

TỐI ƯU MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHỦNG NẤM *ASPERGILLUS ORYZAE* DSM1863 VÀ *ASPERGILLUS NIGER* DSM1957 SINH TỔNG HỢP XYLANASE

Đỗ Thị Tuyên, Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Quyền Đình Thi

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Xylan là một polymer liên kết 1-4 của xylose, thường các chuỗi bên là 4-O-methylglucuronate và arabinose, khu trú trong thành tế bào thực vật bậc cao, đặc biệt trong gỗ mộc và cỏ. Nó được thủy phân bởi tổ hợp endoxylanase (1-4-D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) và 3-xylosidase (EC 3.2.1.37), do nhiều chủng vi khuẩn và chủng nấm sinh tổng hợp ra. Trong nghiên cứu này, một số điều kiện nuôi cấy chủng *Aspergillus oryzae* DSM1863 và *Aspergillus niger* DSM1957 có khả năng sinh tổng hợp xylanase được tối ưu hóa. Chủng nấm *A. oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase cao gấp 8 lần so với chủng *A. niger* DSM1957. Sinh tổng hợp enzyme của hai chủng nấm này đều đạt cao nhất sau 72 h nuôi cấy. Cơ chất lõi ngô cảm ứng sinh tổng hợp enzyme xylanase cao nhất ở cả hai chủng *Aspergillus* trong số các nguồn carbon được khảo sát (bã mía, lõi ngô, trấu cám, vỏ lạc, vỏ quýt khô và xylan). Lõi ngô với nồng độ 5% và 4% cảm ứng chủng *A. niger* DSM1957 và chủng *A. oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase cao nhất với hoạt tính lần lượt là 23 và 123 U/ml. Bột đậu là nguồn nitrogen tốt nhất trong số các nguồn nitrogen được khảo sát [(NH₄)₂SO₄, bột cá, bột đậu, cao thịt, casein, peptone] cho hai chủng *Aspergillus* sinh tổng hợp xylanase. Chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase với hoạt tính cao nhất 19 và 76 U/ml trong môi trường chứa lần lượt 2 và 1% bột đậu. Hai chủng *Aspergillus* sinh tổng hợp xylanase cao nhất đều ở nhiệt độ 30°C, pH 7 và thời gian 72 h nuôi cấy. Hai enzyme này đã được tinh sạch và được đánh giá một số tính chất lý hóa.

Từ khóa: *Aspergillus niger* DSM1957, *Aspergillus oryzae* DSM1863, các điều kiện nuôi cấy, xylanase

MỞ ĐẦU

Nấm *Aspergillus* thường được dùng trong công nghệ sản xuất enzyme như α -amylase. Loài *Aspergillus oryzae* có ý nghĩa rất quan trọng trong sản xuất thức ăn truyền thống ở Nhật Bản như sản xuất nước sốt đậu nành và rượu gạo. Một trong những thành phần chính của thành tế bào thực vật là các hemicellulose khác nhau (xylan, arabinan, galactan và mannan). Xylanase phân hủy mạch chính của liên kết β -1,4 của xylose và là một enzyme rất quan trọng. Xylanase có ứng dụng trong công nghệ làm bánh mì, hoa quả, rượu vang, bia, tạo đường xylitol cho công nghiệp bánh kẹo. Trong ngành công nghiệp sản xuất giấy, cùng với lignin, xylan cũng là một thành phần quan trọng trong gỗ cần loại bỏ để thu cellulose. Sử dụng xylanase từ vi sinh vật là phương pháp đang được chú ý nhằm hạn chế sử dụng hóa chất, giảm chi phí và không gây ô nhiễm môi trường. Kết quả nghiên cứu cho thấy *A. niger* trên môi trường trấu cám không cần cảm ứng xylan vẫn có khả năng tổng hợp xylanase. Xylanase thu được có hoạt tính

cao nhất ở nhiệt độ 50°C, pH 5,5. Kết quả ứng dụng cho thấy xử lý bột giấy bằng xylanase trước khi tẩy trắng bằng kiềm cho kết quả tẩy trắng tốt hơn: trên bột giấy gỗ (số Kappa giảm 8,1%), trên bột giấy bã mía (số Kappa giảm 22,9%). Bên cạnh đó, xylanase có khả năng làm giảm độ nhớt trong đường tiêu hóa kéo theo việc tăng sự hấp thụ thức ăn, cải thiện hệ vi sinh vật đường ruột theo hướng có lợi, giảm rối loạn tiêu hóa. Barrera và đồng tác giả (2004) nghiên cứu khả năng tiêu hóa amino acid và chăn nuôi lợn bằng thức ăn có bổ sung xylanase. Kết quả cho thấy việc bổ sung xylanase vào thức ăn chăn nuôi đã cải thiện được các chỉ số AID (apparent ileal digestibility), khả năng tiêu hóa rõ ràng của amino acid, ADG, ở ruột hồi và tỷ lệ thức ăn, tăng trọng (Barrera, et al., 2004).

