

## TUYỂN CHỌN DÒNG NẤM MỐC *Aspergillus niger* SINH TỔNG HỢP PROTEASE HOẠT TÍNH CAO

Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mươi

Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 28/05/2015

Ngày chấp nhận: 21/12/2015

### Title:

Screening of *Aspergillus niger* strains for biosynthesizing high activity protease

### Từ khóa:

*Aspergillus niger*, đường kính vòng thủy phân casein, hoạt tính cao, protease

### Keywords:

*Aspergillus niger*, clear zone diameter of casein hydrolysis, high activity, protease

### ABSTRACT

Twenty seven strains of black fungi isolated from the peels of citrus fruits (oranges, lemons, grapefruits), apples and figs, and 2 control strains grew on casein agar (0.5 % glycerol, 0.3 % yeast extract, 0.5 % NaCl, 2% agar and 1 % casein w/v at pH 5) to evaluate their proteolytic activities. The results showed that those strains could efficiently secrete protease when they grew on casein agar. Among these isolates, 4 strains (namely N<sub>1</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub>, Sa<sub>2</sub> which were isolated from the peels of *Citrus lemon* - “chanh num”, *Citrus maxima* - “Nam Roi” pomelo and *Citrus nobilis* - “cam sanh”) were screened based on the average clear zone diameters (d) which were larger than 10 mm, and the ratio of clear zone diameters (d) to colony diameter (D) ranging from 0.62-0.65. The highest protease activity (1.26 ± 0.16 U/mL) was observed when the combination of 2 strains Sa<sub>2</sub> and R<sub>4</sub>, with the ratio of 1:3 respectively, fermented for 2 days in liquid culture, using Czapeck Dox with 1% casein as substrate. The identification by sequencing of 28S rRNA gene revealed that 2 selected isolates, Sa<sub>2</sub> and R<sub>4</sub>, had 99 ÷ 100% identity to *Aspergillus niger*.

### TÓM TẮT

Hai mươi bảy (27) dòng nấm sợi đen có nguồn gốc từ vỏ các loại quả citrus (cam, chanh, bưởi), táo, sung và 2 dòng *Aspergillus niger* đối chứng được chủng vào môi trường agar – casein (glycerol 0,5 %; dịch chiết nấm men 0,3%; NaCl 0,5 %, agar 2 % và casein 1 %, w/v ở pH 5) để đánh giá khả năng sinh protease. Kết quả cho thấy tất cả các dòng nấm khảo sát đều có khả năng tiết ra protease khi phát triển trên môi trường agar – casein. Trong đó, 4 dòng nấm (ký hiệu N<sub>1</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub>, Sa<sub>2</sub> có nguồn gốc từ chanh nôm, bưởi Năm roi và cam sành) được tuyển chọn dựa trên tỷ lệ đường kính vòng thủy phân casein (d) lớn hơn 10 mm và tỷ lệ giữa đường kính vòng thủy phân casein (d) và đường kính vòng phát triển của nấm mốc (D) đều từ 0,62-0,65. Sự kết hợp của 2 dòng Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> với tỷ lệ 1:3 cho kết quả sinh tổng hợp protease tốt nhất, hoạt tính protease sau 2 ngày lên men lỏng trong môi trường Czapeck Dox có bổ sung 1% casein làm cơ chất cảm ứng là 1,26±0,16 U/mL. Kỹ thuật giải trình tự gene 28S rRNA cũng được áp dụng để nhận diện hai (2) dòng Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> kết quả cho thấy, 2 dòng này đều thuộc *Aspergillus niger* với mức độ đồng hình 99 ÷ 100%.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Enzyme là chất xúc tác sinh học đang được sử dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau. Nhu cầu về enzyme ngày càng tăng do hiệu quả của chúng đem lại. Trong đó, các loại enzyme vi sinh vật có nhiều ưu điểm hơn enzyme động vật và thực vật do chúng có hoạt tính thủy phân cao hơn và sản lượng lớn hơn. Bên cạnh đó, nguồn cung cấp enzyme này ổn định, không phụ thuộc theo mùa và vi sinh vật sinh trưởng nhanh trên môi trường đơn giản, rẻ tiền (Nguyễn Thị Thảo và Quyền Đình Thi, 2004). Khoảng 2% vi sinh vật trên thế giới đã được thử nghiệm là có enzyme (Padmavathi, 2013).

Protease (còn gọi là proteinase hoặc peptidase) là nhóm enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết peptide (-CO-NH-) của chuỗi polypeptide. Protease chiếm khoảng 60% thị trường enzyme công nghiệp (Rao *et al.*, 1998), trong đó, protease từ vi sinh vật chiếm khoảng 40% tổng số enzyme được bán trên toàn thế giới (Godfrey and West, 1996). Nghiên cứu tổng hợp protease từ vi sinh vật ở Việt Nam vẫn đang được tiến hành hơn thập niên qua, tuy nhiên những kết quả đạt được trong lĩnh vực này vẫn chưa đáp ứng được việc mở rộng quy mô sản xuất và ứng dụng của nhóm enzyme này trong đời sống.

*Aspergillus niger* là dòng nấm sợi phân bố rất rộng rãi trên nhiều loại cơ chất tự nhiên và trong các sản phẩm nông nghiệp (Pansear *et al.*, 2010), được biết đến với khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme, trong đó có protease (Paranthaman *et al.*, 2009). Việc tuyển chọn được dòng nấm mốc phù hợp với điều kiện môi trường ở Việt Nam, giúp thúc đẩy sự tổng hợp enzyme mong muốn đóng vai trò rất quan trọng, là cơ sở bước đầu cho việc xác định tính chất và nghiên cứu khả năng ứng dụng của protease vào thực tế. Chính vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu là tuyển chọn dòng nấm mốc bản địa phù hợp cho quá trình sinh tổng hợp protease đạt hiệu quả.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương tiện nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành tại Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

Tổng cộng 27 dòng nấm mốc màu đen đã được phân lập từ vỏ các loại quả citrus, táo và sung, đã xác định tính chất (Trần Thanh Trúc, 2013), được trữ mẫu tại Phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ

Thực phẩm, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ. Các dòng nấm này đều đã được thử nghiệm sơ bộ cho thấy có khả năng sinh trưởng tốt và có khả năng sinh protease.

