

NGHIÊN CỨU NÂNG CAO SINH TỔNG HỢP ĐA ENZYME (CELLULASE, α -AMYLASE VÀ GLUCOAMYLASE) TỪ CHỦNG *Aspergillus niger* A45.1 BẰNG KỸ THUẬT ĐỘT BIẾN VÀ TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN LÊN MEN XỐP

Dương Thu Hương^{1*}, Phạm Kim Đăng¹, Vũ Văn Hạnh²

¹*Khoa Chăn nuôi, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: duongthuhuong@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 17.07.2019

Ngày chấp nhận đăng: 14.11.2019

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành để cải tiến chủng nấm sợi và tối ưu điều kiện lên men xốp để nâng cao sinh tổng hợp đa enzyme cellulase, α -amylase và glucoamylase. Chủng nấm sợi *Aspergillus niger* A45.1 được lựa chọn để nghiên cứu tăng cường sản xuất đa enzyme bằng việc xử lý đột biến đồng thời với tia UV và hóa chất N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). Sau các liều gây đột biến 0, 30, 60, 90, 120, 150 và 180 phút, dòng *Aspergillus* sp. GA15 được chọn lọc là dòng có hoạt tính glucoamylase, α -amylase và cellulase cao nhất. Sau đó, tiến hành tối ưu điều kiện sản xuất đa enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase bởi dòng đột biến bằng lên men xốp. Lựa chọn được điều kiện lên men xốp tối ưu với chủng *Aspergillus* sp. GA15 là cơ chất cám mì, độ ẩm 50%, pH 5,5, nhiệt độ lên men 30°C, lên men 5 ngày, giống 2 ngày tuổi, nguồn carbon bổ sung là glucose (1%), nguồn nitơ bổ sung là urea (1%), với hoạt tính glucoamylase, α -amylase và cellulase đạt lần lượt là 76,75; 50 và 40,11 (U/g), hoạt tính cao gấp 2,8; 1,29 và 3,3 lần so với lên men ở điều kiện thường.

Từ khóa: Đột biến, enzyme, lên men xốp.

Study on Improving the Synthesis of Multi-enzymes (Cellulase, α -Amylase and Glucoamylase) from *Aspergillus niger* A45.1 by Mutation and Optimal Condition of Solid State Fermentation

ABSTRACT

The study was conducted to enhance fungi strain and optimize the condition of solid state fermentation for improving the synthesis of multi-enzymes (cellulase, α -amylase and glucoamylase). *Aspergillus niger* A45.1 strain was selected for simultaneous mutation treatment by UV and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) with mutagenic doses of 0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes to enhance the secretion of multi-enzymes. After mutation treatments, the *Aspergillus* sp. GA15 strain with the highest activity of glucoamylase, alpha amylase and cellulase enzymes was optimized the fermentation condition to produced multi-enzyme by solid state fermentation. The result found the optimal condition to ferment *Aspergillus* sp. GA15 was obtained in 5 days fermentation of 2 days old fungi with wheat bran substrate, 1% glucose, 1% urea supplymentation, 50% moisture, pH 5.5 and 30°C. Particularly, the activity of glucoamylase, alpha amylase and cellulase enzyme was 76,75 U/g; 50 U/g and 40,11 U/g, respectively, which was higher 2,8; 1,29 and 3,3 times compared to normal conditions.

Keywords: Mutant, enzyme, solid state fermentation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Amylase và cellulase là hai nhóm enzyme được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghệ thực phẩm, dệt may, giấy, được

phẩm, chăn nuôi... Ngày nay enzyme amylase và cellulase thương mại chủ yếu được thu nhận từ nguồn vi sinh như: nấm mốc, nấm men, vi khuẩn và *Actinomyces*. Tuy nhiên, ứng dụng trong các lĩnh vực công nghiệp chủ yếu là các

enzyme được chiết từ nấm mốc và chủ yếu từ nấm sợi với các loài thuộc chi *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Aspergillus* (Sukumaran & cs., 2005 & Ariffin & cs., 2006; Ghani & cs., 2013), chúng được coi là nhà máy sản xuất enzyme. Do nhu cầu về sử dụng enzyme ngày càng tăng trong chăn nuôi cũng như các lĩnh vực công, nông nghiệp và thực phẩm nên việc mở rộng nghiên cứu tăng cường cải thiện chất lượng cũng như nâng cao sản lượng thông qua việc cải tiến chủng, tối ưu môi trường và tìm kiếm quá trình lên men hiệu quả để tăng sản lượng enzyme và giảm chi phí sản xuất là rất cần thiết.

Phương pháp cải tiến chủng bằng đột biến là một lựa chọn thích hợp để tạo ra những chủng vi sinh vật mong muốn. Vì đột biến là một quá trình tự nhiên, các chủng đột biến thu được được coi là tự nhiên mà không có biến đổi gen nhân tạo, điều này thuận lợi cho việc sử dụng các enzyme của các chủng đột biến trong công nghệ thực phẩm (Tillich & cs., 2012; Pathak & cs., 2015). Gây đột biến bằng tia UV và hóa chất NTG là phương pháp được sử dụng phổ biến và có hiệu quả cao đối với vi sinh vật (Vu & cs., 2009; Hạnh & cs., 2012; Abdullah & cs., 2013; Singh & cs., 2013; Ho & Ho, 2015). Raju & cs. (2012) đã nghiên cứu sự cải tiến của *Aspergillus niger* cho sản xuất glucoamylase bằng tác nhân vật lý (UV) và hóa học (Ethyl methyl sulphonate và ethidium bromide) và báo cáo rằng các chủng đột biến của *Aspergillus niger* có khả năng sản xuất glucoamylase tốt hơn. Fawzi & Hamdy (2011) tiến hành gây đột biến chủng nấm *Chaetomium cellulolyticum* NRRL 18756 bằng tia gamma tạo ra chủng đột biến có khả năng sản sinh CMCase gấp 1,6 lần so với chủng đại. Tối ưu hóa điều kiện sản xuất CMCase bởi chủng đột biến sử dụng lên men xộp đã làm tăng sản lượng CMCase hơn 4 lần so với chủng đại ở môi trường cơ bản. Vũ & cs. (2012) cải tiến chủng nấm sợi *Aspergillus* sp. SU14 bằng tia Co60, Uv và N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine đã lựa chọn được một chủng đột biến có khả năng sản sinh cellulase tăng gấp 2,2 lần so với chủng đại. Khi tối ưu điều kiện sản xuất cellulase của chủng đột biến, sản lượng

enzyme tăng 8,5 lần so với chủng đại ở môi trường cơ bản.

Nghiên cứu này tiến hành gây đột biến ngẫu nhiên chủng nấm sợi *Aspergillus niger* A45.1 bằng kết hợp giữa tia UV và NTG sau đó tối ưu điều kiện lên men xộp để chọn ra dòng đột biến và điều kiện lên men tối ưu cho sản xuất cao sản đa enzyme (cellulase, α -amylase, glucoamylase) nhằm phục vụ cho sản xuất chế phẩm enzyme dùng chế biến bã thải tinh bột làm thức ăn chăn nuôi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm sợi *Aspergillus* sp. A45.1 được sàng lọc từ bộ giống của phòng Các chất chức năng Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường PDA (Potatose Dextrose Agar) (nguyên liệu, g/l): Khoai tây 200 (gọt vỏ, thái hạt lựu, thủy phân trong 1 giờ, sau đó thu dịch và bỏ bã), glucose 20, KNO₃ 0,5, Agar 20. Môi trường PBD không bổ sung agar, nước cất vừa đủ 1 lít, pH 7-7,4.

