

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN DINH DƯỠNG LÊN SINH TỔNG HỢP XENLULAZA (typ CMC aza) Ở ASPERGILLUS NIGER

LÊ HỒNG MAI, NGUYỄN DINH QUYẾN

Sự tăng nhanh dân số thế giới và bậu quả là nạn khan hiếm trầm trọng protein hiện nay — nhất là ở các nước đang phát triển khiến các nhà sinh học ngày càng quan tâm đến vấn đề tăng sản lượng thịt trong chăn nuôi bằng cách tăng giá trị dinh dưỡng của thức ăn cho động vật, đồng thời tận dụng một cách có hiệu quả các phế phụ phẩm nông nghiệp. Vì vậy mà việc chuyển hóa sinh học các bã xenluloza thành thức ăn bổ sung cho gia súc đang là một trong những hướng nghiên cứu chính của sinh học thực nghiệm và ứng dụng

Theo hướng này, người ta đã chú ý nghiên cứu và sử dụng các loại nấm sợi có khả năng phân giải xenluloza như *Myrothecium verrucaria*, *Tricoderma viride*, *Chaetomium cellulolyticum* và *Penicillium janthinellum*.

A. niger là loại nấm sợi có khả năng tổng hợp mạnh mẽ axit xitric và glucoamylaza. Ngoài ra, nấm còn có khả năng phân giải xenluloza và pectin khi mạnh. Nấm không sinh độc tố như nhiều loài *Aspergillus* khác, lại sinh trưởng dễ dàng trên các phế phụ phẩm chứa xenluloza nên gần đây đã được nghiên cứu sử dụng làm nguồn protein đơn bào Xenlulaza ở *A. niger* cũng được một số tác giả quan tâm

Việc thu nhận enzym từ vi sinh vật nói chung và xenlulaza nói riêng trước đây vẫn chỉ được thực hiện trong môi trường lỏng. Tuy vậy, việc lên men ở trạng thái đặc đã bắt đầu được đề cập đến [2,4].

Trong bài này, chúng tôi sơ bộ tìm hiểu ảnh hưởng của một số điều kiện dinh dưỡng lên khả năng tổng hợp xenlulaza (typ CMG-aza) ở *A. niger* nuôi cấy trên môi trường đặc

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

A. niger chủng ít sinh bào tử, thuộc bộ sưu tập vi sinh vật của bộ môn Vi sinh vật trường Đại học Tổng hợp Hà Nội. Nấm được giữ trên môi trường Czapek-Dox và được nhân giống trong môi trường Hansen.

Môi trường cơ sở dùng sản xuất xenlulaza là cám gạo, vỏ lạc, lõi ngô, rơm bã mía. Sau khi rửa sạch, sấy khô, nghiền nhỏ, các cơ chất này được phân vào bình nón 250ml với tỉ lệ 10g/bình. Bổ sung nước máy 10-20ml/bình, khử trùng 1 atm/30min. Nuôi cấy ở 30°C/5 ngày. Thêm vào mỗi bình 50ml nước cất hoặc dịch đệm, lắc đều, giữ 3 giờ rồi lọc. Dịch lọc thu được dùng làm nguồn xenlulaza thô.

Hoạt tính CMC-aza được xác định bằng phương pháp khuếch tán phóng xạ trên thạch đĩa với cơ chất là cacboximetil xenluloza 0,3% (Serva CHLB Đức). Khoan các lỗ trên thạch, rỏ vào mỗi lỗ 0,2 ml dịch enzym, giữ các đĩa thạch ở 50°C/24 giờ. Rỏ lên bề mặt thạch dung dịch Lugol và đo kích thước vòng phân giải CMC.

Hoạt tính CMC – aza cũng được xác định theo phương pháp đo độ nhớt (FPal et al., 1981) và phương pháp đo đường khử (Saddler et al., 1976), đường khử xác định theo phương pháp Nelson – somogyi (1941).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của các nguồn cacbon tự nhiên lên sinh tổng hợp CMC-aza ở A. niger.

Nhiều sản phẩm phụ của nông nghiệp cho đến nay vẫn chưa được sử dụng hợp lý: rơm rạ, vỏ lạc, bã mía, lõi ngô, mùn cưa... Do đó, thăm dò khả năng tận dụng những nguồn cacbon tự nhiên này nâng cao giá trị dinh dưỡng của chúng nhờ xenulaza của nấm sợi là việc làm có nhiều ý nghĩa.