Trong bài báo này, chúng tôi đã tối ưu một số điều kiện nuôi cấy chủng *Aspergillus niger* DSM1957 và *Aspergillus oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase nhằm mục đích sản xuất được chế phẩm bổ sung enzyme vào thức ăn gia súc nhằm nâng cao chất lượng của vật nuôi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống và môi trường nuôi cấy

Chủng nấm *Aspergillus oryzae* DSM1863 và *Aspergillus niger* DSM1957 sinh tổng hợp xylanase được mua từ Trung tâm Suu tầm Vi sinh vật Đức DSM được nuôi cấy trong môi trường khoáng (MTK): 0,5% cao nấm men, 0,1% peptone, 0,2% NaNO_3 ; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,05% MgSO_4 ; 0,05% KCl, 1% xylan, pH 7,0, khử trùng (Bernier *et al.*, 1983).

Hóa chất

Các hóa chất dùng trong thí nghiệm được cung cấp từ các hãng khác nhau: KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KCl, xylan từ gỗ sồi (Biochemika), peptone (Merck), 3,5- dinitrosalicylic acid (Fluka).

Xác định hoạt tính xylanase

Hoạt tính xylanase được xác định bằng phương pháp quang phổ theo Miller (1959), với cơ chất 0,5% xylan trong đệm 0,02 N phosphate, pH 6,5. Hàm lượng đường khử giải phóng ra trong dung dịch phản ứng ở 42°C trong 30 phút được đo bằng quang phổ bước sóng 540 nm. Độ hấp phụ được đổi chiều với đường chuẩn nồng độ đường xylose để tính hàm lượng đường giải phóng tương đương. Một đơn vị hoạt tính xylanase được định nghĩa là lượng enzyme xúc tác thủy phân giải phóng 1 μmol xylose trong một phút ở điều kiện thích hợp.

Sinh tổng hợp xylanase

Chủng *A. oryzae* DSM1863 và *A. niger* DSM1957 được nuôi cấy trong môi trường MTK pH 7,0, cứ sau 24 h nuôi cấy, 1 ml dịch nuôi cấy được thu để xác định hoạt tính xylanase.

Tối ưu nguồn carbon

Để xác định khả năng cảm ứng của các loại cơ chất khác nhau, chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 được nuôi cấy trong môi trường khoáng MTK. Trong đó, cơ chất xylan được thay thế bằng một số nguồn cơ chất khác nhau (dạng bột) như: trấu cám, lõi ngô, vỏ lạc, bã mía, vỏ quýt khô. Dịch nổi được thu hoạch sau 72 h nuôi cấy. Sau khi xác định được cơ chất cảm ứng thích hợp nhất, để tối ưu nồng độ cơ chất, các chủng *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 được nuôi cấy trong môi trường có cơ chất cảm ứng thích hợp với các nồng độ khác nhau từ 0,5 - 5,5%, cách nhau 0,5%.

Tối ưu nguồn nitrogen

Nguồn nitrogen trong môi trường ban đầu MTK là peptone để nuôi cấy các chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863. Đây là một nguồn nitrogen rất tốt, nhưng không thích hợp để sản xuất chế phẩm enzyme sau này do giá rất cao. Để có thể sử dụng được các nguồn nguyên liệu sẵn có, peptone được thay thế bằng một nguồn nitrogen khác như: bột cá, casein, cao thịt, bột đậu, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Tối ưu nhiệt độ và pH nuôi cấy

Để xác định nhiệt độ nuôi cấy tối ưu, chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 được nuôi lắc 72 giờ với 200 vòng/phút trong môi trường trên có bổ sung các nguồn carbon và các nguồn nitrogen đã được tối ưu ở các nhiệt độ khác nhau 28, 30 và 37°C. Chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 được nuôi cấy 72 giờ trong môi trường nuôi cấy có pH từ 4 - 9 ở 30°C, lắc 200 vòng/phút để xác định pH môi trường tối ưu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sinh tổng hợp xylanase

