

ĐẶC TÍNH SINH TỔNG HỢP VÀ ĐẶC TÍNH LÝ — HÓA CỦA XENLULAZA (Typ CMC — aza) Ở ASPERGILLUS NIGER

NGUYỄN ĐÌNH QUYẾN, TẠ DUY HIẾN
NGÔ TỰ THÀNH¹

Sự khan hiếm protein hiện nay khiến cho các nhà sinh học ngày càng quan tâm nghiên cứu sử dụng bã xenlulôza để sản xuất thức ăn cho chăn nuôi. Nhiều loài nấm sợi có khả năng phân giải xenlulôza được dùng vào mục đích này như *Myrothecium*, *verrucaria*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium cellulolyticum* và *Peniaillium janthinellum* v.v..

Asp. niger là loài nấm sợi thường dùng trong sản xuất axit xitric và các enzym glucoamylaza, xenlulaza. Do nấm không sinh độc tố như nhiều loài *Asp. niger* khác lại có khả năng phân giải cả tinh bột và xenlulôza nên gần đây đã được nghiên cứu sử dụng làm nguồn protein đơn bào. Xenlulaza ở *Asp. niger* cũng được một số tác giả quan tâm. Nhằm sử dụng nấm này để sản xuất sinh khối cho chăn nuôi chúng tôi sơ bộ tìm hiểu một số đặc tính của xenlulaza ở *Asp. niger*

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Asp. niger, chủng ít sinh bào tử, thuộc bộ sưu tập vi sinh vật của Bộ môn Nấm được giữ trên môi trường Czapek — Dox và được nhân giống trong môi trường Hansen dịch thể.

Môi trường cơ sở để sản xuất xenlulaza là cám gạo. Cho vào bình nón 250ml mỗi bình 10g cám và 10ml dung dịch sulfat amôm 4,9%. Khuấy đều rồi khử trùng 1 atm/30 min. Sau khi cấy các bình được giữ 30°C/4 ngày. Thêm vào mỗi bình 50ml nước cất (hay dung dịch đệm), lắc đều, giữ 3 giờ/4°C rồi li tâm. Dịch li tâm là một nguồn xenlulaza thô.

Hoạt tính của xenlulaza (endo— và exoglucanaza) được phát hiện theo phương pháp khuếch tán phóng xạ trên thạch đĩa với cơ chất là cacboxit — mêtil — xenlulôza hoặc bột xenlulôza (Sigma, USA) 0,1%. Sau khi khoan thạch và rửa dịch enzym các đĩa được giữ ở 50°C/ 24 giờ rồi được phun dung dịch Lugol để phát hiện vòng phân giải cơ chất.

Hoạt tính của CMC — aza được xác định bằng phương pháp đo độ nhớt (Toda-etal, 1971) hay bằng phương pháp đo đường khử; đường khử được xác định theo Vofova và Kysliková (1979).

1. Với sự cộng tác của Hoàng thị Túc, Ngô quý Hương và Đào quý Chung.

CMC--aza được tinh chế một phần bằng kết tủa với sulfat ammon tới độ bão hòa 90%, được cô đặc và loại muối nhờ Sephadex G - 25. Điện di trên gel poliacylamit được tiến hành theo Davis (1964). Để phát hiện hoạt tính CMC--aza một cột gel khác không nhuộm được cắt ở đoạn tương ứng với vị trí của dải protein trên cột gel nhuộm Amidoblack 10B nói trên. Cắt nhỏ đoạn này nghiền trong 0.1ml đệm axetat 0.1 M PH 4.5 rồi phát hiện hoạt tính trên thạch chứa CMC 0.1%.