Môi trường cám gạo dịch thể: 10 g cám gạo và 90 mL nước sạch, trong bình tam giác dung tích 250 mL, điều chỉnh về pH 3,5 bằng HCl 10%.

Môi trường lên men xộp: Cân 10 g cám gạo cho vào bình tam giác 250 mL, điều chỉnh độ ẩm 30 % (v/w) bằng HCl 0,01%.

Các môi trường dùng nuôi cấy vi sinh vật được khử trùng ở 115°C trong 30 phút trước khi sử dụng.

Các hóa chất sử dụng tinh khiết đạt tiêu chuẩn trong nghiên cứu. Các thiết bị tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo đột biến ngẫu nhiên bằng hóa chất NTG và tia UV

Gây đột biến ngẫu nhiên nấm sợi bằng tác nhân hóa học NTG kết hợp với tia UV: Chủng nấm sợi *Aspergillus niger* A45.1 trong môi

trường PDB ở 28°C, 200 vòng/phút, sau 5 ngày thu 2 mL dung dịch bào tử (10^7 bào tử/mL), ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C), thu bào tử, loại dịch nổi. Bào tử được hòa vào 500 μ L dung dịch N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG), 100 mg/mL đệm 0,2 M citrate, pH 5) và lắc kỹ. Đổ dung dịch vào đĩa petri (9 cm x 1,5 cm), bật tia UV (50 Wátte), khoảng cách từ nguồn UV đến đĩa là 30 cm. Sau 30, 60, 90, 120 và 180 phút chiếu UV, 50 μ L dịch đã chiếu được hút cho vào các ống eppendorf và được rửa bằng nước muối sinh lý 3 lần, sau đó pha loãng và cấy trải trên môi trường PDA có bổ sung ampicillin (100 mg/L), nuôi cấy ở nhiệt độ phòng trong 4-6 ngày. Sau khi nấm đã mọc, đếm số lượng khuẩn lạc trên đĩa thí nghiệm và đối chứng (không gây đột biến) để dựng đồ thị về tỷ lệ (%) sống sót của bào tử sau chiếu UV. Từ các đĩa nấm đã mọc, nhặt ngẫu nhiên 5 khuẩn lạc/liều gây đột biến, cấy trên đĩa PDA, ủ ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày, sau đó tiến hành lên men để xác định hoạt độ enzyme (Vu & cs., 2011; Kaur & cs., 2014).

2.2.2. Lên men xộp và chiết tách enzyme thô

Tiến hành lên men sản xuất enzyme theo Vu & cs. (2011) có cải tiến về việc sử dụng cơ chất: Cấy (1 x 1 cm²) nấm sợi đã nuôi 7 ngày tuổi từ đĩa thạch vào bình tam giác 250 mL chứa môi trường cám gạo dịch thể (10%, w/v), nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 30°C, sau 3 ngày thu giống cấp 1. Lấy 10% giống cấp 1 trộn vào môi trường lên men xộp (10 cám gạo, độ ẩm 30%), trộn đều, lên men ở 30°C trong 5 ngày.

Lấy 1 g sản phẩm sau 5 ngày lên men xộp được trộn với 9 mL nước cất vô trùng đựng trong ống falcon 50 mL. Hỗn hợp được lắc 200 vòng/phút, ở 30°C trong 60 phút, sau đó ly tâm 4.000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi và sử dụng làm nguồn enzyme thô.

2.2.3. Xác định hoạt tính của cellulase, α -amylase và glucoamylase

Hoạt tính của α -amylase, glucoamylase và cellulase sau lên men xộp được xác định theo mô tả của Grajek (1987) và Vu & cs. (2010). 1 mL

hỗn hợp phản ứng enzyme gồm 50 μ L enzyme pha loãng và 50 μ L carboxymethyl cellulose 1% (w/v) (CMC; Sigma, St. Louis, MO, USA) hoặc hồ tinh bột 1% trong đệm axetat (50 mM, pH 5). Hỗn hợp phản ứng được ủ tại 50°C trong 30 phút và đường khử sau phản ứng được xác định bằng phương pháp DNS (Miller, 1959).

Dụng đường chuẩn glucose và maltose: Dựa vào đường chuẩn glucose xác định được hoạt tính cellulase (cơ chất CMC) và glucoamylase (cơ chất tinh bột), dựa vào đường chuẩn maltose xác định hoạt tính của α -amylase.

Một đơn vị hoạt tính enzyme (Unit: U) được xác định là lượng enzyme cần thiết để tạo ra 1 μ M glucose (maltose) từ cơ chất trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm. Hoạt tính cellulase, α -amylase và glucoamylase được thể hiện bằng đơn vị trên 1 gam cám gạo lên men (U/g).

$$\text{Hoạt tính enzyme (U/g)} = \frac{X.k}{t};$$

Trong đó: X: hàm lượng đường khử (μ M) được giải phóng trong dung dịch sau phản ứng enzyme); k: hệ số pha loãng; t: thời gian phản ứng (phút).

2.2.4. Tối ưu điều kiện lên men xộp

Các thông số tối ưu bao gồm: Cơ chất (cám mì, cám gạo, vỏ trấu, mùn cưa). Độ ẩm cơ chất (20, 30, 40, 50, 60, 70 và 80%, v/w). Nhiệt độ lên men (20, 25, 30, 35, 40 và 45°C). pH ban đầu của cơ chất lên men (3,0; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,0; 6,5 và 7). Thời gian nuôi cấy (2-8 ngày), tuổi giống (1-4 ngày).

Ảnh hưởng của việc bổ sung nguồn carbon và nitơ: Nguồn carbon gồm glucose, maltose, tinh bột gạo, sucrose, ngô, mỗi loại 1% được bổ sung vào cơ chất lên men xộp. Nguồn nitơ như: ure, cao nấm men, tryptone, peptone, NH₄Cl, NH₄NO₃, mỗi loại 1% được bổ sung vào cơ chất lên men xộp.

2.3. Xử lý số liệu

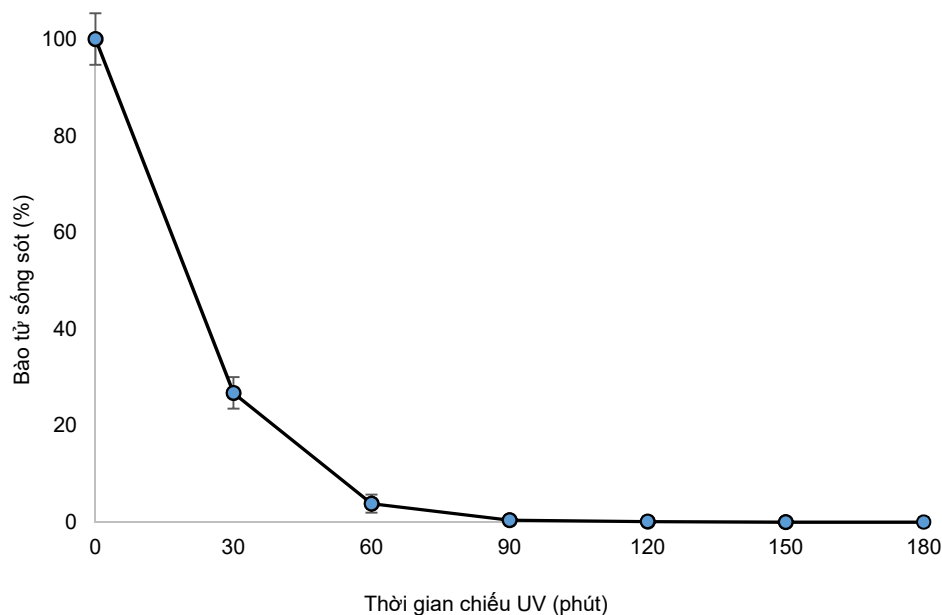
Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và SAS 9.0 để phân tích phương sai (ANOVA) và phép thử Tukey ở mức ý nghĩa P < 0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của tia UV, NTG đến khả năng sống sót của chủng *Aspergillus niger* A45.1