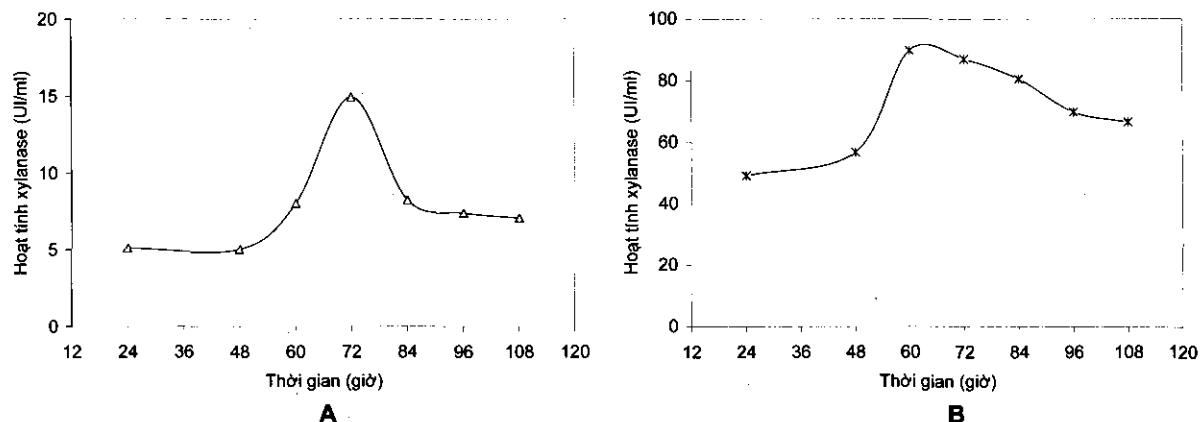
Khả năng sinh tổng hợp xylanase của hai chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 tăng nhanh từ 48 - 72 h nuôi cấy đạt tối đa (15 U/ml ở chủng *A. niger* DSM1957 và 87 U/ml ở chủng *A. oryzae* DSM1863) (Hình 1). Sinh tổng hợp enzyme giảm nhanh xuống 7,4 U/ml sau 84 h ở chủng *A. niger* DSM1957 và giảm từ từ xuống 66 U/ml sau 108 h nuôi cấy ở chủng *A. oryzae* DSM1863.

Cơ chất cảm ứng và nồng độ cơ chất cảm ứng

Trong môi trường MTK, chủng *A. oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase cao gấp gần 8 lần chủng *A. niger* DSM1957 (Bảng 1). Đối với chủng *A. niger* DSM1957, lõi ngô cảm ứng sinh tổng hợp xylanase cao nhất, sau đó đến bã mía (71%) và trấu cám (62%) và đều cao hơn xylan (53%), vỏ lạc và vỏ quýt khô cảm ứng sinh tổng hợp xylanase đều kém hơn xylan (Bảng 1). Đối với chủng nấm *A. oryzae* DSM1863, tất cả các nguồn carbon được khảo sát (trấu cám, xylan, bã mía, vỏ lạc, vỏ quýt khô) trừ lõi ngô đều cảm ứng sinh tổng hợp xylanase gần như xylan và đạt khoảng 90% so với lõi ngô là nguồn cảm ứng sinh tổng hợp xylanase cao nhất (Bảng 1). Như vậy, lõi ngô là nguồn carbon cảm ứng các chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase cao nhất.

Sau khi xác định được nguồn carbon lõi ngô có khả năng cảm ứng sinh tổng hợp xylanase cao nhất trong số các nguồn carbon được khảo sát, nguồn cơ chất cảm ứng xylan ban đầu được thay bằng lõi ngô (do lõi ngô dễ tìm kiếm hơn xylan nhiều). Lõi ngô được đưa vào môi trường với nồng độ khác nhau 0,5 - 10%. Sau 72 h nuôi cấy, hoạt tính xylanase đạt cao nhất ở nồng độ cơ chất lõi ngô là 4% ở nấm *A.*

oryzae DSM1863 (hoạt tính đạt 123 U/ml) và 5% ở chủng nấm *A. niger* DSM1957 (hoạt tính đạt 23 U/ml) (Hình 2). Như vậy, với nồng độ 4% lõi ngô ở nấm *A. oryzae* DSM1863 và 5% ở nấm *A. niger* DSM1957, xylanase được cảm ứng sinh ra đủ để phân hủy nguồn carbon dinh dưỡng cho sự sinh trưởng của tế bào, khi nồng độ cơ chất tăng thì hoạt tính xylanase cũng không tăng.