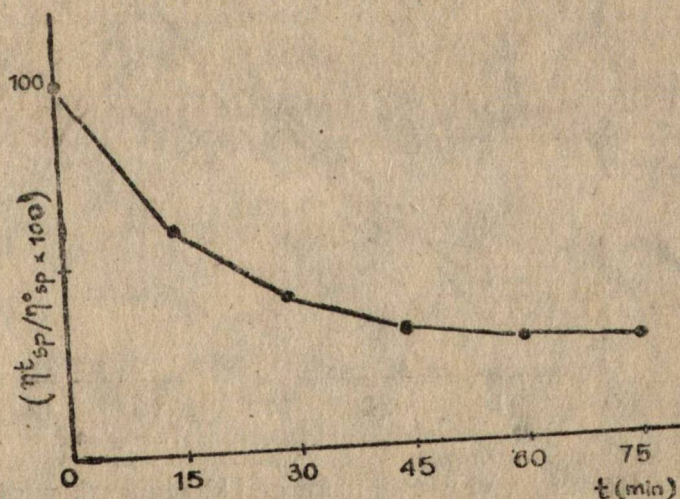
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Phát hiện hoạt tính xenlulaza

Một số tác giả cho biết *Asp. niger* tổng hợp chủ yếu endoglucanaza. Chúng tôi đã dùng phương pháp khuếch tán phóng xạ trên thạch nhằm phát hiện cả hai hoạt tính endo - và exoglucanaza. Mặc dù theo Williams CMC và bột xenluloza kém bắt màu với Iốt, nhưng một số nhà nghiên cứu vẫn dùng thuốc thử trên để tuyển chọn nấm mốc phân giải xenlulôza. Kết quả cho thấy hoàn toàn có thể dùng dung dịch Lugol để phát hiện cả hai hoạt tính xenluloza. Điều đáng chú ý là trên môi trường cám gạo chủng *Asp. niger* không những tổng hợp endo mà cả exoglucanaza. Để có kết luận chắc chắn về hoạt tính endoglucanaza, chúng tôi cũng dùng phương pháp đo sự giảm độ nhớt của dung dịch CMC là phương pháp rất nhạy với enzym trên. Kết quả ở hình 1 khẳng định chủng *Asp. niger* phân giải rõ rệt CMC.

Ảnh hưởng của nguồn các bon hữu cơ và nguồn nitơ lên sinh tổng hợp CMC--aza ở *Asp. niger*

Hình 1: Ảnh hưởng của dịch nuôi *Asp. niger* lên sự giảm độ nhớt của CMC 0.5%. 1ml dịch lọc + 2ml đệm axetat 0.1M PH 5 + 3ml CMC 0.5% giữ 30°C/30 min rồi hút ra 5ml cho vào nhớt kế Ostwald và đo.



Các nguồn xenlulôza tự nhiên ảnh hưởng khác nhau lên sinh tổng hợp xenlulaza ở nấm mốc. Chẳng hạn, Rao et al, (1983) cho biết khi nuôi *Pestalotiopsis versicolor* trên một số cơ chất xenlulôza thì bã mía cho hoạt tính cao nhất, còn kém nhất là cám mì. Hơn nữa, rơm rạ xử lý kiềm không làm tăng hoạt tính hơn so với không xử lý. Trong thí nghiệm *Asp. niger* được nuôi trên cám nguyên và

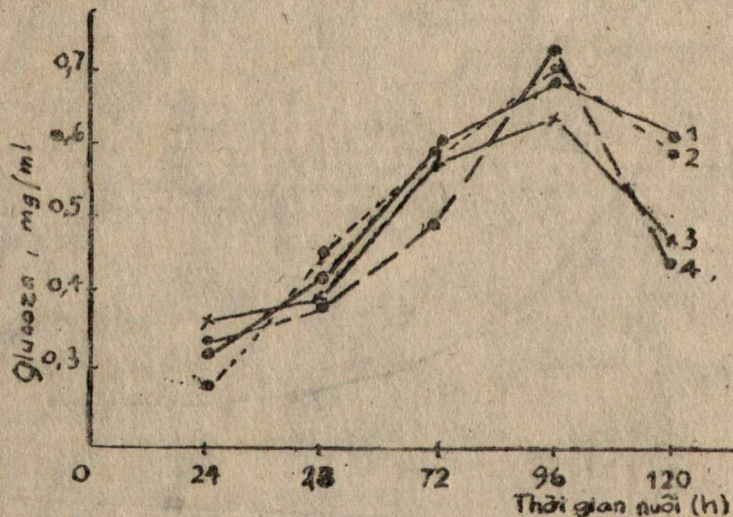
m phối trộn với một nguồn xenlulôza khác. Kết quả (bảng 1) cho thấy trộn hỗn hợp cám và bã mía (1:2) nấm cho hoạt tính cao nhất, còn trên cám nguyên hay cám phối trộn với bột có stylô, vỏ lạc, bã dứa hoạt tính enzym chênh lệch không đáng kể.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các nguồn xenlulôza tự nhiên lên sinh tổng hợp CMC - aza ở *Asp. niger*.

