptomyces* sp. TG1G1 có khả năng sinh transglutaminase để thu nhận tối đa hoạt tính enzyme.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Chủng *Streptomyces* sp. được sử dụng trong nghiên cứu có ký hiệu là TG1G1, được cung cấp từ bộ chủng *Streptomyces* sp. của Phòng Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sàng lọc môi trường tối ưu sinh MTGase

Chủng khảo sát được cấy vào môi trường tăng sinh cấp 1 (peptone 2%, cao nấm men 0,2%, KH_2PO_4 0,2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%, tinh bột tan 2%, glucose 0,5%), được

nuôi lắc ở 30°C 250 vòng/phút trong 3 ngày. Sau đó, sinh khối cấp 1 được chuyển vào môi trường khảo sát (tỷ lệ cấy 10%) và lên men trong 4 ngày với cùng điều kiện. Sau đó tiến hành ly tâm (7.500 vòng/phút) trong 15 phút ở 4°C thu dịch nổi chứa enzyme thô. Xác định hoạt tính enzyme cùng điều kiện để lựa chọn môi trường thích hợp để thu được MTGase có hoạt tính cao. Năm môi trường khác nhau được khảo sát, thay đổi nguồn carbon và nitơ với mục đích tìm ra công thức phù hợp để tổng hợp transglutaminase với năng suất cao. Các thành phần của môi trường lên men được tham khảo từ các nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần của các môi trường khảo sát.

Môi trường	Nguồn carbon	Nguồn nitơ	Nguồn khoáng	Tài liệu tham khảo
Môi trường A	Tinh bột khoai tây 2%, glucose 1,5%	Peptone 1,5%, bột đậu nành 2%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1% KH_2PO_4 0,5% Na_2HPO_4 0,5%	[6]
Môi trường B	Glycerol 3,12%, tinh bột tan 2%	Peptone 1,05%, cao nấm men 0,25% casein 3,84%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05% KH_2PO_4 0,2% Na_2HPO_4 0,5%	[7]
Môi trường C	Tinh bột khoai tây 2% glucose 0,2%	Bột đậu nành 1,5%, peptone 1%, cao nấm men 0,2%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2% KH_2PO_4 0,4% Na_2HPO_4 0,5%	[2]
Môi trường D	Tinh bột tan 2%	Peptone 2%, cao nấm men 0,5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2% KH_2PO_4 0,2% K_2HPO_4 0,2% CaCl_2 0,1%	[8]
Môi trường E	Tinh bột tan 2%	Peptone 2%, cao nấm men 0,2%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2% KH_2PO_4 0,2% K_2HPO_4 0,2%	[9]

2.2.2. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy sinh MTGase

Phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) và thiết kế thử nghiệm Box-Behnken được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của các thông số điều kiện nuôi cấy lên quá trình sinh tổng hợp MTGase từ chủng TG1G1. 3 yếu tố được chọn làm biến độc lập là pH (A), nhiệt độ (B), thời gian (C), mỗi yếu tố được khảo sát ở 3 mức (-1, 0, 1) với 15 nghiệm thức, trong đó có 3 thí nghiệm ở tâm, 3 lần lặp lại, hàm mục tiêu là hoạt tính enzyme MTGase (Y).

Giá trị mã hóa của các biến độc lập cho thiết kế Box-Behnken được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Giới hạn và các mức độ mã hóa của 3 yếu tố khảo sát thực nghiệm.

Các biến số	Các yếu tố khảo sát	Mức độ			Tài liệu tham khảo
		-1	0	1	
A	pH	6,5	7,5	8,5	[10]
B	Nhiệt độ (°C)	26	30	34	[2]
C	Thời gian (ngày)	2	4	6	[10]

Chỉ tiêu theo dõi: hoạt tính MTGase (Y).