Các nguồn xenuloza tự nhiên có ảnh hưởng khác nhau lên sinh tổng hợp xenulaza ở nấm sợi. Chẳng hạn, Rao et al (1983) cho biết *Pestalotiopsis versicolor* cho hoạt tính enzym cao nhất trên bã mía và thấp nhất trên cám mì. Mặt khác, rơm rạ xử lý bằng xút không làm tăng hoạt tính so với không xử lý.

Trong thí nghiệm của chúng tôi, *A. niger* được nuôi trên 5 cơ chất, cám vỏ lạc, rơm, lõi ngô, bã mía. Kết quả (bảng 1) cho thấy nấm tổng hợp CMC – aza mạnh nhất trên cám, rồi đến vỏ lạc và lõi ngô. Trên rơm và bã mía hoạt tính enzym không đáng kể. Ngoài ra cũng thấy việc xử lý trước cơ chất (vỏ lạc) bằng xút 1% không có hiệu quả rõ rệt đối với sinh tổng hợp enzym.

Bảng 1: Ảnh hưởng của các nguồn cacbon tự nhiên

lên sinh tổng hợp CMC ở A. niger

Nguồn cacbon	Hoạt tính CMC – aza	
	D – d, cm	Glucosa, mg/ml
Cám	2,40	240
Vỏ lạc (không xử lý)	1,75	130
Vỏ lạc (có xử lý)	1,80	140
Lõi ngô	1,60	90
Rơm	1,10	50
Bã mía	0,90	40

Ghi chú: D – đường kính vòng phân giải CMC

d – đường kính lỗ khoan thạch

Ảnh hưởng của các nguồn cacbon tinh khiết lên sinh tổng hợp CMC – aza ở A. niger.

Nấm được nuôi cấy trên môi trường Czapek-Dox với tinh bột, glucosa xacarrozo lactoza và cacboximetil xenuloza (hàm lượng 1%) là nguồn cacbon duy nhất.

Kết quả thu được bằng phương pháp đo độ nhớt (bảng 2) cho thấy tinh bột có ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng sinh CMC – aza ở *A. niger*, rồi đến xacca-

roza, glucoza. Lactoza và CMC có ảnh hưởng như nhau. Theo Chopra và Mehta (1985) thì xaccaroza lại là nguồn cacbon thích hợp nhất đối với sinh tổng hợp xenlulaza ở *A. niger*.

Với phương pháp khuếch tán phóng xạ trên thạch, các kết quả thu được chênh lệch không rõ rệt, nhưng tinh bột vẫn cho hoạt tính cao nhất. Điều này có thể được giải thích bằng tác dụng gián tiếp của tinh bột đến tổng hợp enzym thông qua sinh trưởng. Sở dĩ năm đồng hóa tinh bột dễ dàng và nhanh chóng hơn các cơ chất khác, ví dụ CMC, là do nó sản sinh glucoamylaza có hoạt tính cao, gấp hàng chục lần so với xenlulaza.

Bảng 2: Ảnh hưởng của các nguồn cacbon tinh khiết lên sinh tổng hợp CMC-aza ở *A. niger*.

Nguồn cacbon	Hoạt tính CMC — aza	
	D — d, cm	Sự giảm độ nhớt, %
Tinh bột	2,60	15,0
Xaccaroza	2,00	12,0
Glucoza	2,50	8,0
Lactoza	2,30	7,5
CMC	2,30	7,2

Kết quả thí nghiệm còn cho phép nghĩ rằng xenlulaza ở *A. niger* là một enzym tổng hợp theo kiểu kiến trúc (constitutive) chứ không phải theo kiểu cảm ứng (inductive).

Glucoza là chất ức chế xenlulaza ở một số nấm mốc, chẳng hạn ở *Tricoderma viride* (Horton et al., 1966). Đề nghiên cứu ảnh hưởng của glucoza đối với xenlulaza ở *A. niger*, nấm được nuôi cấy trên môi trường Bravery dịch thể (1968) với glucoza (nồng độ 0,1 — 3%) là nguồn cacbon duy nhất.

Bảng 3 Ảnh hưởng của glucoza lên sinh tổng hợp xenluloza ở *A. niger*.

