

TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ MÔI TRƯỜNG LÊN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CELLULASE CỦA CHỦNG *PENICILLIUM* SP. DTQ-HK1

Trịnh Đình Khả¹, Quyền Đình Thi², Nguyễn Sỹ Lê Thanh²

¹Đại học Thái Nguyên

²Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Từ các mẫu rác thải, rơm mục, đất, giấy ăn và nước thải nhà máy giấy, chúng tôi đã phân lập được 49 chủng vi sinh vật, trong đó 36 chủng có hoạt tính cellulase. Ba chủng nấm sợi RM1.1, RM1.5 và HK1 có khả năng phân hủy cellulose mạnh nhất đã được tuyển chọn để xác định tên loài. So sánh trình tự 28S rRNA, chủng RM1.1 có độ tương đồng 100% so với *Aspergillus fumigatus* ATCC 16907, chủng RM1.5 và HK1 lần lượt có độ tương đồng cao so với một số đại diện của chi *Emericella* (99,8%) và chi *Penicillium* (98,6%). Trình tự 28S rRNA của các chủng này đã được đăng ký trong GenBank với mã số EF012766 (*Aspergillus fumigatus* DTQ-RM1.1), EF025927 (*Emericella* sp. DTQ-RM1.5) và EF087978 (*Penicillium* sp. DTQ-HK1). Chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất (1,58 U/ml) sau 120 h lên men chìm ở pH tối ưu 5,5, nhiệt độ tối ưu 30°C, nuôi lắc 200 vòng/ phút trong môi trường CPY với nồng độ cơ chất cảm ứng bột giấy tối ưu 0,5%. Nguồn nitrogen và carbon làm tăng mạnh khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng DTQ-HK1 là bột đậu tương và rơm. Môi trường thay thế đơn giản và dễ kiểm chế lên men sinh tổng hợp cellulase của chủng DTQ-HK1 cho 1 l bao gồm 16 g bột đậu tương; 5 g bột giấy; 6 g rơm; 1 g K₂HPO₄; 0,5 g MgSO₄; 10 mg FeSO₄; pH 5,5. Trong môi trường này, khả năng sinh tổng hợp cellulase tăng gấp hơn ba lần (5,09 U/ml) so với trong môi trường CPY (1,58 U/ml).

Từ khóa: *Aspergillus fumigatus*, *Emericella*, *Penicillium* DTQ-HK1, sinh tổng hợp cellulase, 28S rRNA

MỞ ĐẦU

Cellulose là polysaccharide cấu tạo bởi các đơn phân β -D-glucose liên kết bằng liên kết 1,4-glycoside. Cellulose được tổng hợp chủ yếu ở thực vật và tảo để phục vụ cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng. Cellulose là chất hữu cơ khó phân hủy. Người và hầu hết động vật không có khả năng phân hủy cellulose. Do đó, khi thực vật chết hoặc con người thải các sản phẩm hữu cơ có nguồn gốc thực vật đã để lại trong môi trường lượng lớn rác thải hữu cơ. Tuy nhiên, nhiều chủng vi sinh vật bao gồm nấm, xạ khuẩn, vi khuẩn có khả năng phân hủy mạnh cellulose thành các sản phẩm dễ phân hủy nhờ cellulase. Các chủng vi sinh vật phân hủy cellulase được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau (Ole *et al.*, 2002) như: sản xuất acid hữu cơ (Cheryan *et al.*, 1997), sản xuất dung môi hữu cơ (Dürre, 1998), sản xuất thức ăn gia súc, công nghiệp sản xuất giấy và trong công nghệ xử lý môi trường (Tăng Thị Chính *et al.*, 1999).