2.2.3. Phương pháp đo hoạt tính MTGase

Hoạt tính MTGase được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng N-carbobenzoxy-L-glutaminyglycine (Z-Gln-Gly) làm cơ chất theo mô tả của J. Folk và cs (1996) [11]. Hỗn hợp phản ứng chứa 0,2 ml cơ chất (Z-Gln-Gly, tris buffer 1M, hydroxylamine 200 mM, CaCl₂ 1 M) ủ ở 37°C, bổ sung 0,03 ml MTGase thu được, trộn đều và ủ ở 37°C trong 10 phút. Sau đó, ngừng phản ứng bằng cách thêm 0,5 ml dung dịch TCA 12% trộn đều, tiếp tục bổ sung 0,5 ml dung dịch FeCl₃ 5%, trộn đều và ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 5 phút, đo độ hấp thụ ở bước sóng 525 nm, sử dụng L-glutamic acid γ -monohydroxamate làm chất chuẩn. Hoạt tính chung của MTGase được định nghĩa là một đơn vị MTGase tương ứng lượng enzyme gây ra sự hình thành 1 μ M L-glutamic acid γ -monohydroxamate trong một phút ở 37°C, pH 6,0. Hàm lượng protein của MTGase thu nhận được xác định bằng phương pháp Bradford [12] và hoạt tính riêng của enzyme là số đơn vị hoạt tính của enzyme trong 1 mg protein.

2.2.4. Phương pháp phân tích và xử lý

Thí nghiệm được thiết kế và phân tích thống kê bằng phần mềm Design Expert® 12.0.3 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, Mỹ). Mô hình được kiểm định thông qua kiểm định ANOVA.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Sàng lọc môi trường tối ưu sinh MTGase

Chủng TG1G1 có khả năng sinh MTGase với các nồng độ protein, hoạt tính chung và riêng khác nhau tùy thuộc vào điều kiện môi trường nuôi cấy (bảng 3). Cụ thể, môi trường C cho hoạt tính cao hơn so với các môi trường còn lại. Qua bảng 3, môi trường A và C có sự phối hợp giữa hai nguồn carbon là tinh bột khoai tây và glucose cho hoạt tính MTGase tốt hơn những môi trường chỉ sử dụng một loại carbon (tinh bột tan) như D và E. Đồng thời, nguồn carbon là glycerol phối hợp với tinh bột tan không mang lại hiệu quả tương tự như khi phối hợp giữa tinh bột khoai tây và glucose. Từ sự khác biệt này, có thể thấy, nguồn carbon từ tinh bột và nguồn nitơ là peptone giữ vai trò quan trọng trong quá trình lên men và thu nhận MTGase, để nâng cao hiệu quả thu nhận enzyme việc phối hợp giữa các nguồn carbon khác nhau vô cùng quan trọng. Kết quả tương tự như nghiên cứu của G. Bahrim và cs (2010) [13], môi trường có sử dụng bột khoai tây và glucose kích thích sinh MTGase tốt hơn các nguồn carbon đơn lẻ khác, và peptone là yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh enzyme. Ngoài ra, môi trường C phù hợp cho quá trình thu nhận MTGase với hoạt tính và độ tinh sạch của enzyme cao hơn ở các môi trường khảo sát khác, được thể hiện qua hàm lượng protein tương đối ít, giúp cho sản phẩm MTGase thu nhận có hoạt tính riêng cao hơn.

Bảng 3. Hoạt tính MTGase của chủng TG1G1 trên các môi trường khảo sát.

Môi trường	Hoạt tính chung (mU/ml)	Nồng độ protein (μ g/ml)	Hoạt tính riêng (mU/mg)
Môi trường A	38,683 $\pm$ 0,286	483,23 $\pm$ 4,01	80,054 $\pm$ 0,556
Môi trường B	36,754 $\pm$ 0,078	485,50 $\pm$ 3,88	75,709 $\pm$ 0,385
Môi trường C	40,779 $\pm$ 0,058	396,37 $\pm$ 2,88	102,94 $\pm$ 0,120
Môi trường D	38,374 $\pm$ 0,073	557,72 $\pm$ 5,59	68,809 $\pm$ 0,614
Môi trường E	32,888 $\pm$ 0,656	492,36 $\pm$ 3,01	66,797 $\pm$ 0,594