Bào tử của chủng nấm sợi *Aspergillus niger* A45.1 được xử lý đồng thời bằng NTG và tia UV trong thời gian 180 phút. Kết quả (Hình 1, 2) cho thấy, tia UV và NTG có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sống sót của các bào tử nấm. Thời gian chiếu UV hoặc xử lý NTG càng dài thì tỷ lệ (%) sống sót của các bào tử càng giảm, do tia UV và NTG đã tạo nên các đột biến gây chết trên nấm sợi. Số lượng bào tử ở thời điểm chưa xử lý (0 phút) là 10^7 (bào tử/mL) sau đó giảm dần theo thời gian gây đột biến. Tỷ lệ (%) sống sót của các bào tử còn 26,73% sau 30 phút, còn lại 3,82% sau 60 phút và 0,4% sau 90 phút. Sau 120 phút xử lý, tỷ lệ sống sót bào tử chỉ còn 0,12%. Từ sau 150 phút xử lý, lượng bào tử bị gây chết hoàn toàn. Kết quả tương tự như nghiên cứu của Reddy & cs. (2017), sau 60 phút xử lý bằng tia UV, khoảng 90% lượng bào tử của *A. niger* bị chết, chỉ còn khoảng 10% sống sót. Shafique & cs. (2011) cũng cho biết tỷ lệ chết của các bào tử nấm *Trichoderma viride* tăng khi tăng thời gian chiếu tia UV.

Tia UV có thể tạo ra đột biến giữa 2 vòng



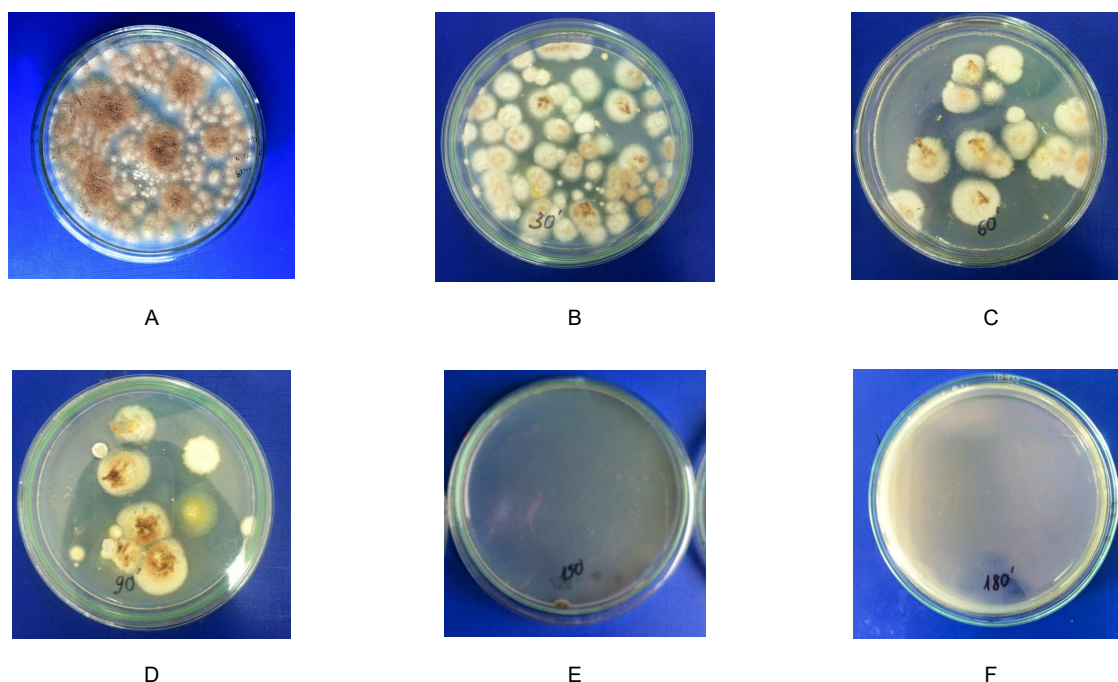
Hình 1. Mối quan hệ giữa tỷ lệ (%) bào tử nấm *Aspergillus niger* A45.1 còn sống sót và thời gian chiếu tia UV và xử lý NTG

pyrimidine để tạo nên 2 liên kết dimer giữa chúng. Qua quá trình sao chép ADN, cặp GC, GC (tự nhiên) sẽ tạo thành cặp AT, AT (đột biến) sau khi bị chiếu tia cực tím (Pathak & cs., 2015). NTG là một trong những hóa chất gây đột biến được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu hiện nay. NTG gây đột biến mạnh thuộc lớp alkyl hóa. NTG là tác nhân gây đột biến hiệu quả cao nhất đối với vi sinh vật. Tia UV và NTG có khả năng tạo các đột biến ngẫu nhiên trên vật liệu di truyền, tạo ra nguồn nguyên liệu biến đổi di truyền quan trọng để chọn lọc thu nhận dòng có nhiều đặc điểm tính trạng ưu việt hơn (Vũ Văn Hạnh & cs., 2012; Pathak & cs., 2015). Các khuẩn lạc sống sót sau khi được gây đột biến ở các khoảng thời gian khác nhau (liều gây đột biến khác nhau) được nhặt ngẫu nhiên. Mỗi liều đột biến chọn 5 khuẩn lạc, sau đó lên men trên cơ chất xốp để xác định hoạt tính enzyme.

3.2. Hoạt tính enzyme của các dòng đột biến

Chủng nấm sợi kiểu dại *Aspergillus niger* A45.1 sau khi gây đột biến đồng thời bằng hóa chất NTG và tia UV từ 30 đến 120 phút đã tạo ra các dòng đột biến với khả năng sản sinh các enzyme α -amylase, glucoamylase và cellulase có mức hoạt tính khác nhau (Bảng 1).

Nghiên cứu nâng cao sinh tổng hợp đa enzyme (cellulase, α -amylase và glucoamylase) từ chủng *Aspergillus niger* A45.1 bằng kỹ thuật đột biến và tối ưu điều kiện lên men xốp



Ghi chú: A: 0 phút; B: 30 phút; C: 60 phút; D: 90 phút; E: 150 phút; F: 180 phút.