Ký hiệu của các dòng nấm mốc theo nguồn phân lập từ cam sành (2 dòng: Sa<sub>2</sub>, Sa<sub>3</sub>), cam soàn (1 dòng So<sub>2</sub>), hạnh (1 dòng H<sub>4</sub>), bưởi da xanh (1 dòng X<sub>3</sub>), bưởi Năm roi (2 dòng R<sub>1</sub> và R<sub>4</sub>), chanh giấy (2 dòng G<sub>2</sub> và G<sub>4</sub>), chanh nôm (1 dòng N<sub>1</sub>), táo Red Delicious (4 dòng Re<sub>1</sub>, Re<sub>1</sub>, Re<sub>3</sub>, Re<sub>4</sub>), táo Gala (4 dòng Ga<sub>1</sub>, Ga<sub>2</sub>, Ga<sub>3</sub>, Ga<sub>4</sub>), táo ta (4 dòng: T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>), sung (5 dòng S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>6</sub>).

Hai dòng đối chứng được chọn lựa là dòng *Aspergillus niger* R92 được phân lập từ gừng, có nguồn gốc từ trường Đại học Lomonosov, Nga và dòng *Aspergillus niger*, ký hiệu V được phân lập từ đất, được trữ mẫu tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

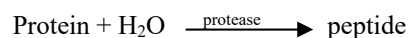
### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phương pháp phân tích và đo đạc các chỉ tiêu

*Tuyển chọn dòng A. niger đặc hiệu đối với protease:* Khả năng sinh protease được đánh giá dựa trên sự thủy phân casein thông qua đường kính của vòng thủy phân casein dựa vào chất chỉ thị màu Coomassie Brilliant Blue R-250 (Shivakumar, 2012).

*Lên men lỏng sinh tổng hợp protease:* sử dụng môi trường Czapeck Dox có 1% casein với thời gian lên men 48 giờ (Coral *et al.*, 2003).

*Xác định hoạt tính protease:* Xác định bằng phương pháp ACP (CD: 60743) trên nguyên tắc



Sự hiện diện của peptide được đo lường như đương lượng tyrosine sinh ra bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 660 nm. Trong đó, một đơn vị hoạt tính (U) được định nghĩa là lượng enzyme tương ứng với sự biến đổi màu của một microgam tyrosine sinh ra từ sự thủy phân protein (casein) do protease trong thời gian một phút ở nhiệt độ 37°C và pH 2,7.

#### 2.2.2 Phương pháp đo đạc và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại ít nhất 3 lần. Thông số tương ứng với kết quả khảo sát đã lựa chọn từ thí nghiệm trước được sử dụng làm nhân tố cố định cho thí nghiệm kế tiếp. Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion 15.2 và phần mềm Excel.

Phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định Duncan hay LSD để kết luận về sự sai khác giữa trung bình các nghiệm thức.

### 2.3 Bố trí thí nghiệm

#### 2.3.1 Thí nghiệm 1: Khảo sát sơ bộ dòng nấm mốc đặc hiệu cho quá trình sinh tổng hợp protease

Thí nghiệm được thực hiện với mục tiêu phân nhóm và tuyển chọn các dòng nấm mốc có khả năng tạo ra protease dựa trên việc đo đường kính vòng thủy phân casein trên môi trường casein - agar. Khả năng sinh protease được đánh giá dựa trên sự thủy phân casein thông qua đường kính của vòng thủy phân casein với sự nhận biết dựa vào chất chỉ thị Coomassie Brilliant Blue R-250 (Shivakumar, 2012).

Các dòng nấm mốc khảo sát được nuôi cấy trên đĩa petri với môi trường PDA, sau 2-3 ngày, ở nhiệt độ  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Sau đó, các dòng nấm này được pha thành dung dịch huyền phù bào tử nấm với mật số  $10^5$  cfu/mL (Shivakumar, 2012). Môi trường thạch với pH 5 gồm các thành phần chính là glycerol 0,5%, dịch trích nấm men 0,3%, NaCl 0,5%, agar 2% và casein 1%. Môi trường trên được đun tan chảy và cho vào các đĩa petri, sau đó dùng khoan nút đục lỗ trên đĩa thạch (đường kính 3 mm). Chủng vào mỗi lỗ 0,1 mL huyền phù bào tử nấm (mật số  $10^5$  cfu/mL) đã chuẩn bị, ủ ở nhiệt độ  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Sau 24 giờ ủ, nhỏ dung dịch Coomassie Brilliant Blue R-250 lên bề mặt thạch, để yên 2 giờ. Đo đường kính vòng thủy phân casein (d, mm) và đường kính vòng phát triển của nấm mốc (D, mm).

Việc chọn lựa các dòng nấm mốc có khả năng tổng hợp protease cao dựa vào đường kính vòng thủy phân casein.

#### 2.3.2 Thí nghiệm 2: Khảo sát khả năng kết hợp của các dòng nấm mốc đặc hiệu có khả năng sinh tổng hợp protease cao

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu lựa chọn phương án kết hợp các dòng nấm mốc đặc hiệu để hoạt tính protease thu được là cao nhất từ các dòng nấm mốc được tuyển chọn mang khả năng sinh protease cao ở thí nghiệm 1 (dự kiến 4 dòng nấm, ký hiệu 1, 2, 3 và 4, kết hợp cặp đôi theo tỷ lệ huyền phù bào tử 1:1).