Các chữ cái trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

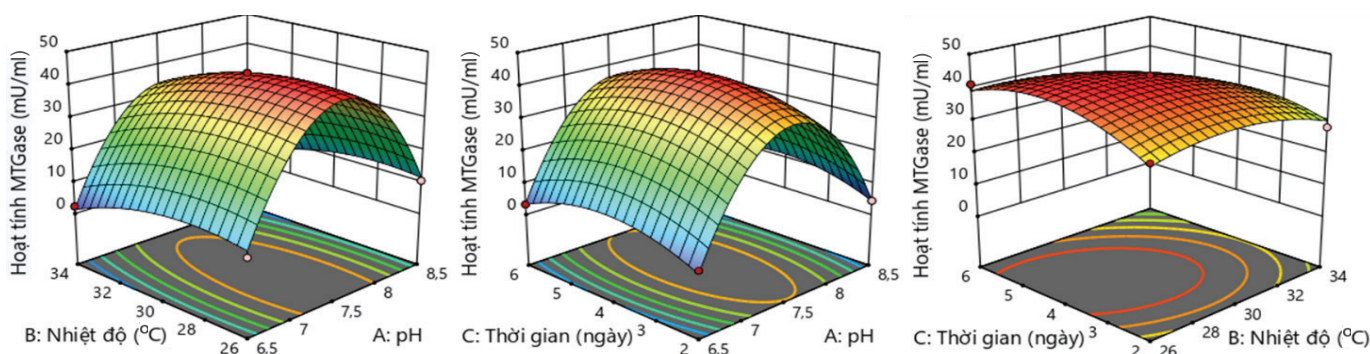
3.2. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy sinh MTGase

Theo phương pháp đáp ứng bề mặt, điều kiện nuôi cấy sinh tổng hợp MTGase từ chủng TG1G1 được thực hiện tối ưu hóa bằng cách quy hoạch thực nghiệm với ba yếu tố ảnh hưởng là pH (A), nhiệt độ (B), thời gian (C) để xác định giá trị tối ưu. Các thí nghiệm khảo sát được bố trí theo phương pháp Box-Behnken gồm 15 nghiệm thức, trong đó có 3 nghiệm thức ở tâm, mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần lặp lại và lấy kết quả trung bình, hàm mục tiêu là hoạt tính MTGase (Y). Trong nghiên cứu, khoảng tối ưu được chọn sau khi tham khảo tài liệu là pH 6,5-8,5, nhiệt độ nuôi 26-34°C và thời gian nuôi cấy 2-6 ngày, kết quả khảo sát của các nghiệm thức được trình bày chi tiết trong bảng 4.

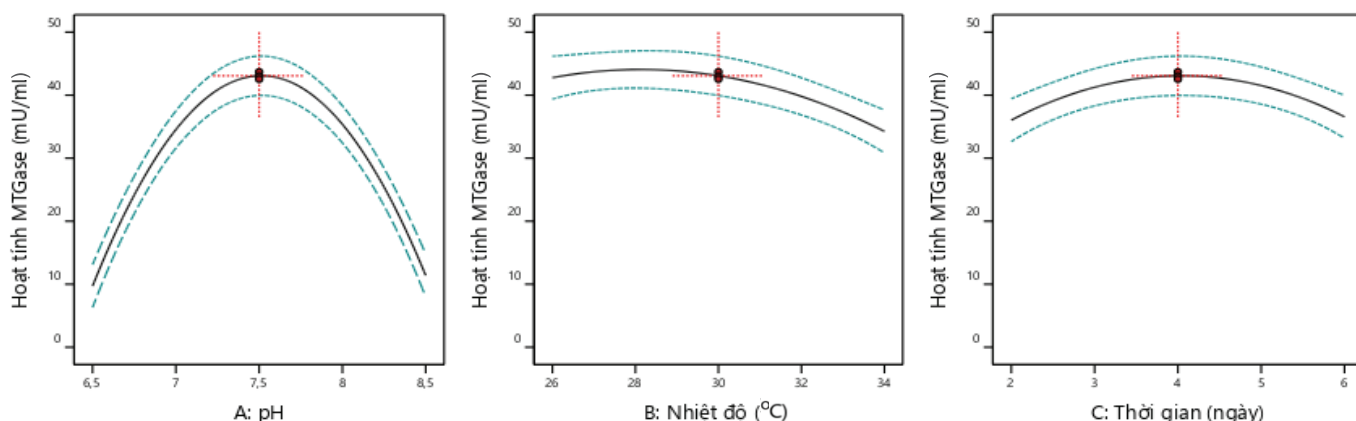
Bảng 4. Hoạt tính MTGase của TG1G1 thu nhận từ các nghiệm thức bố trí.