Hình 1. Hoạt tính xylanase của chủng nấm *A. niger* DSM1957 (A) và chủng nấm *A. oryzae* DSM1863 (B).

Bảng 1. Mức độ cảm ứng sinh tổng hợp xylanase từ chủng nấm *A. niger* DSM1957 và chủng nấm *A. oryzae* DSM1863 của một số cơ chất khác nhau.

Nguồn carbon	Hoạt tính <i>A. niger</i> DSM1957		Hoạt tính <i>A. oryzae</i> DSM1863	
	(U/ml)	%	(U/ml)	%
Bã mía	9,4	71	52,2	89
Lõi ngô	13,2	100	58,4	100
Trấu cám	8,1	62	52,7	90
Vỏ lạc	5,5	42	51,2	88
Vỏ quýt khô	5,4	41	49,0	84
Xylan	6,9	53	52,7	90

Nguồn nitrogen

Chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase có cùng một kiểu đồ thị. Hai chủng *Aspergillus* đều sinh tổng hợp xylanase cao nhất trong môi trường có nguồn nitrogen là bột đậu. Hai chủng này sinh tổng hợp xylanase khoảng 80 - 90% ở các môi trường có nguồn nitrogen khác được khảo sát so với môi

trường có bột đậu (Bảng 2).

Sau khi xác định bột đậu là tốt nhất trong số các nguồn nitrogen được khảo sát, nồng độ bột đậu được thay đổi từ 0,05 đến 4% trong các môi trường nuôi cấy hai chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863. Sau 72 h nuôi cấy, hoạt tính xylanase cao nhất ở nồng độ bột đậu 2% ở nấm *A. niger* DSM1957 (18,8 U/ml) và 1% ở nấm *A. oryzae*

DSM1863 (78,4 U/ml) (Hình 3).

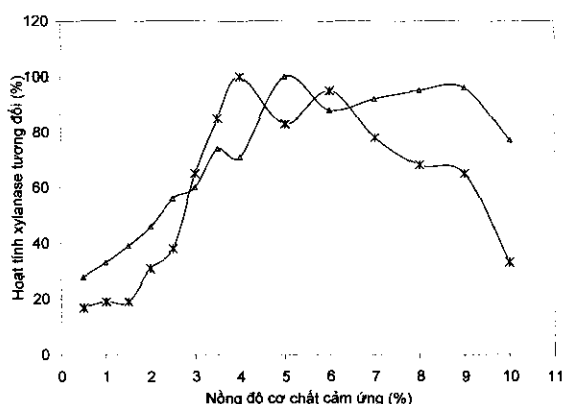
Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến sinh tổng hợp xylanase

Độ pH môi trường nuôi cấy ảnh hưởng tới sinh tổng hợp xylanase ở hai chủng *Aspergillus* rất giống nhau. Ở pH 7, chủng *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase cao nhất, lần lượt đạt 12,8 U/ml và 109 U/ml. Hai chủng này có thể sinh tổng hợp xylanase ở dải pH rộng từ 4 - 8 với hoạt tính tương đối đạt 80% so với hoạt tính ở

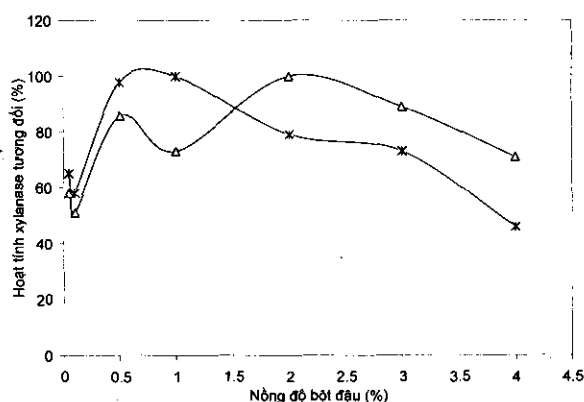
pH tối ưu (Hình 4).