Thí nghiệm được thực hiện tương tự thí nghiệm 1. Các dòng nấm mốc có khả năng sinh protease cao trong thí nghiệm 1 được chọn và huyền phù được pha loãng đến mật số  $10^5$  cfu/mL. Riêng các nghiệm thức kết hợp của hai dòng nấm mốc, tỷ lệ

phối trộn của hai dòng nấm mốc là 1:1 và được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Huyền phù bào tử nấm của 4 dòng riêng lẻ và 6 nghiệm thức kết hợp sẽ được chủng vào môi trường casein - agar.

Hai dòng nấm mốc kết hợp thích hợp có khả năng tạo ra protease nhiều nhất dựa theo đường kính vòng thủy phân casein d (mm) và tỷ lệ d/D (đường kính vòng thủy phân casein/ đường kính vòng phát triển của nấm mốc).

#### 2.3.3 Thí nghiệm 3: Khảo sát sự ảnh hưởng của tỷ lệ kết hợp hai dòng nấm mốc đặc hiệu đến khả năng sinh tổng hợp protease

Mục tiêu của thí nghiệm này là đánh giá tác động của việc kết hợp 2 dòng nấm mốc đặc hiệu (được lựa chọn ở thí nghiệm 2) với các tỷ lệ khác nhau đến khả năng sinh protease vào môi trường.

Nghiên cứu được thực hiện giống như ở thí nghiệm 2 với 2 dòng nấm kết hợp có tính đặc hiệu với protease đã được lựa chọn từ thí nghiệm 2. Tuy nhiên, huyền phù bào tử nấm mốc của 2 dòng ở cùng mật số  $10^5$  cfu/mL được phối trộn theo các tỷ lệ kết hợp khác nhau, thay đổi từ 1: 1, 2: 1 (1:2), 3: 1 (1:3) và 4: 1 (1:4),...

Bên cạnh đó, 7 tỷ lệ huyền phù bào tử của 2 dòng nấm mốc đã được chọn lựa cũng được lên men lỏng để xác định hiệu quả sinh tổng hợp protease. Quá trình lên men trong bình tam giác 250 mL chứa 60 mL môi trường Czapeck Dox có bổ sung 1% casein, thanh trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong 20 phút. Chủng vào 1 mL hỗn hợp huyền phù bào tử nấm ( $10^5$  cfu/mL) ở các tỷ lệ kết hợp khác nhau theo khảo sát và ủ ở nhiệt độ  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 48 giờ (Coral *et al.*, 2003). Enzyme thô thu được sau quá trình lọc sinh khối bằng giấy lọc Whatman, sử dụng để xác định hoạt tính protease (U/mL).

Tỷ lệ kết hợp của 2 dòng nấm mốc được chọn lựa dựa trên đường kính vòng thủy phân casein d (mm), tỷ lệ d/D và hoạt tính protease thu được tương ứng từ quá trình lên men lỏng.

#### 2.3.4 Nhận diện dòng nấm mốc đã tuyển chọn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Áp dụng kỹ thuật PCR giải trình tự gene 28S rRNA và tra cứu bằng phần mềm Blast N để định loại chính xác *A. niger*. Đoạn mồi U<sub>1</sub>/U<sub>2</sub> (Sandhu *et al.*, 1995) được sử dụng để khuếch đại một đoạn 260 bp của khu vực D1/D2 đoạn gene 28S rDNA:

U<sub>1</sub> GC (5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GTG AAA TTG TTG

AAA GGG AA - 3'; Sigma) ; U<sub>2r</sub> (5' - GAC TCC TTG GTC CGT GTT - 3'; Sigma)

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Đánh giá khả năng sinh tổng hợp protease từ các dòng nấm mốc bản địa

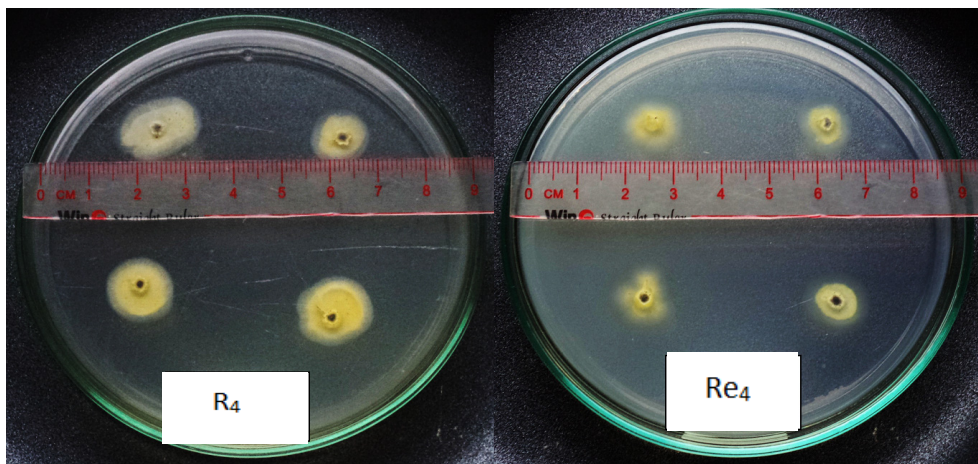
Vòng thủy phân casein có mối quan hệ với lượng protease tiết ra bởi nấm mốc (Vermelho *et al.*, 1996). Dựa vào kết quả thí nghiệm, các dòng nấm mốc được phân thành các nhóm riêng biệt theo tỷ lệ giữa đường kính vòng thủy phân casein (d) và đường kính vòng phát triển của nấm mốc (D) và dao động từ 0,39 đến 0,65. Hình ảnh minh họa hiệu quả thủy phân casein của 2 dòng *A. niger* điển hình R<sub>4</sub> và Re<sub>4</sub> (Hình 1) cho thấy, đường kính vòng thủy phân casein của dòng Re<sub>4</sub> khá nhỏ khi so

sánh mẫu R<sub>4</sub>.