Số TT	Nghiệm thức	A: pH	B: nhiệt độ (°C)	C: thời gian (ngày)	Hoạt tính MTGase (mU/ml)	Giá trị dự đoán (mU/ml)
5	11	-1	0	-1	3,57918	2,61
9	7	0	-1	-1	34	32,99
10	9	0	+1	-1	28	29,97
6	13	+1	0	-1	4,41574	4,42
1	14	-1	-1	0	7,02716	9,0
3	5	-1	+1	0	2,29194	1,29
13	6	0	0	0	43,6782	43,08
14	1	0	0	0	42,9982	43,08
15	4	0	0	0	42,559	43,08
2	8	+1	-1	0	10,5	11,5
4	3	+1	+1	0	4,14702	2,17
7	2	-1	0	+1	3,2655	3,26
11	10	0	-1	+1	41	39,03
12	15	0	+1	+1	24	25,01
8	12	+1	0	+1	3,8783	4,84

Biểu đồ 3D của hàm mục tiêu hoạt tính MTGase thực nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt được thể hiện ở hình 1. Mô hình 3D thể hiện ảnh hưởng và tương tác của các biến độc lập đến quá trình sinh tổng hợp MTGase, giúp thu nhận hoạt tính MTGase cao hơn. Hình 1 và 2 cho thấy, cả 3 yếu tố pH, nhiệt độ và thời gian đều có ảnh hưởng đến quá



Hình 1. Biểu đồ 3D về ảnh hưởng của hai yếu tố đến hoạt tính MTGase. Mỗi vòng tròn mờ cho biết các giá trị dự đoán được ước tính từ phương trình thu được. Khi tác động của hai yếu tố được vẽ, yếu tố còn lại được đặt ở các giá trị trung bình như sau: 4 ngày, 30°C và pH 7,5).



Hình 2. Dự đoán sự thay đổi hoạt tính MTGase khi thay đổi các yếu tố nuôi cấy.

trình sinh tổng hợp MTGase. Hình 1 biểu đồ A-B và A-C có dạng mặt cong lồi, dốc và có đỉnh cực đại rõ ràng ở điều kiện khảo sát pH cho thấy mức độ ảnh hưởng chủ yếu đến hoạt tính MTGase thu nhận. Hai yếu tố nhiệt độ và thời gian cho thấy sự ít tương tác và ảnh hưởng lẫn nhau (biểu đồ B-C).

Kết quả thực nghiệm trên cho giá trị $R^2=0,9947$, R^2 dự đoán là 0,9177 phù hợp với R^2 hiệu chỉnh là 0,9852; với chênh lệch nhỏ hơn 0,2. Độ chính xác phù hợp đo tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu với giá trị 24,3416, lớn hơn 4 là mong muốn, cho thấy một tín hiệu thích hợp. Mô hình này có thể được sử dụng để điều hướng không gian thiết kế (bảng 5).

Bảng 5. Thống kê mức độ phù hợp của thí nghiệm.

Độ lệch chuẩn	Giá trị trung bình	Hệ số biến thiên (%)	R^2	R^2 hiệu chỉnh	R^2 dự đoán	Độ chính xác phù hợp (Adeq precision)
2,10	19,69	10,68	0,9947	0,9852	0,9177	24,3416

Kết quả phân tích ANOVA mô hình bậc hai của hàm mục tiêu đã được đánh giá bằng các chỉ số F-value và R^2 tương ứng (bảng 6). Chỉ số F-value và p-value của mô hình lần lượt là 104,74 và $p<0,05$ ($<0,0001$) cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy là 99,99%. Mức độ không tương thích (F) của mô hình là 22,51 ($p>0,05$) thể hiện sự không tương thích không đáng kể về mặt thống kê.