Hình 2. Các khuẩn lạc chủng *Aspergillus niger* A45.1 sau xử lý bởi tia UV và NTG ở thời gian chiếu khác nhau

Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng sản sinh α -amylase, glucoamylase và cellulase cao nhất thuộc về dòng đột biến GA15. So với chủng đại, hoạt tính của α -amylase cao gấp 1,97 lần, glucoamylase cao gấp 2,2 lần, cellulase cao gấp 1,9 lần. Fawzi và Hamdy (2011) cho biết hoạt độ enzyme CMCase của chủng đột biến *Chaetomium cellulolyticum* tăng 1,45 lần so với chủng đại khi gây đột biến ngẫu nhiên bằng tia gamma. Hoạt độ CMCase của chủng đột biến *Aspergillus terus* tăng 2 lần so với chủng đại (Vu & cs., 2011).

Một số kết quả nghiên cứu đã chỉ ra các chủng đột biến do chiếu tia UV không có sự thay đổi nào trong hệ gen của chúng, khả năng tăng hoạt tính enzyme của những chủng này là do những thay đổi có thể xảy ra trong vùng promoter của các gen mã hóa cho các enzyme này. Tia phóng xạ có thể phá hủy sự điều hòa phiên mã của mARN tương ứng của enzyme, dẫn tới việc tăng sự sản xuất enzyme (Nicolás-Santiago & cs., 2006; Li & cs., 2010; Singh & cs., 2013).

3.3. Tính ổn định của các dòng đột biến chọn lọc

Tính ổn định về khả năng sinh enzyme của các dòng đột biến GA15 được xác định bằng việc cấy chuyển liên tiếp trên đĩa thạch PDA qua 9 thế hệ. Sau mỗi lần nuôi cấy và lên men xốp, các dòng đột biến được tiến hành kiểm tra tính ổn định về khả năng sản sinh enzyme.

Kết quả (Bảng 2) cho thấy sau 9 thế hệ nuôi cấy khả năng sản sinh 3 loại enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus* sp. GA15 được duy trì tương đối ổn định ($P > 0,05$), hoạt tính của 3 loại enzyme này từ lên men xốp lần lượt là 27,15-29,67; 38,02-39,13 và 12,06-12,87 (U/g). Điều này chỉ ra rằng dòng đột biến này có đặc tính di truyền ổn định. Li & cs. (2010) cũng nhận thấy rằng các chủng đột biến thu được bằng gây đột biến bởi tia UV có khả năng sản sinh cellulase ổn định qua 9 thế hệ. Theo nghiên cứu của Vu & cs. (2009), chủng *Aspergillus* sp. XTG-4 bị gây đột biến bởi tia UV và hóa chất NTG, có hoạt tính của các enzyme cellulase ổn định sau 19 thế hệ nuôi cấy.

Bảng 1. Hoạt tính enzyme của các dòng đột biến (n = 3)

Dòng đột biến	Thời gian gây đột biến (phút)	Hoạt độ enzyme (U/g) (LSM)		
		Glucoamylase	α -amylase	Cellulase
A45.1 (Chủng đại)	0	12,47 ^{fhi}	19,60 ^{cdef}	6,40 ^{bcdef}
GA11	30	10,88 ^{hi}	15,01 ^{defg}	4,26 ^{ef}
GA12		14,41 ^{efh}	20,90 ^{cde}	6,31 ^{bcdef}
GA15		27,41 ^a	38,68 ^a	12,16 ^a
GA13		18,41 ^{cdef}	27,57 ^{bc}	4,66 ^{def}
GA14		21,41 ^{abcd}	32,57 ^{ab}	11,81 ^a
GA21	60	7,98 ^{hi}	10,18 ^{ghi}	6,08 ^{cdef}
GA22		21,53 ^{abcd}	32,76 ^{ab}	8,81 ^{abcdf}
GA23		15,69 ^{def}	23,04 ^{cd}	12,68 ^a
GA24		21,31 ^{abcd}	32,40 ^{ab}	10,91 ^{ab}
GA25		12,10 ^{fhi}	6,16 ^{hi}	8,38 ^{abcde}
GA31	90	15,82 ^{edf}	8,02 ^{ghi}	7,99 ^{abcdef}
GA32		20,38 ^{bode}	10,30 ^{ghi}	9,42 ^{abcd}
GA33		22,43 ^{abcd}	11,33 ^{fghi}	6,55 ^{bcdef}
GA34		26,60 ^{ab}	13,41 ^{efgh}	5,77 ^{cdef}
GA35		26,16 ^{ab}	13,19 ^{efgh}	9,77 ^{abc}
GA41	120	22,82 ^{abc}	11,52 ^{fghi}	6,71 ^{cbdef}
GA42		21,66 ^{abcd}	10,94 ^{ghi}	8,04 ^{bcdef}
GA43		6,21 ⁱ	3,21 ⁱ	6,99 ^{bcdef}
GA44		8,19 ^{hi}	4,17 ⁱ	3,41 ^{ef}
GA45		16,42 ^{cdef}	8,28 ^{ghi}	4,51 ^{ef}
	SEM	1,27	1,56	0,89
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Ghi chú: Trong cùng một cột, những giá trị LSM (trung bình bình phương nhỏ nhất) có các chữ cái khác nhau thì sai khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Bảng 2. Hoạt tính α -amylase, glucoamylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus sp.* GA15 qua các thể hệ nuôi cấy

Thể hệ	Hoạt độ enzyme (U/g), (Mean \pm SE), (n=3)		
	Glucoamylase	α -amylase	Cellulase
1	27,15 \pm 0,35	39,13 \pm 0,5	12,81 \pm 0,23
3	27,21 \pm 0,85	38,62 \pm 1,14	12,06 \pm 0,85
5	29,67 \pm 0,37	38,02 \pm 0,75	12,36 \pm 0,69
7	28,82 \pm 1,09	38,21 \pm 0,82	12,43 \pm 0,55
9	28,54 \pm 0,56	38,09 \pm 0,52	12,87 \pm 1,05
Trung bình	28,28	38,41	12,51

Bên cạnh việc cải tiến chủng thì việc lựa chọn cơ chất rẻ tiền và các điều kiện lên men thích hợp là rất cần thiết trong việc nâng cao hiệu suất và giảm chi phí sản xuất enzyme.

3.4. Tối ưu điều kiện lên men xốp cho sản xuất đa enzyme (glucoamylase, α -amylase và cellulase) bởi chủng đột biến *Aspergillus sp.* GA15

3.4.1. Cơ chất

Các loại cơ chất khác nhau (cám mì, cám gạo, vỏ trấu và mùn cưa) được sử dụng trong lên men, để xác định ảnh hưởng của nó trong việc sản xuất đa enzyme. Kết quả được chỉ ra ở hình 3.