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh tổng hợp xylanase

Ở nhiệt độ 30°C, chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase cao nhất, đạt lần lượt 15,5 U/ml và 60,6 U/ml. Ở nhiệt độ 37°C, hoạt tính xylanase ở cả hai chủng giảm mạnh, chỉ còn 53 - 60%. Ở nhiệt độ nuôi cấy thấp 28°C, hoạt tính xylanase ở chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 còn cao, đạt 85 - 89%.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất cảm ứng lõi ngô đến khả năng sinh tổng hợp xylanase của chủng nấm *A. niger* DSM1957 (Δ) và *A. oryzae* DSM1863 (*).



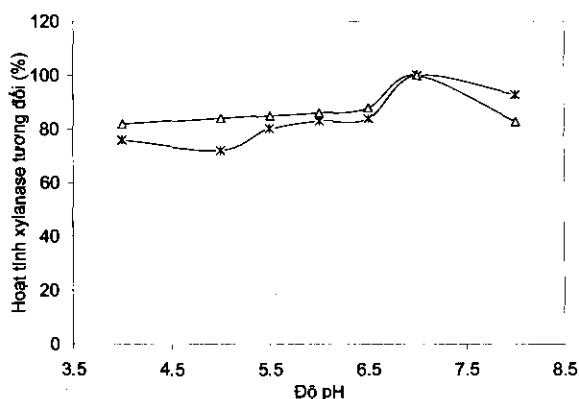
Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ bột đậu đến sinh tổng hợp xylanase của chủng nấm *A. niger* DSM1957 (Δ) và chủng nấm *A. oryzae* DSM1863 (*).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến sinh tổng hợp xylanase từ chủng nấm *A. niger* DSM1957 và chủng nấm *A. oryzae* DSM1863.

Nguồn nitrogen	Hoạt tính <i>A. niger</i> DSM1957		Hoạt tính <i>A. oryzae</i> DSM1863	
	(U/ml)	%	(U/ml)	%
(NH ₄) ₂ SO ₄	14,9	79	59,7	90
Bột cá	15,7	83	62,6	98
Bột đậu	18,9	100	75,7	100
Cao thịt	18,7	99	74,8	86
Casein	17,3	91	69,2	91
Peptone	16,8	89	67,1	94

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh tổng hợp xylanase của chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863.

Nhiệt độ (°C)	Hoạt tính xylanase chủng <i>A. niger</i>		Hoạt tính xylanase chủng <i>A. oryzae</i>	
	U/ml	%	U/ml	%
28	13,2	85	54,2	89
30	15,5	100	60,6	100
37	8,3	53	36,7	60



Hình 4. Ảnh hưởng của pH dịch nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp xylanase của chủng nấm *A. niger* DSM1957 (Δ) và chủng nấm *A. oryzae* DSM1863 (*).

THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy hai chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase tối thích ở thời gian 72 h nuôi cấy. Thời gian sinh tổng hợp xylanase ở chủng *Aspergillus oryzae* cao nhất trong môi trường rắn là 40 h (Oda *et al.*, 2006).

Lõi ngô là nguồn cơ chất cảm ứng các chủng *Aspergillus* sinh tổng hợp xylanase cao nhất, ở nồng độ 4% đối với *A. oryzae* DSM1863 (123 U/ml) và nồng độ 5% đối với *A. niger* DSM1863 (23 U/ml). Nhiều nghiên cứu khác cũng cho rằng lõi ngô là nguồn cơ chất cảm ứng sinh tổng hợp xylanase cao nhất (Aachary, Prapulla, 2008; Camacho, Aguilar, 2003). Khi nghiên cứu ảnh hưởng của xylan bột yến mạch mịn, xylan từ gỗ sồi và lõi ngô lên khả năng sinh tổng hợp xylanase ở chủng *A. oryzae* MTCC5154, 3% lõi ngô cảm ứng sinh tổng hợp

xylanase cao nhất sau 96 h nuôi cấy (Aachary, Prapulla, 2008). Khi nghiên cứu khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp xylanase ngoại bào của chủng *Aspergillus* sp. FP- 470 trong môi trường bổ sung xylan từ gỗ sồi, xylan bột yến mạch mịn, rom lúa mì và lõi ngô, hoạt tính xylanase đạt cao nhất trong môi trường chứa lõi ngô (Camacho, Aguilar, 2003). Chủng nấm *A. niveus* RS2 phân lập từ rom rạ sinh tổng hợp xylanase cao nhất sau 5 ngày nuôi cấy và trấu cám là một trong những nguồn cơ chất tốt nhất (Sudan, Bajaj, 2007).