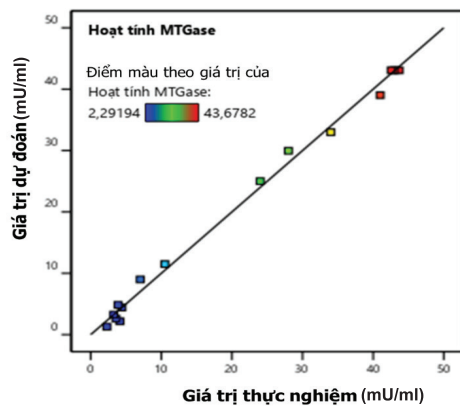
Bảng 6. Kết quả phân tích hồi quy hoạt tính MTGase thu nhận.

Các yếu tố	F-value	p-value
Mô hình	104,74	$<0,0001$
A-pH	1,3	0,3061
B-Nhiệt độ	32,85	0,0023
C-Thời gian	0,1306	0,7326
AB	0,148	0,7163
AC	0,0028	0,9596
BC	6,84	0,0473
A ²	883,51	$<0,0001$
B ²	17,37	0,0088
C ²	38,25	0,0016
Không tương thích	22,51	0,0628

Đồ thị biểu diễn các giá trị thực nghiệm so với phần dư của hoạt tính MTGase thu nhận, chứng minh tầm quan trọng của mô hình khi toàn bộ các điểm khảo sát hầu như tập trung xung quanh các đường chéo (hình 3). Phương trình hồi quy bậc hai được tính toán cho hoạt tính MTGase tối đa, sau khi loại bỏ các hệ số không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) là:

$$Y \text{ (mU/ml)} = 43,0785 - 4,26*B - 2,75*B*C - 32,53*A^2 - 4,56*B^2 - 6,77*C^2$$

trong đó: Y là hoạt tính MTGase (mU/ml), A: pH, B: nhiệt độ (°C), C: thời gian (ngày).



Hình 3. Biểu đồ giữa các giá trị thực nghiệm và dự đoán.

Phân tích phương sai được trình bày ở bảng 5, cho thấy, mô hình này có ý nghĩa. Kiểm định R^2 thực tế gần tương đương với R^2 dự đoán, chứng tỏ rằng hồi quy này có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Ngoài ra, hệ số tương quan R^2 thu được là $<0,99$ cho thấy mức độ phù hợp của mô hình.

Bảng 7. Điểm đỉnh và giá trị dự đoán của mô hình.

Các yếu tố	Ký hiệu và giá trị tối ưu	Giá trị dự đoán của mô hình	Giá trị thực tế
pH	A=7,5		
Nhiệt độ (°C)	B=30	43,079 (mU/ml)	43,078±1,035 (mU/ml)
Thời gian (ngày)	C=4		

*Giá trị trung bình của 5 lần thực nghiệm (n=5).