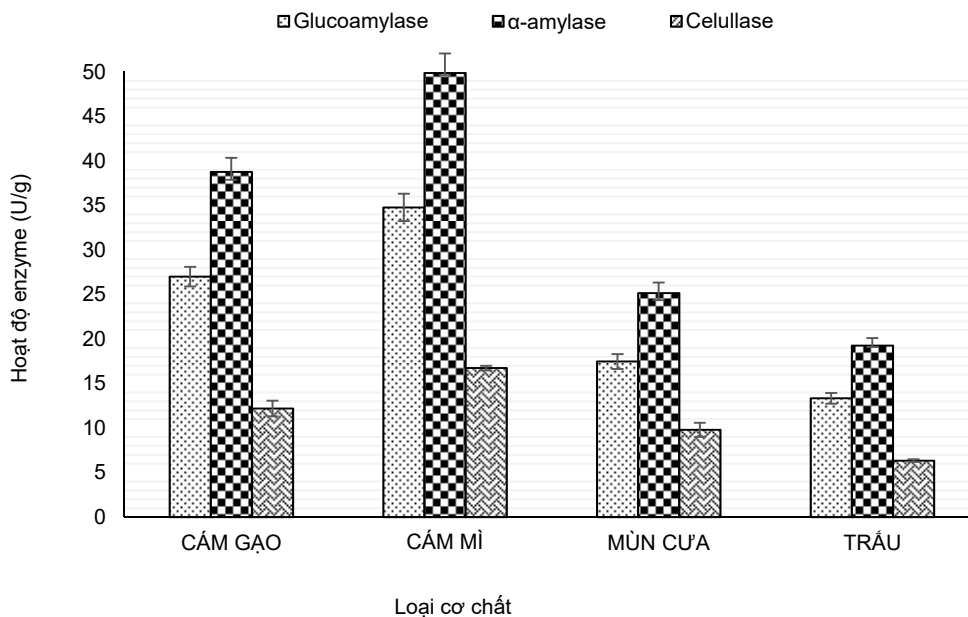
Kết quả cho thấy sự sản sinh enzyme cao nhất được quan sát trên môi cơ chất cám mì, với hoạt tính của 3 loại enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase lần lượt là 34,78; 49,88 và 16,74 (U/g), hoạt tính thấp nhất với cơ chất là trấu. Do đó, cám mì được lựa chọn sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Sự khác nhau trong sản xuất enzyme khi sử dụng các cơ chất khác nhau trong lên men xốp phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm bản chất cấu trúc của cơ chất, độ xốp và ảnh hưởng của nó đến sự xâm nhập của vi sinh vật. Vi sinh vật

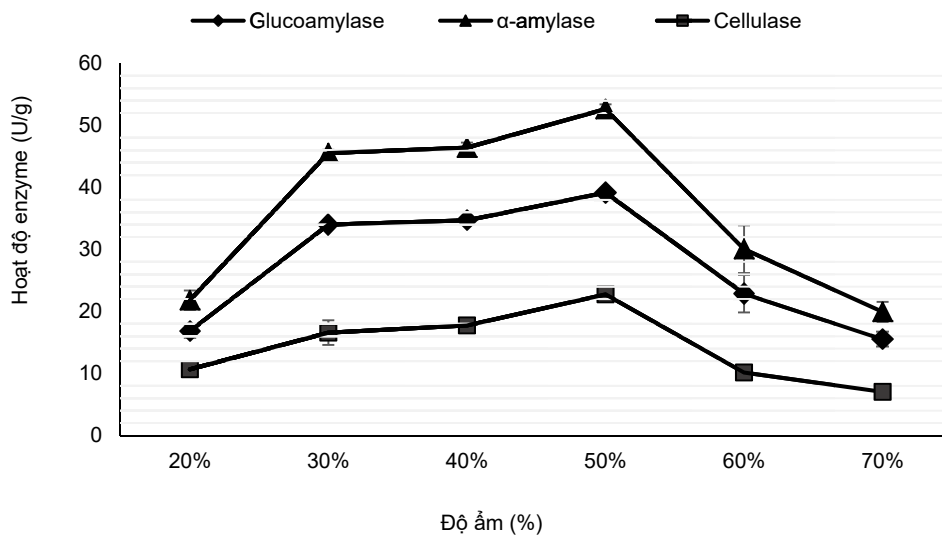
thường có xu hướng lựa chọn những cơ chất có độ xốp cao hoặc vật liệu giòn (dễ phân hủy) để làm môi trường dinh dưỡng vì nó dễ dàng sinh trưởng vào bên trong các hạt cơ chất, từ đó ảnh hưởng đến hiệu suất sản sinh enzyme của vi sinh vật. Chính vì vậy năng suất enzyme bị ảnh hưởng nhiều bởi kích thước của các hạt cơ chất, những cơ chất mà có kích thước hạt nhỏ vừa phải, hợp lý, sẽ làm tăng hiệu suất sản sinh enzyme bằng cách tăng diện tích tiếp xúc bề mặt cho vi sinh vật, việc vận chuyển oxi và nhiệt được thuận lợi (Bedan & cs., 2014; Kumari & cs., 2012). Theo công bố của Vu & cs. (2010; 2011), cám mì là nguồn cơ chất thích hợp nhất trong lên men xốp để sản xuất cellulase và enzyme thủy phân tinh bột sống bởi các chủng đột biến chọn lọc.

3.4.2. Độ ẩm

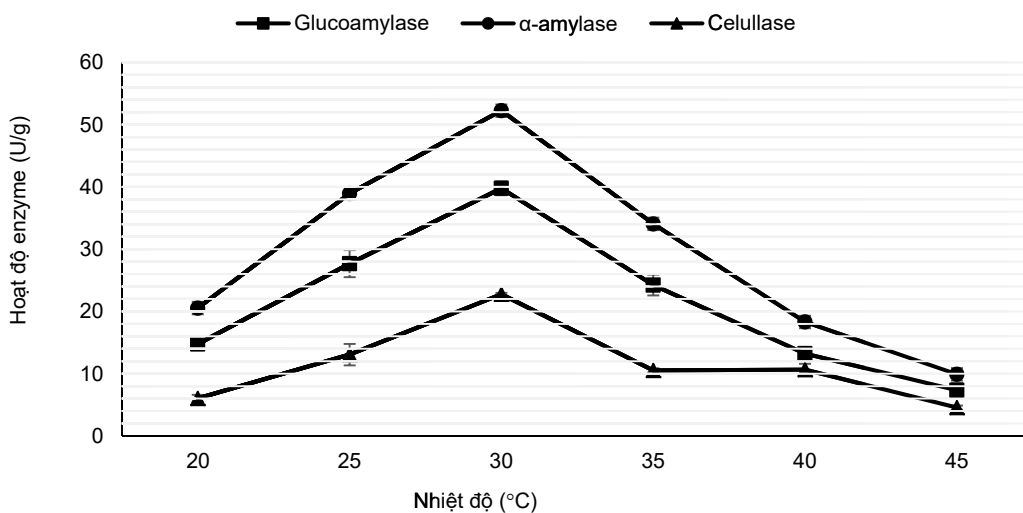
Cám mì được bổ sung nước để có độ ẩm khác nhau. Nghiên cứu nhằm chọn độ ẩm tối ưu cho sản xuất đa enzyme. Độ ẩm thích hợp nhất cho sự sản xuất glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng nấm sợi GA15 là 50% (w/v) với hoạt tính lần lượt là 39,16; 52,64 và 22,74 (U/g). Tỷ lệ độ ẩm 50% này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của loại cơ chất đến khả năng sản xuất enzyme của chủng đột biến *Aspergillus sp.* GA15



Hình 4. Ảnh hưởng của độ ẩm cơ chất đến khả năng sản xuất glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus sp. GA15*



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến khả năng sản xuất glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus sp. GA15*

Theo công bố của Vu & cs. (2010), tỷ lệ độ ẩm tối ưu cho việc sản sinh enzyme thủy phân tinh bột sống sử dụng chủng đột biến *Aspergillus sp. XN15* là 50% với hoạt độ là 62,52 U/g. Trong lên men rắn, độ ẩm có vai trò quan trọng trong việc sinh tổng hợp và tiết enzyme. Mức độ thủy phân cơ chất có vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng của nấm sợi và sau đó là sự sản sinh enzyme. Nước làm cho cơ chất trương lên và tăng khả năng sử dụng cơ chất của vi sinh vật. Nếu độ ẩm quá cao sẽ làm giảm độ

rỗng bề mặt của môi trường, giảm sự lưu thông oxy trong môi trường, từ đó làm giảm khả năng sinh trưởng và tổng hợp enzyme của vi sinh vật. Ngược lại, ở độ ẩm thấp sẽ làm giảm mức độ hòa tan các chất dinh dưỡng của cơ chất, từ đó sẽ kìm hãm sự sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme của nấm sợi (Bedan & cs., 2014)

3.4.3. Nhiệt độ lên men

Kết quả nghiên cứu trong hình 5 cho thấy nhiệt độ thích hợp cho lên men xộp để sản sinh

glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus* GA15 là 30°C với hoạt tính lần lượt là 39,77; 52,24 và 22,77 (U/g).