– Ở tỷ lệ d/D <0,5 thể hiện khả năng thủy phân casein thấp gồm 4 dòng: Re<sub>1</sub>, Ga<sub>4</sub>, Nga, Re<sub>3</sub> có đường kính vòng thủy phân thấp (5,02÷7,80mm) mặc dù đường kính vòng phát triển của nấm mốc tương đối lớn (12,97÷15,92).

– Ở tỷ lệ (0,5 ≤ d/D <0,6) gồm 18 dòng (S<sub>3</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>4</sub>, X<sub>3</sub>, G<sub>2</sub>, Ga<sub>2</sub>, G<sub>4</sub>, Sa<sub>3</sub>, T<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, Re<sub>4</sub>, T<sub>2</sub>, Re<sub>2</sub>, Ga<sub>3</sub>, Ga<sub>1</sub>) với khả năng thủy phân casein và phát triển ở mức tương đối. Các dòng này có khả năng sinh tổng hợp protease nhưng không phải là dòng đặc hiệu.

– Các dòng còn lại có tỷ lệ d/D > 0,6 (bảng 1) với vòng thủy phân và phát triển lớn gồm 7 dòng: Sa<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, N<sub>1</sub>, R<sub>1</sub>, V, S<sub>1</sub>, T<sub>1</sub> (nhóm 3).



Hình 1: Vòng thủy phân protease trên môi trường casein - agar sau 24 giờ ủ ở 30°C và nhận diện với thuốc thử Coomassie Brilliant Blue R-250 1%

Bảng 1: So sánh hiệu quả thủy phân casein của các dòng *A. niger* mạnh

TT	Dòng <i>A. niger</i>	Đường kính vòng thủy phân casein (d, mm)	Đường kính phát triển của nấm mốc (D, mm)	Tỷ lệ d/D
1	T <sub>1</sub>	8,42±0,85 <sup>b</sup>	13,96±1,27 <sup>c</sup>	0,60± 0,02 <sup>c</sup>
2	S <sub>1</sub>	10,29±0,43 <sup>a</sup>	17,00±0,77 <sup>a</sup>	0,61± 0,02 <sup>bc</sup>
3	V	8,96±0,19 <sup>b</sup>	14,50±0,32 <sup>c</sup>	0,62± 0,02 <sup>bc</sup>
4	N <sub>1</sub>	10,50±0,52 <sup>a</sup>	16,96±0,77 <sup>a</sup>	0,62± 0,01 <sup>bc</sup>
5	R <sub>1</sub>	10,33±0,49 <sup>a</sup>	16,46±0,89 <sup>ab</sup>	0,63± 0,02 <sup>ab</sup>
6	R <sub>4</sub>	10,12±0,41 <sup>a</sup>	15,63±0,77 <sup>b</sup>	0,65± 0,02 <sup>a</sup>
7	Sa <sub>2</sub>	10,63±0,47 <sup>a</sup>	16,38±0,97 <sup>ab</sup>	0,65± 0,03 <sup>a</sup>

Các giá trị mẫu tự đi kèm giống nhau ở cùng một cột khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê theo phép thử Duncan ở độ tin cậy 95%

Đặc biệt dòng Sa<sub>2</sub> có nguồn phân lập từ vỏ quả cam sành có tỷ lệ d/D cao nhất (0,65) trong các dòng khảo sát với đường kính vòng thủy phân casein 10,63 mm và đường kính phát triển của nấm mốc là 16,38 mm. Đáng chú ý là các dòng V, T<sub>1</sub> có

vòng thủy phân casein không cao lần lượt là 8,96 mm và 8,42 mm nhưng tỷ lệ với sự phát triển của nấm mốc nên tỷ số d/D lớn. Các dòng Sa<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>, N<sub>1</sub>, V có tỷ lệ d/D cao (d/D ≥ 0,62) nhưng có sự khác biệt về đường kính vòng thủy phân casein. Các dòng Sa<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, N<sub>1</sub>, R<sub>1</sub> có đường kính vòng thủy

phân casein (d) lớn dao động từ 10,12 đến 10,63 mm nhưng ngược lại giá trị d của dòng V lại thấp (8,96 mm).

Kết quả đo đạc cũng cho thấy, hầu hết các dòng nấm mốc có nguồn gốc từ táo Gala, Táo Red Delicious và gừng đều cho hoạt tính protease không cao (thể hiện ở giá trị tỷ lệ d/D nhỏ), trong khi đó không có dòng nấm được phân lập từ chanh giấy, bưởi da xanh, hạnh, cam xoàn có tỷ lệ  $d/D \geq 0,6$ . Với 4 dòng được phân lập từ táo ta đã thu được dòng T<sub>1</sub> có hoạt tính protease cao. Trong 5 dòng phân lập được từ sung, dòng S<sub>1</sub> thể hiện khả năng sinh tổng hợp protease cao. Điều này góp phần khẳng định tác động của nguồn phân lập đến khả năng sinh tổng hợp một loại enzyme đặc hiệu, cụ thể ở đây là protease. Đồng thời, với cùng một nguồn phân lập, không phải tất cả các dòng nấm mốc cùng loài đều có khả năng sinh tổng hợp một loại enzyme nhất định giống nhau (Sharma and De, 2011). Nhiều nghiên cứu tuyển chọn dòng vi sinh vật đặc hiệu đối với protease dựa trên đường kính vòng thủy phân protein đặc hiệu trên môi trường casein – agar hay gelatin – agar (Radha *et al.*, 2012; Karthic *et al.*, 2014) cũng cho kết quả tương tự. Nghiên cứu gần đây nhất của Karthic *et al.* (2014) đã đề xuất sử dụng môi trường casein – agar ở pH 5 để tuyển chọn dòng *Aspergillus oryzae* đặc hiệu với protease ura acid và cho thấy dòng *Aspergillus oryzae* được tuyển chọn có đường kính vòng thủy phân casein là 1,15 cm, tuy nhiên trong thành phần môi trường ngoài casein còn bổ sung các dưỡng chất khác (g/L) như glucose 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,52; KCl 0,52; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,52. Shivakumar (2012) cũng đã tuyển chọn các dòng *Aspergillus* bản địa được phân lập từ đất ở Bangalore (Ấn Độ) đặc hiệu với protease ura acid sử dụng môi trường casein – agar ở pH 5. Nghiên cứu cũng đề xuất các dòng *Aspergillus* có đường kính vòng thủy phân casein lớn hơn 10 mm vào nhóm có khả năng sinh tổng hợp protease mạnh. Đồng thời, dòng *Aspergillus niger* có ưu thế đối với protease hơn hẳn các dòng *Aspergillus* cùng được phân lập từ đất.