Nguồn Xenlulôza	Hoạt tính CMC - aza	
	R - r, cm (1)	Glucosa, mg/ml
Cám	0,50	0,30
Cám: bã mía	2,20	0,74
Cám: bột cỏ	0,57	0,40
Cám: vỏ lạc	0,47	0,28
Cám: bã dứa	0,45	0,25

(1) R = bán kính vòng phân giải, r = bán kính lỗ khoan

Năng lực đồng hóa các nguồn nitơ ở nấm mốc cũng không giống nhau. Chẳng hạn *Trichoderma viride* (Steenberg, 1975) và *Geotrichum candidum* không đồng hóa được nitrat.



Hình 2

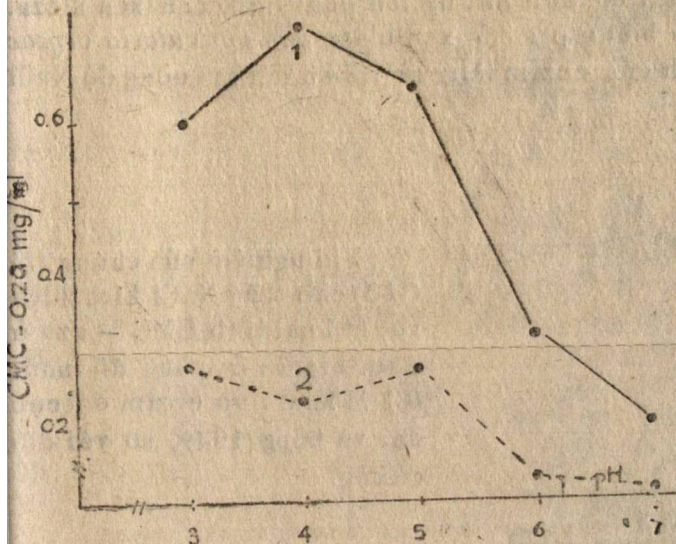
Ảnh hưởng của các nguồn nitơ lên sinh tổng hợp CMC-aza ở *Asp. niger*.

1. Cám + NH₄NO₃
(10g + 0,02g)
2. Cám (NH₄)₂SO₄
(10g + 0,033g)
3. Cám + bột bèo dậu
(10g + 1g)
4. Cám

Mặt khác, vì urê bị phân giải khi khử trùng cao áp môi trường nên ở đây chúng tôi chỉ tìm hiểu ảnh hưởng của hai nguồn nitơ thông thường là NH₄NO₃ và (NH₄)₂SO₄ lên Sinh tổng hợp CMC-aza ở *Asp. niger*. Một nguồn nitơ hữu cơ tự nhiên phổ biến là bột bèo dậu cũng được so sánh trong thí nghiệm. Kết quả ở hình 2 cho thấy trên cả 4 công thức môi trường, hoạt tính enzym đều đạt cực đại sau 96 giờ nuôi. Tuy nhiên các nguồn nitơ đều kích thích sinh tổng hợp CMC-aza trong khoảng từ 48 giờ đến 72 giờ.

Một số đặc tính của CMC—aza ở *Asp niger*.