Kết quả bảng 7 thu được từ mô hình cho thấy, nồng độ tối ưu của 3 yếu tố khảo sát giống với giá trị tại điểm trung tâm là: pH 7,5; nhiệt độ 30°C, thời gian nuôi là 4 ngày. Hoạt tính MTGase tối đa mà mô hình dự đoán được tính toán là 43,079 mU/ml. Để xác nhận kết quả dự đoán và xác thực phương trình hồi quy thu được, các thí nghiệm sử dụng điều kiện tối ưu đã được thực hiện và thu được giá trị hoạt tính MTGase $43,078 \pm 1,035$ mU/ml (n=5), kết quả chứng minh tính phù hợp của mô hình được tạo ra. Kết quả tương tự như nghiên cứu của D.H. Eshra và cs (2016) [10] trong 4 ngày nuôi đối với cả 3 môi trường khảo sát đều cho hoạt tính MTGase tốt nhất với điều kiện nuôi tối ưu là nhiệt độ 30°C và pH 7,5.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã tìm ra thành phần môi trường và các điều kiện phù hợp cho quá trình lên men chủng *Streptomyces* sp. TG1G1 để thu được hoạt lực MTGase cao nhất. Cụ thể là môi trường C cho hoạt tính và độ tinh sạch của MTGase cao hơn so với các môi trường khảo sát khác (bao gồm: peptone 1%, cao nấm men 0,2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2%, KH_2PO_4 0,4%, Na_2HPO_4 0,5%, bột đậu nành 1,5%, tinh bột khoai tây 1,5%, glucose 0,5%). Đồng thời, nghiên cứu đã tìm ra được các thông số tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp MTGase của chủng *Streptomyces* sp. TG1G1 trong quá trình lên men áp dụng phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken. Hoạt tính MTGase tối đa đạt được là $43,078 \pm 1,035$ mU/ml khi lên men ở pH 7,5, 30°C và thời gian lên men 4 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Zhu, Q. Wu, L. Hua (2019), "Industrial enzymes", *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*, Academic Press, pp.1-13, DOI: 10.1016/B978-0-444-64046-8.00148-8.
- [2] J. Macedo, L. Sette, H. Sato (2007), "Optimisation studies for the production of microbial transglutaminase from a newly isolated strain of *Streptomyces* sp.", *Journal of Biotechnology*, **2(131)**, pp.213-214, DOI: 10.1016%2Fj.jbiotec.2007.07.384.
- [3] H.M. Moreno, M.M. Pedrosa, C.A. Tovar, et al. (2022), "Effect of microbial transglutaminase on the production of fish myofibrillar and vegetable protein-based products", *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology*, Academic Press, pp.427-436, DOI: 10.1016/B978-0-323-89929-1.00020-2.
- [4] C. Souza, F. Simone, M. Ayub (2006), "Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods", *Process Biochem*, **41(5)**, pp.1186-1192, DOI: 10.1016/j.procbio.2005.12.019.
- [5] J. Chen, X.Lan, R. Jia, et al. (2022), "Response surface methodology (RSM) mediated optimisation of medium components for mycelial growth and metabolites production of *Streptomyces alfae* XN-04", *Microorganisms*, **10(9)**, DOI: 10.3390/microorganisms10091854.
- [6] Y.N. Fawzya, D.S. Zilda, S. Chaniago (2016), "Screening of Indonesian *Streptomyces* sp. capable of secreting transglutaminase (MTGase) and optimisation of MTGase production using different growth media", *Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology*, **11(1)**, pp.13-21, DOI: 10.15578/squalen.195.
- [7] S.T. Luis, J.A. Ramirez, M. Vázquez (2004), "Production of transglutaminase by *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source", *Food Technology and Biotechnology*, **42(2)**, pp.75-81.
- [8] H. Aidaroos, G. Du, J. Chen (2011), "Microbial fed-batch production of transglutaminase using ammonium sulphate and calcium chloride by *Streptomyces hygroscopicus*", *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.*, **1(2)**, pp.173-178.
- [9] C. Bourneow, S. Benjakul, P. Sumpavapol, et al. (2012), "Isolation and cultivation of transglutaminase-producing bacteria from seafood processing factories", *Innovative Romanian Food Biotechnology*, **10**, pp.28-39.
- [10] D.H. Eshra, T.M.A. Bakr, E. Iraki (2016), "Optimization conditions for the production of microbial transglutaminase from a newly isolated strain of *Streptomyces* sp.", *International Journal of Advanced Research*, **4(5)**, pp.1722-1729, DOI: 10.21474/IJAR01/362.
- [11] J. Folk, P. Cole (1996), "Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, **122(2)**, pp.244-264, DOI: 10.1016/0926-6593(66)90066-X
- [12] J.M. Walker (2009), "The Bradford method for protein quantitation (Chapter 4)", *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, pp.17-24, DOI: 10.1385/0-89603-268-X:9.
- [13] G. Bahrim, C. Iancu, B. Nicolae, et al. (2010), "Production of a novel microbial transglutaminase using *Streptomyces* sp. polar strains", *Biotechnology*, **15(2)**, pp.5197-5203.