Dựa trên các kết quả thu nhận, các dòng Sa<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, N<sub>1</sub>, R<sub>1</sub> được chọn là các dòng đặc hiệu đối với protease ura acid.

Việc khảo sát sự tương tác của hai dòng nấm mốc cùng loại nhằm tăng cường hiệu quả hoạt động sinh enzyme là bước cơ bản, đầu tiên có thể được áp dụng (Zhong-Tao *et al.*, 2009). Trên cơ sở này, tiến hành xác định khả năng kết hợp 4 dòng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp protease hiệu quả nhất (dòng Sa<sub>2</sub>, N<sub>1</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>).

### 3.2 Đánh giá khả năng kết hợp dòng nấm mốc đặc hiệu đến hiệu quả thu nhận protease

Khi quan sát sự phát triển của nấm mốc và sự thay đổi đường kính vòng thủy phân casein trên môi trường casein – agarose cho thấy, việc kết hợp hai dòng nấm mốc ở tỷ lệ 1 : 1 cho hiệu quả cải thiện hơn khi sự kết hợp giữa hai dòng có hoạt tính mạnh tương đồng nhau (Sa<sub>2</sub>+N<sub>1</sub>) hay các sự kết hợp còn lại giữa một dòng yếu với một dòng mạnh. Kết quả được thể hiện qua Bảng 2.

**Bảng 2:** Ảnh hưởng của dòng nấm mốc *Aspergillus niger* kết hợp đến hiệu quả thủy phân casein

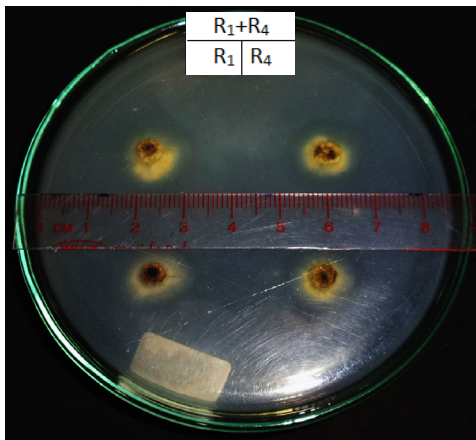
TT	Dòng <i>A. niger</i>	Đường kính vòng thủy phân casein (d, mm)	Đường kính phát triển nấm mốc (D, mm)	Tỷ lệ d/D
1	N <sub>1</sub>	10,50±0,74 <sup>c</sup>	17,00±1,01 <sup>a</sup>	0,62±0,01 <sup>c</sup>
2	R <sub>1</sub>	10,25±0,20 <sup>c</sup>	16,50±0,48 <sup>ab</sup>	0,62±0,01 <sup>c</sup>
3	R <sub>4</sub>	10,06±0,31 <sup>c</sup>	15,38±0,52 <sup>bc</sup>	0,65±0,01 <sup>d</sup>
4	Sa <sub>2</sub>	10,56±0,24 <sup>c</sup>	16,00±0,41 <sup>abc</sup>	0,66±0,03 <sup>d</sup>
5	N <sub>1</sub> +R <sub>4</sub>	10,75±1,17 <sup>bc</sup>	15,81±1,43 <sup>abc</sup>	0,67±0,02 <sup>cd</sup>
6	R <sub>1</sub> +N <sub>1</sub>	11,50±0,74 <sup>ab</sup>	17,00±0,68 <sup>a</sup>	0,68±0,02 <sup>bcd</sup>
7	Sa <sub>2</sub> +R <sub>1</sub>	11,50±0,61 <sup>ab</sup>	16,69±0,94 <sup>a</sup>	0,69±0,01 <sup>bc</sup>
8	R <sub>1</sub> +R <sub>4</sub>	10,69±0,55 <sup>bc</sup>	15,25±0,65 <sup>c</sup>	0,70±0,02 <sup>ab</sup>
9	Sa <sub>2</sub> +N <sub>1</sub>	11,50±0,54 <sup>ab</sup>	16,38±0,60 <sup>abc</sup>	0,70±0,02 <sup>ab</sup>
10	Sa <sub>2</sub> +R <sub>4</sub>	12,13±0,48 <sup>a</sup>	16,94±1,30 <sup>a</sup>	0,72±0,03 <sup>a</sup>

Các giá trị mẫu tự đi kèm giống nhau ở cùng một cột khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê theo phép thử Duncan ở độ tin cậy 95%

Hình ảnh minh họa hiệu quả thủy phân protein của 2 dòng *A. niger* là R<sub>1</sub> và R<sub>4</sub> kết hợp cho thấy, đường kính vòng thủy phân casein của R<sub>1</sub>+R<sub>4</sub> không có sự khác biệt so với hai dòng R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> riêng

lẻ. Điều này có lẽ là do 2 dòng này đều xuất phát từ một nguồn phân lập (bưởi Năm Roi) nên không có sự khác biệt rõ về đặc điểm và không có tác động

kích thích hoạt động, sinh tổng hợp enzyme từ nấm mốc này.