Đối với hai chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863, bột đậu là nguồn nitrogen cảm ứng sinh tổng hợp xylanase cao nhất. Đối với chủng nấm *A. niveus* RS2, cao nấm men là nguồn nitrogen tốt nhất để sinh tổng hợp xylanase, tiếp theo là ammonium sulfate và peptone (Sudan, Bajaj, 2007). Chủng nấm *A. fumigatus* sinh tổng hợp xylanase cao sau 48 giờ nuôi cấy và cao gấp 2,8 lần trong một môi trường rắn tối ưu có các thành phần muối và 2% peptone và 1% cao nấm men (Thiagarajan *et al.*, 2005).

Nhiệt độ 30°C và pH 7 là tối thích cho hai chủng nấm *A. niger* DSM1957 và *A. oryzae* DSM1863 sinh tổng hợp xylanase. Nhưng ở dải pH rộng 4 - 8, hai chủng nấm vẫn sinh tổng hợp xylanase mạnh, đạt ≥ 80% hoạt tính so với ở pH 7 tối ưu. Chủng *A. oryzae* và chủng *A. fumigatus* AR1 cũng sinh tổng hợp xylanase cao trong dải pH rộng lần lượt là 3 - 8 (Đào Thị Hải Lý *et al.*, 2006) và 5 - 9 (Anthony, *et al.*, 2003). pH tối thích cho chủng nấm *A. oryzae* NRRL 3485 sinh tổng hợp xylanase cao nhất là pH 7,5 (Chipeta *et al.*, 2008) và cho chủng nấm *A. niveus* RS2 là pH 7 (Sudan, Bajaj, 2007). Một số chủng lại sinh tổng hợp xylanase cao nhất ở pH acid như chủng *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 (pH 4,8) (Li, Ljungdahl, 1993; 1994) và chủng nấm phân lập vùng ven biển CY4786 pH 4,6 (Yuan *et al.*, 2005). Chủng nấm *A. niveus* RS2 và chủng nấm phân lập vùng ven

biến CY4786 sinh tổng hợp xylanase tối đa ở nhiệt độ 50°C (Sudan, Bajaj, 2007; Yuan *et al.*, 2005).

Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng *A. oryzae* DSM1863 có khả năng sinh tổng hợp xylanase cao hơn chủng *A. niger* DSM1957. Thời gian sinh tổng hợp xylanase cao nhất là 72 h, nhiệt độ và pH tối ưu là 30°C và 7. Lõi ngô là nguồn cơ chất cảm ứng sinh tổng hợp xylanase cao nhất và bột đậu là nguồn nitrogen tốt nhất. Điều này phù hợp với mục tiêu nghiên cứu đề ra là tận dụng được các nguồn nguyên liệu dễ kiếm. Tương tự như kết quả này, chủng *A. niger* B03 cũng sinh tổng hợp xylanase cao trong môi trường chìm chứa các thành phần cơ bản muối ammonium phosphate, urea, lõi ngô, cám lúa mì và bột malt (Dobrev *et al.*, 2007).

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu tối ưu cho thấy thời gian sinh tổng hợp xylanase ở hai chủng nấm *A. oryzae* DSM1863 và *A. niger* DSM1957 cao nhất là 72 h nuôi cấy, nhiệt độ và pH tối ưu là 30°C và 7,0. Lõi ngô là nguồn cơ chất cảm ứng tốt nhất cho sinh tổng hợp xylanase với nồng độ 4% đối với nấm *A. niger* DSM1957 và 5% đối với nấm *A. oryzae* DSM1863. Nguồn nitrogen tốt nhất cho sinh tổng hợp xylanase là bột đậu với nồng độ 2% đối với chủng nấm *A. niger* DSM1957 và nồng độ 1% đối với chủng nấm *A. oryzae* DSM1863.

Lời cảm ơn: Công trình có sự hỗ trợ của Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020, Đề tài: Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm đa enzyme có chất lượng từ vi sinh vật tái tổ hợp nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn chăn nuôi, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2007 - 2010.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aachary A, Prapulla SG (2008) Corn-cob-Induced endo-1,4-beta-d-xylanase of *Aspergillus oryzae* MTCC 5154: Production and characterization of xylobiose from glucuronoxylan. *J Agric Food Chem* 56(11): 3981-3988.