Nấm mốc thường phát triển tốt trên các cơ chất rắn như gỗ, cuống, rễ và lá cây... (Hesseltine, 1972). Vì vậy để sản xuất prôtêin đơn bào cũng như sản xuất enzym từ nấm mốc thì việc lên men ở trạng thái rắn là thích hợp. Ở đây chúng tôi tìm hiểu một số đặc tính lý hóa của CMC—aza của *Asp niger* nuôi trên cám gạo.



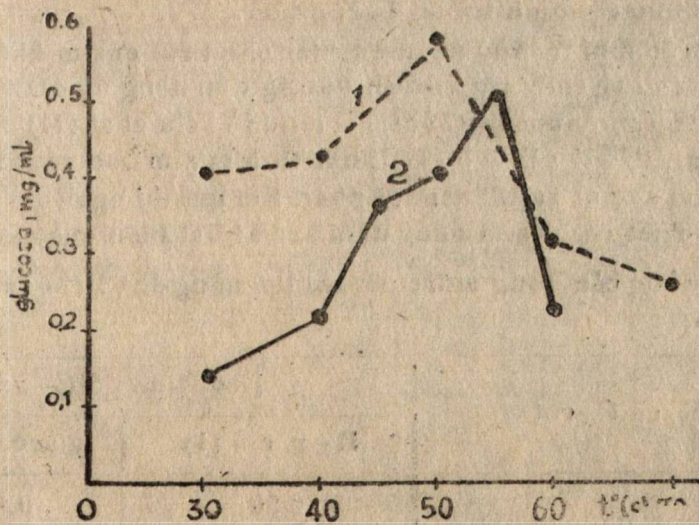
Hình 3. Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính CMC—aza ở *Asp. niger*.

0—7.0. Giữ dịch ở 25°C/24 h rồi chỉnh pH tới 5,0 bằng cách thêm đệm axetat 0,2M tới thể tích 2 ml và xác định hoạt tính như trên.

Hình 3 cho thấy CMC—aza ở *Asp. niger* hoạt động cực đại ở pH 4,0. Điều này phù hợp với kết quả của Hurst et al., (1977) Tuy nhiên, trong khi enzym ở *Asp. niger* của Hurst et al., bền trong phạm vi pH 1—9 ở 25°C thì enzym ở đây bền ở phạm vi pH hẹp hơn (3—5) ở 30°C.

1. PH tối thích : 0,5ml CMC 1% + 1ml dung dịch enzym. Giữ hỗn dịch ở các pH khác nhau rồi định lượng đường khử.

2. Độ bền pH: trộn dịch enzym với 1ml đệm trên pH



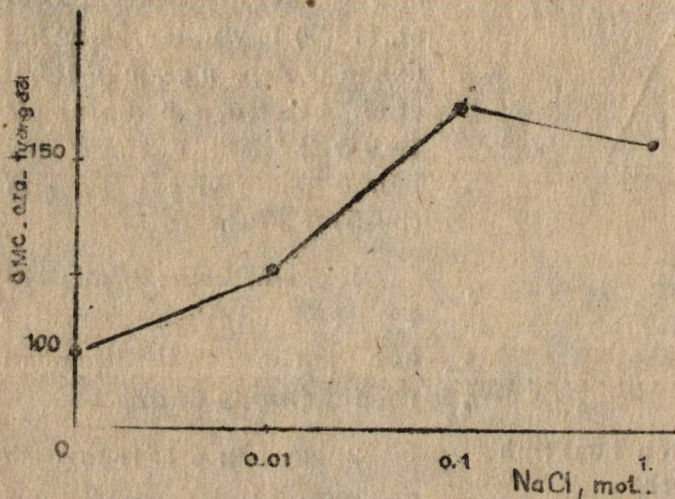
Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính CMC—aza ở *Asp. niger*.

1° tối thích: 1ml CMC 1% + 2ml đệm axetat 0,1M pH 5 + 1ml dịch enzym, ủ trộn dịch ở 30°–70°C rồi định lượng đường khử.