**Hình 2: Vòng thủy phân casein của 2 dòng *A. niger* R<sub>1</sub>+R<sub>4</sub> và R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> riêng lẻ**

Tuy nhiên, trường hợp kết hợp hai dòng có khả năng tổng hợp protease với hoạt tính cao hơn (Sa<sub>2</sub> và N<sub>1</sub>) lại có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê so với hai dòng riêng lẻ tương ứng. Bên cạnh đó, sự kết hợp của hai dòng Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> cho hiệu quả thu nhận protease cao vượt trội và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê khi so sánh với các nghiệm thức còn lại. Tỷ lệ d/D của sự kết hợp này cũng mang

giá trị lớn nhất (0,72). Nghiên cứu của Wang *et al.* (2006) cũng cho thấy sự kết hợp giữa hai dòng sinh tổng hợp protease mạnh nhất (3,385±26 U/g và 1,049±18 U/g) lại không cho hiệu quả cao (1,675±22 U/g). Trong khi đó, sự kết hợp giữa dòng mạnh nhất (3,385±26 U/g) với một dòng yếu hơn (1,030±19 U/g) lại cho kết quả tốt nhất (3,944±34 U/g). Nghiên cứu của Colombatto *et al.* (2005) đã chứng minh sự tương tác của hai dòng đồng khả năng nhằm gia tăng hiệu quả sinh tổng hợp một loại enzyme khác (cellulase). Điều này hoàn toàn phù hợp với quy luật phát triển của vi sinh vật trong quá trình sinh trưởng và phát triển (Đặng Thị Thu và Nguyễn Thị Xuân Sâm, 2009).

Dựa trên kết quả khảo sát, hai dòng nấm mốc R<sub>4</sub> và Sa<sub>2</sub> được lựa chọn để nghiên cứu tỷ lệ kết hợp của hai dòng này trong quá trình sinh tổng hợp protease.

**3.3 Đánh giá khả năng kết hợp hai dòng Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> đặc hiệu theo tỷ lệ khác nhau đến hiệu quả sinh tổng hợp protease**

Cặp nấm mốc Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> được kết hợp với các tỷ lệ khác nhau nhằm tìm ra tỷ lệ kết hợp tốt nhất cho sự sinh tổng hợp protease và kết quả được tổng hợp ở Bảng 3.

**Bảng 3: Ảnh hưởng của tỷ lệ kết hợp hai dòng Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> đến hiệu quả sinh tổng hợp protease hoạt tính cao**

TT	Tỷ lệ kết hợp Sa <sub>2</sub> :R <sub>4</sub>	Đường kính vòng thủy phân casein (d, mm)	Đường kính vòng phát triển nấm mốc (D, mm)	Tỷ lệ d/ D	Hoạt tính protease (U/mL)
1	1:1	12,31±0,43 <sup>bc</sup>	16,88±0,25 <sup>c</sup>	0,72±0,04 <sup>a</sup>	0,73±0,08 <sup>b</sup>
2	1:2	12,44±0,31 <sup>ab</sup>	16,9±0,31 <sup>c</sup>	0,73±0,03 <sup>ab</sup>	0,73±0,11 <sup>b</sup>
3	1:3	13,13±0,48 <sup>a</sup>	17,31±0,38 <sup>bc</sup>	0,76±0,03 <sup>a</sup>	1,26±0,16 <sup>a</sup>
4	1:4	12,19±0,24 <sup>bcd</sup>	17,13±0,14 <sup>bc</sup>	0,71±0,01 <sup>b</sup>	0,69±0,09 <sup>b</sup>
5	2:1	12,63±0,43 <sup>ab</sup>	17,19±0,75 <sup>bc</sup>	0,74±0,02 <sup>ab</sup>	0,74±0,05 <sup>b</sup>
6	3:1	11,50±0,35 <sup>d</sup>	17,81±0,38 <sup>ab</sup>	0,65±0,02 <sup>c</sup>	0,46±0,07 <sup>c</sup>
7	4:1	11,63±0,78 <sup>cd</sup>	18,63±0,92 <sup>a</sup>	0,62±0,04 <sup>c</sup>	0,42±0,11 <sup>cd</sup>
8	1:0	10,56±0,24 <sup>c</sup>	16,00±0,41 <sup>d</sup>	0,66±0,03 <sup>c</sup>	0,32±0,05 <sup>cd</sup>
9	0:1	10,06±0,31 <sup>c</sup>	15,38±0,52 <sup>d</sup>	0,65±0,01 <sup>c</sup>	0,29±0,07 <sup>d</sup>

Các giá trị mẫu tự đi kèm giống nhau ở cùng một cột khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê theo phép thử Duncan ở độ tin cậy 95%

Từ kết quả thống kê đường kính vòng thủy phân casein (d) trên môi trường thạch casein thấy rằng sự thay đổi tỷ lệ kết hợp của hai dòng nấm mốc có sự khác biệt lớn đến hiệu quả sinh tổng hợp protease. Ở các tỷ lệ kết hợp của Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> là 3:1, 4:1 đường kính vòng thủy phân casein không được cải thiện. Khả năng sinh tổng hợp protease ở các tỷ lệ kết hợp này thấp (11,50-11,63 mm) và tỷ số d/D nhỏ. Bên cạnh đó, tỷ lệ kết hợp của dòng Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub>

là 1:1 và 1:2 cho hiệu quả cải thiện hoạt tính protease khá cao với giá trị tỷ lệ d/D là 0,72-0,73. Ở tỷ lệ sử dụng 1:3 hay 2:1 của hai dòng nấm mốc này, đường kính thủy phân casein (d) lần lượt là 13,13 và 12,63 mm và tỷ lệ d: D tương ứng là 0,76 và 0,74. Xét về hoạt tính protease thu được ở 7 tỷ lệ kết hợp khác nhau, kết quả khảo sát cũng cho thấy, hoạt tính protease thu được có giá trị khá thấp khi lên men riêng lẻ một dòng nấm mốc Sa<sub>2</sub> hay