Nồng độ glucoza (%)	Hoạt tính CMC — aza	
	D — d, cm	Sự giảm độ nhớt, %
0	0	0
0,1	1,2	5,0
0,5	2,5	12,0
1,0	1,9	7,5
1,5	1,5	6,0
2,0	0,5	2,5
3,0	0	1,0

Kết quả (bảng 3) cho thấy ở các nồng độ 0,1 – 2% glucoza không ức chế CMC-aza, ở nồng độ 0,5% hoạt tính enzym còn đạt được ở một mức độ tương đối. Từ nồng độ 2% trở đi hoạt tính giảm hẳn và hầu như bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ 3%. Theo một giả thuyết mới do Ross et al (1983) đề ra thì glucoza ức chế không phải quá trình tổng hợp enzym mà là sự tiết enzym từ tế bào vào môi trường bằng cách ức chế quá trình tổng hợp permeaza (enzym chịu trách nhiệm vận chuyển qua màng tế bào).

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sinh tổng hợp CMC-aza ở A. niger.

Việc nuôi cấy nấm được tiến hành trong 10 ngày, hoạt tính xenlulaza được xác định sau từng ngày.

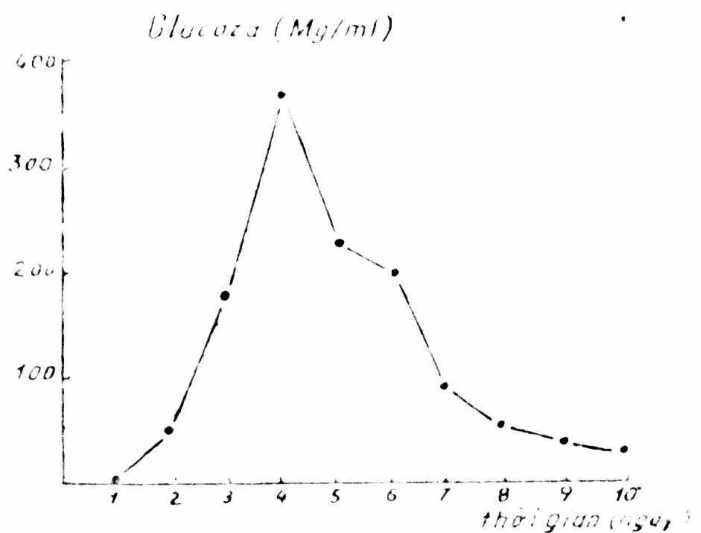


Kết quả biểu diễn trên sơ đồ 1 cho thấy: vào ngày đầu tiên nấm chưa tổng hợp enzym do sinh trưởng còn quá yếu. Lượng enzym sinh ra tăng nhanh sau ngày thứ ba và đạt cực đại vào ngày thứ 4, sau đó giảm dần. Sự giảm nồng độ hoạt tính này có thể do một phần enzym sinh ra bị proteaza của chính nấm phân hủy hoặc do sự tự phân của khuẩn ti thể.

Sơ đồ 1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sinh tổng hợp CMC-aza ở A.niger

Ảnh hưởng của tỉ lệ cơ chất/nước trong môi trường nuôi cấy lên sinh tổng hợp CMC-aza ở A. nigen.

Nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự phân hủy xenluloza ví dụ sự xử lý trước cơ chất, tỉ lệ enzym/cơ chất v.v... Các yếu tố này đã được nghiên cứu kỹ (Mandels, 1976; Mil et al, 1976). Vai trò của nước trong phản ứng thủy phân xenluloza chỉ mới được đề cập. (Kundu et al., 1983) Ở đây, chúng tôi tìm hiểu ảnh hưởng của nước đến khả năng tổng hợp CMC-aza trên môi trường đặc.



Sơ đồ 2 Ảnh hưởng của tỉ lệ cơ chất/nước trong môi trường nuôi cấy lên sinh tổng hợp CMC – aza ở A.niger

Qua sơ đồ 2 có thể thấy năm tổng hợp xenulaza mạnh nhất với tỉ lệ cơ chất/nước là 1/1,5 và kém nhất với tỉ lệ 1/0,5. Nhưng nhìn chung, sự chênh lệch hoạt tính không lớn lắm, nói cách khác tỉ lệ nước có thể dao động trong khoảng này mà không gây tác động rõ rệt đến tổng hợp enzym. Điều này có ý nghĩa trong thực tiễn sản xuất.