2. Độ bền nhiệt: được xác định với cùng cơ chất, dịch enzym được giữ ở 30°–70°C/10min sau đó làm lạnh và xác định hoạt tính như trên.

Nhiệt độ tối thích cho hoạt tính của CMC—aza ở *Asp. niger* theo Hurst et al (1977) là 45°C, nhưng ở chủng của chúng tôi là 55°C và enzym bền ở 50°C (H. 4)

Một số tác giả nhận thấy NaCl có ảnh hưởng lên hoạt tính của xenulaza. Chẳng hạn Sudo et al (1977) cho biết ở pH 3,5 xenulaza của *pyricularia oryzae* được kích thích rõ rệt: hoạt tính của enzym tăng từ 1,8–3 lần khi nồng độ NaCl tăng từ 0,01 M tới 1M.



Thí nghiệm của chúng tôi (H 5) cho thấy NaCl kích thích rõ rệt hoạt tính CMC — aza ở *Asp. niger*: ở nồng độ muối 0,1 M hoạt tính enzym đạt cực đại và bằng 163% so với đối chứng.

Hình 5. Ảnh hưởng của NaCl lên hoạt tính CMC—aza ở *Asp. niger*.

ở 0,2ml CMC 1% + 0,3 ml đệm axetat dịch 0,1 M, pH 5 + 1 ml NaCl + 0,5ml dịch enzym ủ 40%°/60 min rồi định lượng đường khử.

Do nuôi nấm trên môi trường đặc nên việc chiết rút enzym khỏi cơ chất là cần thiết. Dung môi dùng chiết rút có ảnh hưởng đến nồng độ enzym. Khi chiết rút CMC—aza từ cám gạo nuôi *Trichoderma viride* Vilela et al (11) cho biết chiết rút bằng đệm xitrat, 0,05M pH 5,5 cho hoạt tính enzym cao nhất so với chiết rút bằng nước, đệm axetat hay đệm phốt phát. Kết quả thí nghiệm với *Asp. niger* (bảng 2) cho thấy chiết rút enzym bằng đệm axetat đạt hiệu quả cao nhất

Bảng 2. Ảnh hưởng của dung môi chiết rút lên nồng độ CMC—aza ở *Asp. niger* nuôi trên cám gạo.

Dung môi chiết rút	Hoạt tính CMC—aza	
	R—r, cm (1)	glucôza, mg/ml
Nước	0,50	0,30
Đệm axetat 0,1m, pH 5,0	0,60	0,33
Đệm xitrat 0,1M, pH 5,0	0,52	0,25

(1) như ở bảng 1.