Anthony T, Raj KC, Rajendran A, Gunasekaran P (2003) Inhibition of proteases during fermentation improves xylanase production by alkali tolerant

Aspergillus fumigatus ARL. *J Biosci Bioeng* 96(4): 394-396.

Barrera M, Cervantes M, Sauer WC, Araiza AB, Torrentera N, Cervantes M (2004) Ileal amino acid digestibility and performance of growing pigs fed wheat-based diets supplemented with xylanase. *J Anim Sci* 82 (7): 1997-2003.

Bernier RJ, Desrochers M, Jurasek L, Paice MG (1983) Isolation and Characterization of a Xylanase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 46(2): 511-514.

Camacho NA, Aguilar OG (2003) Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking. *Appl Biochem Biotechnol* 104(3): 159-172.

Chipeta ZA, du Preez JC, Christopher L (2008) Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35(6): 587-594.

Đào Thị Hải Lý, Trần Hữu Phong, Mai Thị Hằng (2006) Tuyển chọn và nghiên cứu đặc tính của xylanase từ nấm mốc dùng cho chăn nuôi. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 4(4) : 463-470.

Dobrev GT, Pishtiyski IG, Stanchev VS, Mircheva R (2007) Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. *Bioresour Technol* 98(14): 2671-2678.

Li XL, Ljungdahl LG (1993) Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Appl Environ Microbiol* 59(10): 3212-3218.

Li XL, Ljungdahl LG (1994) Cloning, sequencing, and regulation of a xylanase gene from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Appl Environ Microbiol* 60(9): 3160-3166.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31 426-428.

Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O, Iwashita K (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl Environ Microbiol* 72(5): 3448-3457.

Sudan R, Bajaj BK (2007) Production and biochemical characterization of xylanase from an alkalitolerant novel species *Aspergillus niger* RS2. *J Microb Biotech*

23: 491-500.

Biol 43 (10): 887-891.

Thiagarajan S, Jeya M, Gunasekaran P (2005) Improvement of xylanase production in solid state fermentation by alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* MKU1 using a fractional factorial design. *Indian J Exp*

Yuan KP, Vrijmoed LL, Feng MG (2005) Survey of coastal mangrove fungi for xylanase production and optimized culture and assay conditions. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 45 (1): 91-96.

OPTIMIZATION OF SOME CULTURE CONDITIONS FOR *ASPERGILLUS ORYZAE* DSM1863 AND *ASPERGILLUS NIGER* DSM1957 PRODUCING XYLANASE

Do Thi Tuyen, Nguyen Sy Le Thanh, Quyen Dinh Thi*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Xylan is a β -1,4-linked polymer of xylose, often with 4-O-methylglucuronate and arabinose side chains, and is located in cell wall of higher plants, especially hardwoods and grasses. It is hydrolyzed by a combination of endoxylanase (1-4-D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) and 3-xylosidase (EC 3.2.1.37), produced by many bacteria and fungi. In this study, some culture conditions for *Aspergillus oryzae* DSM1863 and *Aspergillus niger* DSM1957 producing xylanase were optimized. Xylanase production of the fungus *A. oryzae* DSM1863 was 8 times as high as that of the fungus strain *A. niger* DSM1957. Highest xylanase production of both strains was obtained after 72 h of cultivation. Corncob induced maximum production of the xylanase in both strains *Aspergillus* in comparison to other tested carbon sources (bagasse, corn cob, rice bran, soybean shell, dried mandarin shell and xylan). Corncob with the concentration of 5% and 4% induced the strain *A. niger* DSM1957 and *A. oryzae* DSM1863 producing xylanase maximum with an activity of 23 U/ml and 123 U/ml, respectively. Soybean powder was the best nitrogen source among nitrogen sources tested ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fish powder, soybean powder, meat paste, casein and peptone) for xylanase production of both strains *Aspergillus*. The fungi *A. niger* DSM1957 and *A. oryzae* DSM1863 produced xylanase with a highest activity of 19 and 76 U/ml in media contained 2% and 1% soybean powder, respectively. Both fungi *Aspergillus* strain produced xylanase maximum at the temperature of 30°C and pH 7 and cultivation time of 72 hours. These both enzymes were purified and characterized.

Keywords: *A. oryzae* DSM1863, *A. niger* DSM1957, Corncob, xylan, xylanase

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37568260; Fax: 84-4-38363144; E-mail: quyen@ibt.ac.vn