Nhiệt độ thấp hơn hoặc cao hơn nhiệt độ tối ưu đều làm giảm sự sản xuất enzyme. Ở nhiệt độ thấp không thích hợp cho sự sinh trưởng của nấm mốc và kết quả là sự sản xuất enzyme giảm. Trong khi ở nhiệt độ cao sẽ làm giảm lượng nước của môi trường do bốc hơi dẫn tới ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của các tế bào, thêm vào đó nhiệt độ cao hơn sẽ làm giảm sự tập trung của oxy (Bedan & cs., 2014), dẫn đến việc sản xuất enzyme giảm. Nhiệt độ tối ưu giữa các loài nấm là không giống nhau. Theo Vu & cs. (2010), lên men ở 30°C là điều kiện tối ưu cho sản xuất enzyme thủy phân tinh bột sống của chủng *Aspergillus* sp. XN15. Ở nhiệt độ 35°C là thích hợp cho chủng *Aspergillus* NRRL 3112 và *Aspergillus* NRRL 337 để sản xuất glucoamylase (Ellaiah & cs., 2002).

3.4.4. pH của môi trường

Khả năng sản xuất enzyme của chủng *Aspergillus* sp. GA15 trên môi trường có pH khác nhau được minh họa trong hình 6.

Ở pH 5,5 của môi trường lên men được quan sát là tối ưu cho sản xuất cả 3 loại enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng GA15, với hoạt tính enzyme lần lượt là 42,46, 55,32 và 22,96 (U/g). Hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật rất nhạy cảm với sự thay đổi của pH,

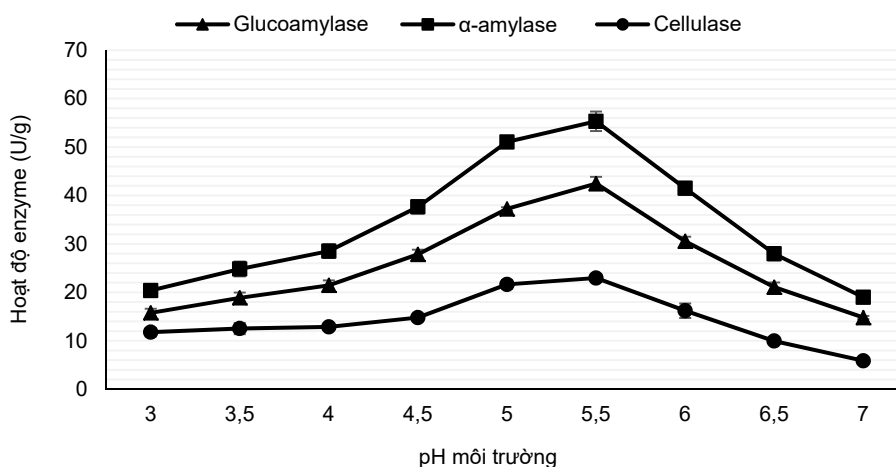
ngoài giá trị pH tối ưu, sự sinh trưởng và sản xuất enzyme của vi sinh vật giảm do thay đổi cấu trúc bậc 3 của protein và ảnh hưởng đến độ hòa tan và sự ion hóa của cơ chất (Bedan & cs., 2014). pH môi trường tối ưu khác nhau phụ thuộc chủng loại vi sinh vật và loại enzyme được sản xuất, theo Vardhini & cs. (2013), độ pH tối ưu cho sản xuất α -amylase bởi *A. niger* là 6,5 với hoạt tính là 40 U/g. Vu & cs. (2010) đã phát hiện pH tối ưu cho sản xuất enzyme thủy phân tinh bột sống bởi chủng *Aspergillus* sp. XN 15 là 4,5.

3.4.5. Thời gian lên men

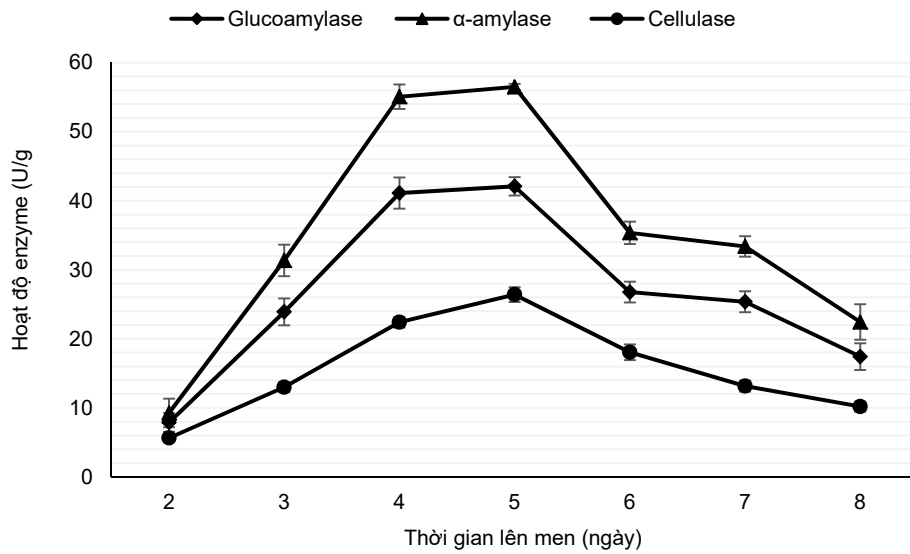
Sau 5 ngày lên men xốp, chủng đột biến *Aspergillus* sp. GA15 sản xuất 3 loại glucoamylase, α -amylase và cellulase ở mức cao nhất với hoạt tính lần lượt là 42,09; 56,5 và 26,4 (U/g). Thời gian lên men ít hơn hoặc nhiều hơn 5 ngày đều cho khả năng sinh enzyme thấp.

Nghiên cứu của Bhavya (2007) phát hiện thời gian lên men tốt nhất cho sản xuất amylase bởi các loài *Aspergillus* khi lên men xốp là 6 ngày cho hoạt độ enzyme là 7 U/mg.