Xenulaza là phức hệ enzym phức tạp. Khi dùng nước chiết rút chế phẩm xenulaza thô từ *Asp. niger*. Ikeda et al. (1967) đã tách được 4 izozim CMC-aza. Dùng điện di trên gen poliacrilit chúng tôi cũng tách được từ *Asp. niger* nuôi trên cảm hai dải protein (trong khi từ *Penicillium sp.* chỉ một dải) có hoạt tính CMC-aza.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Duran, A., Uruburu F and Villanueva, J. R. 1973. Morphogenetic and nutritional studies of *S. lactis* cells. — Arch. Microbiol, 88: 245—256.
2. Hurst P.L., Nielsen J., Sullivan P.A., Shepherd M.G. 1977. Purification and some Properties of Cellulase from *Asp. niger*. — Biochem. J., 165: 33—41.
3. Ikeda R., Yamamoto T., and Puratsu M. 1973. — Purification and some physical properties of acid-Cellulase from *Asp. niger*. — Agric. Biol. chem 37: 1153—1159.
4. Kanda T., Wakabayashi K., Nisisawa K. 1976. — Purification and properties of an Endocellulase of Avicellase Type from *Irpelex lacteus*. Biochem. J. 79: 977—988.
5. Moo-Young M., Chahal Ds. Vlach D. 1978 SCP from various chemically pretreated wood substrates using *Chaetomium cellulolyticum*. — Biotech. Bioeng 20: 107—118.
6. Peiterson N. 1975. Cellulase and protein production from mixed cultures of *Trichoderma Viride* and a Yeast. — Biotech. Bioeng. 17: 1291—1299.
7. Rabache M. Billaud C. và Adrian J. 1981 — Valeur alimen taire d' une culture de *Aspergillus niger*. — Sciences des Aliments. 1: 427—437.
8. Rao M., Mishra C., Seeta R., Srinivasan M.C., Deshpande V.V, 1983 — *Penicillium Janthinellum* as a source of fungal biomass protein from lignocellulosic waste. — Biotech. Lett. 5: 301—304.
9. Roussos S., Raimbault M. 1982 — Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. I « Screening » des souches cellulolytiques. — Ann. Microbiol. 133B-455—464.
10. Updegraff D.M. 1971. Utilization of cellulose from waste paper by *Myrothecium verrucaria*. — Bioeng. 13: 77—97.
11. Vilela L.C., Torilla A.R., de Ocampo A.T., del Rosario E.J. 1977 — Cellulase production in semisolid cultures of *Trichoderma viride*. — Agric. Biol-Chem. 41: 235—238.
12. Volfova O. and Kyslikova E. 1979 — Selection of a Yeast Strain with optimal utilization of straw hydrolysatez — Fol. Microbiol. 24: 157—162.
13. Williams A.G. 1983 — Staining reactions for the detection of hemicellulos) — degrading bacteria. — FEMS. Microbiol. Letters. 20: 253 -258.

Нгуен Динь Куэн и др.

БИОСИНТЕТИЧЕСКАЯ И ФИЗИКО—ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕЛЛЮЛАЗЫ (ТИП СМС—АЗА) У *Aspergillus niger*

Результаты исследования о биосинтетической и физико—химической характеристиках СМС—аза у *Asp. niger*, культивированного на плотной среде показывают, что из всех природных источников целлюлоз как субстраты брожения то смесь рисовой отруби и выброс сахарного тростника (отношение 1:1) даёт нам высшую активность.

На среде рисовой отруби грибы синтезируют СМС—азу максимально у четвёртого дня.

NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и мука от *Azolla* стимулируют образование ферментов в протяжении от 48 до 72 часов.

СМС—аза у *Asp. niger* показывает максимальную активность при $\text{pH}=4,0$ и 55°C . фермент будет устойчивым при $\text{pH}=3,0-5,0$ и 50°C .

NaCl стимулирует активность фермента экстракция СМС—аза буферным раствором ацетата не плесени рисовой отрубле даёт нам высший результат.

С помощью электрофореза на гел *polyacrilamid* были обнаружены два белковых полоса с активностью СМС—аза.

Nguyen dinh Quyen a.o.

BIOSYNTHETIC AND PHYSICO — CHEMICAL PROPERTIES OF CELLULOSE (CMC—ASE TYPE) FROM ASPERGILLUS NIGER

Some biosynthetic and physico—chemical properties of CMC—ase from *Asp. niger* cultured on solid—state medium were studied. It was found that natural cellulosic sources used as fermentation substrates the rice bran: sugar, cane bagasse (1,2) mixture gave highest activity. On bran medium *Asp. niger* produces CMC ase maximally after 96 hours culture. NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and azolla powder enhance enzyme production in the period from 48 to 72h cultivation.

CMCase from *Asp. niger* shows maximum activity at $\text{pH} 4,0$ and 55°C ; pH and head stabilization occurs at $\text{pH} 3,0$ to $5,0$ and 50°C NaCl enhances CMCase activity. Extraction of the enzyme from mould bran with acetate buffer gives highest efficiency. Polyacrylamide disc gel electrophoretic pattern shows two protein bands containing CMC—saccharifying ability.

Ngày nhận 10-5-1985