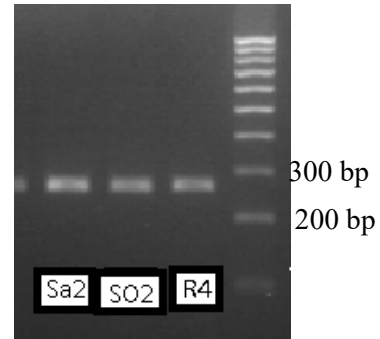
R<sub>4</sub>, trong khi đó, việc sử dụng kết hợp 2 dòng Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> ở tỷ lệ 1: 3 cho hoạt tính protease cao khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh với các tỷ lệ còn lại. Sự kết hợp của 2 dòng này ở tỷ lệ 2: 1 hầu như không tạo ra sự khác biệt về hoạt tính protease khi so sánh với các tỷ lệ 1: 1 hay 1:2. Nghiên cứu của Wang *et al.* (2006) cũng tìm ra tỷ lệ 1:4 của sự kết hợp hai dòng *A. niger* sinh tổng hợp protease mạnh và yếu cũng như tỷ lệ 1:1 của hai dòng *A. niger* đồng khả năng là điều kiện kết hợp thích hợp cho sự cải thiện đáng kể sự sinh tổng hợp đồng thời hemicellulase, pectinase, cellulase, glucoamylase và protease.

Từ các kết quả thu nhận cho thấy, việc nghiên cứu tuyển chọn và kết hợp hai dòng *A. niger* Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> trong quá trình sinh tổng hợp protease là có tính khả thi. Dựa trên kết quả khảo sát, mức tỷ lệ kết hợp của hai dòng *A. niger* cho các nghiên cứu tiếp theo về xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men sinh tổng hợp protease.

**3.4 Nhận diện 2 dòng Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> và bằng kỹ thuật sinh học phân tử**

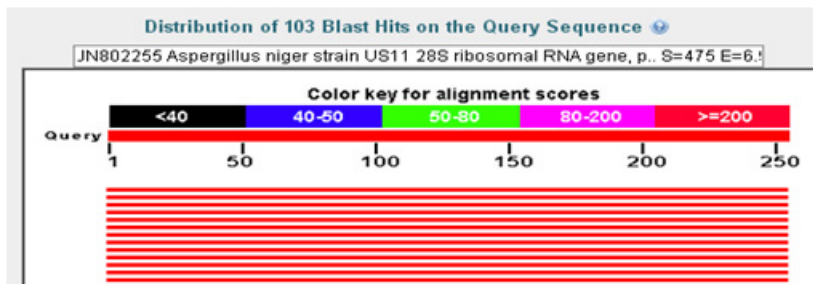
Hai dòng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp

PME hoạt tính cao (R<sub>4</sub> và Sa<sub>2</sub>) được tiến hành định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Tiến hành khuếch đại đoạn 260 bp của vùng 28S – rDNA bằng cặp mồi đặc chủng U<sub>1</sub> và U<sub>2</sub>. Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA của 2 dòng nấm mốc R<sub>4</sub> và Sa<sub>2</sub> có băng tương ứng ở vị trí 260 bp so với thang chuẩn (Hình 3).



**Hình 3: Phổ điện di của sản phẩm PCR của các mẫu nấm được khuếch đại**

Bìa phải: thang chuẩn 100 bp plus; 3 giếng còn lại tương ứng với 3 mẫu nấm R<sub>4</sub>, SO<sub>2</sub> và Sa<sub>2</sub>



Sequences producing significant alignments:

[Alignments](#)[Download](#)[GenBank](#)[Graphics](#)[Distance tree of results](#) Show/hide columns of the table presenting sequences producing significant alignments

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<a href="#">Aspergillus niger strain US11 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	475	475	100 %	7e-131	100%	<a href="#">JN802255.1</a>

*Aspergillus niger* strain US11 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

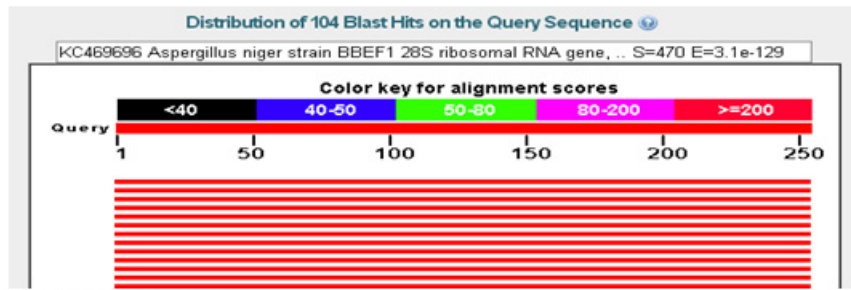
Sequence ID: [gb|JN802255.1|](#) Length: 859 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 361 to 617 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
475 bits(257)	7e-131	257/257(100%)	0/257(0%)	Plus/Plus

**Hình 4: Tỷ lệ tương đồng về gene của dòng nấm Sa<sub>2</sub> và dòng *A. niger* US11**



Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<u><i>Aspergillus niger</i> strain BBEF1 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	470	470	100%	3e-129	100%	<a href="#">KC469696.1</a>

*Aspergillus niger* strain BBEF1 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KC469696.1|](#) Length: 482 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 158 to 411 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
470 bits(254)	3e-129	254/254(100%)	0/254(0%)	Plus/Minus

**Hình 5: Tỷ lệ tương đồng về gene của dòng nấm R<sub>4</sub> và dòng *A. niger* BBEF1**

Trình tự gene 28S rRNA của hai dòng Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> được xác định gồm:

– Trình tự gene 28S rRNA của dòng Sa<sub>2</sub>:

CATTCGTGCCGGTGTACTTCCCCGTGGG  
CGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCA  
AAGGCCCTGGAATGTAGTGCCTCCGGGG  
CACCTTATAGCCAGGGGTGCAATGCGGCCA  
GCCTGGACCGAGGAACGCGCTTCGGCACG  
GACGCTGGCATAATGGTCGTAACGACCCG  
TCTTGA AACACGGACCAAGGAGTCTAACAT  
CTACGCGAGTGTTCCGGGTGTCAAACCCGTG  
CGCGCAGTGAAAG CGAACGG (Tổng số  
nucleotid: 257).