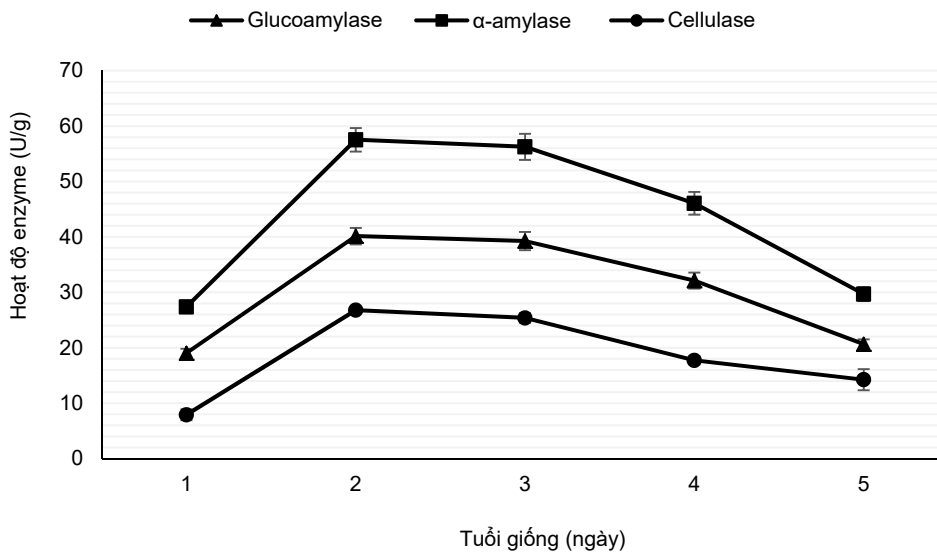
Sản xuất enzyme giảm sau 6 ngày lên men có thể liên quan đến việc sinh ra đường khử trong môi trường nuôi cấy dẫn tới giảm sự sản xuất enzyme vì những đường này là nguồn carbon dễ sử dụng hơn tinh bột, thêm vào đó là sự cạn kiệt chất dinh dưỡng trong môi trường (Kumari & cs., 2012).



Hình 6. Ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sản xuất glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus* sp. GA15



Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến sản xuất glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus sp. GA15*



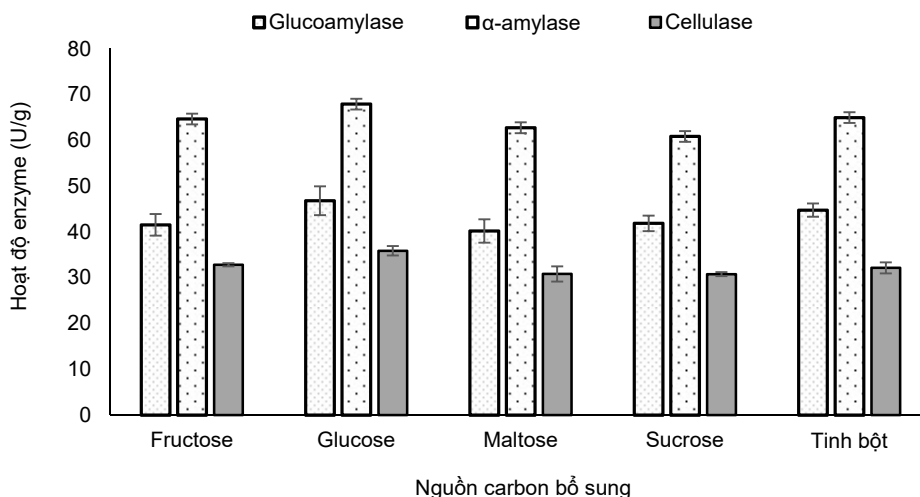
Hình 7. Ảnh hưởng của tuổi giống đến sự sản sinh enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus sp. GA15*

3.4.6. Tuổi giống

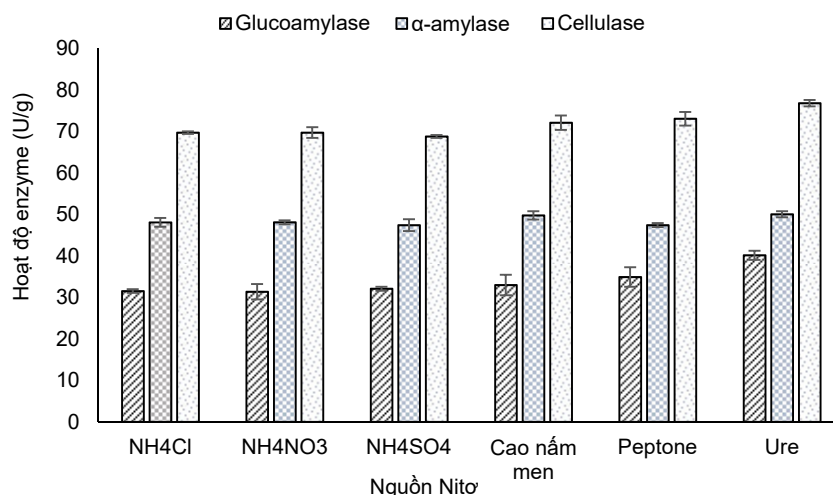
Kết quả nghiên cứu (Hình 7) cho thấy hoạt tính của 3 enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase thấp nhất ở tuổi giống 1 ngày tuổi, hoạt tính cao hơn ở tuổi giống 2, 3 ngày, sau đó hoạt tính enzyme giảm dần ở tuổi giống 4 và 5 ngày. Hoạt tính enzyme thu được đạt cực đại khi sử dụng giống 2 và 3 ngày tuổi, sau khi lên men xốp, nấm sinh trưởng và phát triển tốt nhất,

sinh tổng hợp đa enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase có hoạt tính cao. Với giống 1 ngày tuổi khi cấy vào môi trường xốp, nấm sợi sinh trưởng và phát triển kém, cho hoạt tính enzyme thấp vì ở tuổi giống này, nấm mới bắt đầu sinh trưởng, lượng bào tử sinh ra chưa nhiều. Đối với giống 4 và 5 tuổi ngày, nấm chuyển sang giai đoạn sợi, bào tử ít dần (Balcoa & cs., 1996).

Nghiên cứu nâng cao sinh tổng hợp đa enzyme (cellulase, α -amylase và glucoamylase) từ chủng *Aspergillus niger* A45.1 bằng kỹ thuật đột biến và tối ưu điều kiện lên men xốp



Hình 8. Ảnh hưởng của nguồn carbon bổ sung đến khả năng sản xuất enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus sp.* GA15



Hình 9. Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung đến sự sản sinh enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus sp.* GA15

3.4.7. Ảnh hưởng của nguồn carbon bổ sung

Các nguồn carbon bổ sung khác nhau đã được kiểm tra ảnh hưởng của chúng trong sản xuất đa enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase của chủng đột biến *Aspergillus* GA15 (Hình 8).

Khi bổ sung các nguồn carbon khác nhau vào môi trường lên men xốp, hoạt tính của 3 enzyme đều tăng so với khi không bổ sung carbon. Với các nguồn carbon khác nhau, hoạt tính của glucoamylase, α -amylase không có sự sai khác, còn hoạt tính của cellulase cao nhất

35,9 (U/g) trên môi trường bổ sung glucose. Điều này cho thấy glucose là nguồn carbon bổ sung có ảnh hưởng tích cực đến sản xuất cellulase từ chủng nấm đột biến *Aspergillus sp.* GA15. Theo Alva & cs. (2007), việc sản xuất amylase tối đa đạt được khi sử dụng glucose là nguồn carbon đối với chủng *Aspergillus* trong SSF và với hoạt tính 12,2 U/mg.