Ảnh hưởng của dung môi chiết rút lên hoạt tính CMC – aza ở *A. niger*

Do nuôi cấy được tiến hành trên môi trường đặc nên việc chiết rút enzym khỏi cơ chất là cần thiết. Các dung môi chiết có ảnh hưởng rõ rệt đến nồng độ enzym. Đối với CMC–aza của *Trichoderma viride* nuôi cấy trên cám, chiết rút bằng đệm xitrat 0,05M pH 3,5 là tốt hơn cả so với chiết rút bằng nước, đệm axetat và đệm photphat. (Vilela et al., 1977)

Trong thí nghiệm của chúng tôi, kết quả trên bảng 4 cho thấy: chiết rút bằng các dung dịch đệm cho hoạt tính enzym cao hơn nhiều so với chiết rút bằng nước. Trong các dung dịch đệm thì đệm xitrat 0,1M, pH 4,8 là thích hợp nhất

Bảng 4: Ảnh hưởng của dung môi chiết rút lên nồng độ CMC–aza ở *A.niger* nuôi trên cám gạo

Dung môi chiết rút	Hoạt tính CMC – aza
	Glucosa, mg/ml
Nước cất	260
Đệm phot phat 0,1M, pH 4,8	320
Đệm axetat 0,1M, pH 4,8	306
Đệm xitrat 0,1M, pH 4,8	480

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chopra S. Mehta, P. 1985. Influence of various nitrogen and carbon sources on the production of pectolytic, cellulolytic, proteolytic enzymes by *A. niger*. *Folia Microbiol.* 1985, 30, 2, 117–125.
2. Deschamps, P. Huet, C. M. 1985. Xylanase production in solid–State fermentation: a study of its properties. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 22 177–180
3. Rabache, M. Billaud, C. Adrian, J. 1981. Valeur alimentaire d'une culture de *A. niger*. *Science des aliments*, 1. 427–437.
4. Rao, M. Mishra, C. Seeta, R. Srinivasan, M. C. Despande, V.V, 1983. *Penicillium janthinellum* as a source of fungal biomass protein from lignocellulosic waste. *Biotech. Lett.* 5, 301–304.
5. Ross, A. Schiiger K. Scheiding, W. 1983. Cellulase production by *Trichoderma viride*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18. 29–37.

Ле Нонг Май, Нгуен Динь Кьуен

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЙ
НА БИОСИНТЕЗ ЦЕЛЮЛАЗЫ (ТИП – СМС – АЗА) У
ASPERGILLUS NIGER

Было исследовано влияние некоторых питательных условий на биосинтез СМС-азы у *Aspergillus niger*, культивируемого на плотной среде.

Результаты показали, что среди природных источников целлюлоз как субстраты брожения рисовая мука является наиболее выгодным источником. Максимальная активность СМС-азы после 96 часов культивирования достигается при отношении: субстрат : вода в среде = 1/1,5.

A. niger имеет способность к синтезу СМС-азы при культивировании на крахмале, сахарозе, глюкозе, лактозе и карбоксил-метил целлюлозе являются единственными источниками углеродов. Глюкоза в концентрациях от 0,1 до 2% не ингибирует энзим. Вытяжка энзимов из дрожжей рисовой муки буферным раствором ситрата 0,1 М, рН 4,8 даёт наивысший результат.

Le Hong Mai, Nguyen Dinh Quyen.

EFFECT OF SOME NUTRITIONAL CONDITIONS ON THE
BIOSYNTHESIS OF CELLULASES (CMC — ase type) BY ASPERGILLUS NIGER

The effect of some nutritional conditions on the biosynthesis of CMC-ase by *Asp. niger* cultured on solid state medium has been studied. It was found that when growing on some natural cellulosic sources used as fermentation substrates, the mould produced CMC-ase maximally on the rice bran. The highest activity was obtained after 96 hr cultivation. The ration substrate : water 1:1,5 of the culture medium is most suitable for enzyme production.

Under the conditions of our experiments, *A. niger* was able to produce CMC-ase on starch, glucose, sucrose, lactose and carboxymethyl cellulose as the sole carbon source. The enzyme was not inhibited by the concentration of glucose from 0,1 to 2%. The extraction of enzyme of mould bran with citrate buffer solution 0,1M pH 4,8 gives the highest activity.

Bộ môn Vi sinh vật

Nhận bài ngày 15-11-1986

Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội

(Tiếp theo trang 29)

Tran Hop Thanh, Nguyen Phu Thuy, Nguyen Minh Hong

A NOTE ON THE MAGNETIZATION BEHAVIOUR OF THE AlNiCo 5 ALLOY

Magnetization measurements show the interchange of the macroscopic easy and hard direction in a AlNiCo 5 alloy with increasing magnetic field. The results are explained as a consequence of the difference in the domain wall pinning ability in two directions parallel and perpendicular to the thermomagnetic direction.

Nhà máy Thiết bị Bưu điện

và Khoa Vật lý Trường ĐHTH Hà Nội.

Nhận bài ngày 8-6-1987.