– Trình tự gene 28S rRNA của dòng R<sub>4</sub>

CAGGCTGGCCGCATTGCACCCCTGGCTA  
TAAGGTGCCCGGAGGGCACTACATTCCAG  
GGGCTTTGACCGGCCGCCAAACCGACGC  
TGGCCCGCCACGGGGAAGTACACCGGCA  
CGAATGCCGGCTGAACCCCGGGGCGAGT  
CTGGTCGCAAGCGTTCCTTTCAACAATT  
TCACGTGCTGTTAACTCTCTTTTCAAAGTG  
CTTTTCATCTTTTCGATCACTCTACTTGTGCG  
CTATCGGTCTCC GGCC (Tổng số nucleotid:  
254).

Sử dụng phần mềm Blast N, so sánh với trình tự DNA của các dòng nấm mốc có trong ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy, dòng Sa<sub>2</sub> có tỷ lệ đồng

hình với *A. niger* US11 là 100% (Hình 4), dòng R<sub>4</sub> có tỷ lệ đồng hình với *A. niger* BBEF1 là 100% (Hình 5).

#### 4 KẾT LUẬN

Từ 27 dòng nấm mốc bản địa, sau quá trình tuyển chọn từng dòng riêng lẻ bằng phương pháp đo vòng thủy phân casein trên môi trường casein – agar và kết hợp theo kiểu tương tác cặp đã tìm ra 2 dòng *Aspergillus niger* Sa<sub>2</sub> và R<sub>4</sub> với tỷ lệ phối trộn của huyền phù bào tử nấm (mật số 10<sup>5</sup> cfu/mL) theo thứ tự kết hợp giữa hai dòng là 1:3 (v/v) cho hiệu quả thu nhận protease tốt nhất. Hoạt tính protease thu được thông qua phương pháp lên men lỏng trên môi trường Czapeck Dox có 1% casein là 1,26±0,16 U/mL.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Colombatto D., F.L. Mould, M.K. Bhatt, D.P. Morgavi, K.A. Beauchemin and E. Owen, 2005. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Animal Science*. 81(4): 1040–1050.
- Coral G., B. Arikan, M.N. Ünaldi and H. Güvenmez, 2003. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annal Microbiology*. 3: 491–498.



- Đặng Thị Thu và Nguyễn Thị Xuân Sâm, 2009. Công nghệ enzyme. Trích dẫn từ: Cơ sở Công nghệ Sinh học (chủ biên Đặng Thị Thu). Nhà xuất bản Giáo dục, Việt Nam.
- Godfrey T. and S. West, 1996. Industrial Enzymology, 2nd edition. MacMillan Publishers Inc., New York.
- Karthic J., Y. Saroj, M. Naveen, T. Pramod, and K.G. Siddalingeshwara, 2014. Characterization of *Aspergillus oryzae* protease through submerged fermentation. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(5): 1023-1028.
- Nguyễn Thị Thảo và Quyền Đình Thi, 2004. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của chủng *Serratia sp.* DT3. Tạp chí Công nghệ Sinh học. 2(2): 205-126.
- Padmavathi, M. 2013. Identification, characterization, optimization studies and applications of protease enzyme from *Bacillus licheniformis*. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. 3: 1920-1926.
- Panesar P.S., K. Shweta and R. Panesar, 2010. Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. Enzyme Research. 10: 1–16.
- Paranthaman, R., K. Alagusundaram and J. Indhumathi, 2009. Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. World Journal of Agricultural Sciences. 5 : 308-312.
- Rao M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge and V. Deshpande, 1998. Molecular and biotechnology aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 597-635.
- Sandhu G.S., B.C. Kline, L. Stockman, G.D. Roberts, 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. Journal of Clinical Microbiology. 33: 2913–2919.
- Sharma N. and K. De, 2011. Production, purification and crystallization of an alkaline protease from *Aspergillus tamari* [EF661565.1]. Agriculture and Biology Journal of North America. 2(7): 1135-1142.
- Shivakumar, S., 2012. Production and characterization of an acid Protease from a local *Aspergillus Sp.* by Solid substrate fermentation. Archives of Applied Science Research. 4: 188-199.
- Trần Thanh Trúc, 2013. Phân lập và tuyển chọn một số dòng *Aspergillus niger* có khả năng sinh pectin methylesterase hoạt tính cao. Luận án Tiến sĩ ngành Vi sinh vật, Trường Đại học Cần Thơ, Cần Thơ.
- Vermelho A. B., M. N. L. Meirelles, A. Lopes, S. D. G. Petinate, A. A. Chaia and H. H. Branquinha, 1996. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. Mem Inst Oswaldo Cruz. 91(6): 755-760.
- Wang, X.J., J.G. Bai and Y. X. Liang, 2006. Optimization of multienzyme production by two mixed strains in solid-state fermentation. Apply of Microbiological Biotechnology. 73(3): 533-540.
- Zhong-Tao, S., T. Lin Mao, L. Cheng and D. Jin- Hua, 2009. Bioconversion of apple pomace into a multienzyme bio-feed by two mixed strains of *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Electronic Journal of Biotechnology. 12: 1– 13.