3.4.8. Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung

Các nguồn nitơ khác nhau (nitơ hữu cơ và vô cơ) đã được lựa chọn để nghiên cứu hiệu quả của chúng trong việc tăng cường sản xuất đa

enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase (Hình 9). Hoạt tính cao nhất đối với cả 3 enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase được chỉ ra đối với ure, cho hoạt tính enzyme tương ứng lần lượt là 76,75; 50 và 40,11 (U/g), đây được coi là nguồn nitơ hiệu quả nhất cho sản xuất đơn enzyme glucoamylase, α -amylase và cellulase từ chủng đột biến *Aspergillus* sp. GA15.

4. KẾT LUẬN

Chọn lọc được chủng *Aspergillus* sp. GA15 là chủng có hoạt tính glucoamylase, α -amylase và cellulase cao nhất bằng gây đột biến đồng thời bởi tia UV và hóa chất NTG từ chủng *Aspergillus niger* A45.1. Điều kiện lên men xốp thích hợp đối với chủng *Aspergillus* sp. GA15 là: cơ chất cám mì, độ ẩm 50%, pH 5,5, nhiệt độ lên men 30°C, thời gian lên men 5 ngày, giống 2 ngày tuổi, nguồn carbon bổ sung là glucose (1%), nguồn nitơ bổ sung là ure (1%). Hoạt tính glucoamylase, α -amylase và cellulase đạt lần lượt là 76,75 ; 50 và 40,11 (U/g), hoạt tính cao gấp 2,8; 1,29 và 3,3 lần so với lên men ở điều kiện thường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdullah R., Ikram-Ul-Haq T.I., Butt Z. & Khattak M.I. (2013). Random mutagenesis for enhanced production of alpha amylase by *Aspergillus oryzae* IIB-3. Pak. J. Bot. 45(1): 269-274.
- Alva S., Anupama J., Savla J., Chiu Y., Vyshali P., Shruti M., Yogeetha B., Bhavya D., Purvi J. & Ruchi K. (2007). Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. African journal of Biotechnology. 6(5): 576.
- Ariffin H., Abdullah N., Umi Kalsom M., Shirai Y. & Hassan M. (2006). Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. Int. J. Eng. Technol. 3(1): 47-53.
- Bedan D.S., Aziz G.M. & Al-Sa'ady A.J. (2014). Optimum conditions for α -amylase production by *Aspergillus niger* mutant isolate using solid state fermentation. Current Research in Microbiology and Biotechnology. 2(4): 450-456.
- Bhavya D. (2007). Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. African journal of Biotechnology. 6(5): 576-581.
- Ellaiah P., Adinarayana K., Bhavani Y., Padmaja P. & Srinivasulu B. (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. Process Biochemistry. 38(4): 615-620.
- Fawzi E.M. & Hamdy H.S. (2011). Improvement of carboxymethyl cellulase production from *Chaetomium cellulolyticum* NRRL 18756 by mutation and optimization of solid state fermentation. African Journal of Microbiology Research. 5(26): 4687-4696.
- Ghani M., Aman A., Rehman H.U., Siddiqui N.N. & Qader S.A. (2013). Strain improvement by mutation for enhanced production of starch-saccharifying glucoamylase from *Bacillus licheniformis*. Starch-Stärke. 65(9-10): 875-884.
- Grajek W. (1987). Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. Applied microbiology and biotechnology. 26(2): 126-129.
- Hameed U., Shahzadi K., Javed M.M., Ali S. & Qadeer M. (2005). Cotton saccharifying activity of cellulases by *Trichoderma harzianum* UM-11 in shake flask. International Journal of Botany.
- Vũ Văn Hạnh, Quyền Đình Thi & Nguyễn Thị Thu Thủy (2012). Nâng cao độc lực diệt rệp đào của chủng nấm kí sinh côn trùng *Lecanicilium* bằng đột biến tia cực tím (UV) và N methyl-N' nitro-N nitrosoguanidine (NTG) nhằm sản xuất thuốc trừ sâu sinh học. Vietnam Journal of Science and Technology. 50(2): 197.
- Ho H. & Ho K. (2015). Fungal Strain Improvement of *Aspergillus brasiliensis* for Overproduction of Xylanase in Submerged Fermentation through UV Irradiation and Chemicals Mutagenesis. Journal of Advances in Biology & Biotechnology. 3(3): 117-131.
- Kaur B., Oberoi H. & Chadha B. (2014). Enhanced cellulase producing mutants developed from heterokaryotic *Aspergillus* strain. Bioresource technology. 156: 100-107.
- Kumari S., Bhattacharya S. & Das A. (2012). Solid-state fermentation and characterization of amylase from a thermophilic *Aspergillus niger* isolated from Municipal Compost soil, Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS). 2(2): 836.
- Li X.H., Yang H.J., Roy B., Park E.Y., Jiang L.J., Wang D. & Miao Y.G. (2010). Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. Microbiological Research. 165(3): 190-198.
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 31(3): 426-428.

- Nicolás-Santiago D., Regalado-González C., García-Almendárez B., Fernández F.J., Téllez-Jurado A. & Huerta-Ochoa S. (2006). Physiological, morphological, and mannanase production studies on *Aspergillus niger* uam-gsl mutants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9(1): 0-0.
- Pathak S.S., Sandhu S.S. & Rajak R. (2015). Mutation Studies on Fungal Glucoamylase: A Review. *Int. J. Pharma Bio Sci*. 5(2): 297-308.
- Raju E., Divakar G., Swetha C., Geetha J. & Satish P. (2012). Strain improvement of *Aspergillus niger* for glucoamylase by physical and chemical mutagens. *Int Res J Pharm App Sci*. 2: 79-91.
- Reddy G.P.K., Sridevi A., Kumar K.D., Ramanjaneyulu G., Ramya A., Kumari B.S. & Reddy B.R. (2017). Strain Improvement of *Aspergillus niger* for the Enhanced Production of Cellulase in Solid State Fermentation. *Microbial Biotechnology: Technological Challenges and Developmental Trends*: 201.
- Shafique S., Bajwa R. & Shafique S. (2011). Strain improvement in *Trichoderma viride* through mutation for overexpression of cellulase and characterization of mutants using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *African Journal of Biotechnology*. 10(84): 19590-19597.
- Sharada R., Venkateswarlu G., Venkateshwar S. & Rao M.A. (2013). Production of cellulase - a review. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*. 3(4).
- Singh S., Sharma V., Soni M. & Das S. (2011). Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2: 486-496.
- Singh S., Sharma V., Soni M. L. & Sinha S. (2013). Effect of UV induced mutation on amylase producing potential of *Bacillus subtilis* (2620). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 4: 62-68.
- Sukumaran R.K., Singhanian R.R. & Pandey A. (2005). Microbial cellulases-production, applications and challenges.
- Vardhini R.S., Naik B.R., Neelima M. & Ramesh B. (2013). Screening and production of α -amylase from *Aspergillus niger* using zero, value material for solid state fermentation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(1): 55-60.
- Vu V.H., Pham T.A. & Kim K. (2009). Fungal strain improvement for cellulase production using repeated and sequential mutagenesis. *Mycobiology*. 37(4): 267-271.
- Vu V.H., Pham T.A. & Kim K. (2010). Improvement of a fungal strain by repeated and sequential mutagenesis and optimization of solid-state fermentation for the hyper-production of raw-starch-digesting enzyme. *J. Microbiol Biotechnol*. 20(4): 718-726.
- Vu V.H., Pham T.A. & Kim K. (2011). Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid state fermentation. *Mycobiology*. 39(1): 20-25.