Trong những năm gần đây, ở Việt Nam đã có

một số nghiên cứu về vi sinh vật phân hủy cellulose và cellulase (Đặng Minh Hằng, 1999; Tăng Thị Chính *et al.*, 1999; Hoàng Quốc Khánh *et al.*, 2003). Những nghiên cứu này chủ yếu đề cập vấn đề phân lập các chủng vi sinh vật và đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến khả năng sinh tổng hợp cellulase. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập các chủng vi sinh vật phân hủy cellulose, định tên loài một số chủng vi nấm bằng gen 28S rRNA, đánh giá ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến khả năng sinh cellulase và tìm môi trường thay thế đơn giản, dễ kiểm từ các nguồn nguyên liệu sẵn có trong nước cho quá trình lên men sản xuất cellulase.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu phân lập

Đất bãi rác (ĐBR) lấy từ khu xử lý rác thải thành phố Thái Nguyên; nước thải (NT) nhà máy giấy Hoàng Văn Thụ (Thái Nguyên); đất chân đồng rơm (ĐR); rơm mục (RM) thu ở Thường Tín (Hà Tây) và

giấy ăn hàng không (HK) do hãng Hàng không Quốc gia Việt Nam cung cấp được sử dụng để phân lập các chủng vi sinh vật phân hủy cellulose.

Môi trường

Môi trường Hutchinson-Clayton thay nguồn carbon bằng 0,5% bột giấy và môi trường PGA (Potato-Glucose-Agar) có bổ sung 0,2% carboxymethylcellulose (CMC) dùng để phân lập nấm. Môi trường Czapek để giữ giống nấm. Môi trường Gauze 1 thay nguồn carbon bằng 0,5% bột giấy để phân lập và giữ giống xạ khuẩn. Một lít môi trường CPY gồm 4 g peptone; 1 g cao nấm men; 2 g NaNO_3 ; 1 g K_2HPO_4 ; 0,5 g MgSO_4 ; 10 mg FeSO_4 ; 5 g bột giấy; pH 6,5 dùng để đánh giá ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến khả năng sinh cellulase. Môi trường thay thế giống như CPY, nhưng peptone và cao nấm men được thay bằng bột đậu tương và rom, tương ứng.

Hóa chất

Môi, kit nhân dòng T/A pTZ57R/T, *EcoRI*, *HindIII*, T4-DNA ligase, CIAP, agarose được mua từ Fermentas (Litva); CMC, Red Congo, Sodium dodecylsulfate từ Sigma (Mỹ); peptone, cao nấm men từ Difco (Mỹ); kit tinh sạch plasmid QIA prep Spin Miniprep và kit tinh sạch sản phẩm PCR từ Qiagen (Mỹ); các hóa chất tinh khiết khác từ Merck (Đức) và Fluka (Tây Ban Nha). Bột giấy do nhà máy giấy Bãi Bằng cung cấp. Một số nguyên liệu môi trường được mua tại Việt Nam.

Xác định hoạt tính

Định tính cellulase được tiến hành theo phương pháp khuếch tán enzyme trên đĩa thạch. Sau 96 h nuôi cấy chìm ở 30°C trong môi trường CPY chứa 0,5% (w/v) bột giấy, dịch nổi được ly tâm loại bỏ sinh khối và nhỏ lên đĩa thạch chứa 0,5% (w/v) cơ chất CMC, ủ 24 h trong tủ lạnh 4°C để enzyme khuếch tán. Sau đó đĩa thạch được ủ 24 h ở 37°C, rồi nhuộm bằng dung dịch 1% (w/v) Congo đỏ trong 30 phút và rửa lại bằng 1 M NaCl trong 15 phút (Teather, Wood, 1982).

Hoạt tính enzyme được xác định theo phương pháp định lượng đường (Nelson, 1944). Một lượng 0,5 ml dịch enzyme được trộn với 0,5 ml cơ chất 0,5% (w/v) CMC pha trong đệm 100 mM Na acetate pH 4,5, lắc đều và ủ phản ứng ở 65°C trong 5 phút. Sau đó phản ứng được bổ sung 1 ml dung dịch muối AB (25:1; A: 20% (w/v) Na_2SO_4 , 2,5% muối

Seignett, 2% (w/v) NaHCO_3 , 2,5% (w/v) Na_2CO_3 ; B: 15% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, thêm vài giọt H_2SO_4 đặc), đun sôi cách thủy 20 phút, làm nguội đến nhiệt độ phòng. Hỗn hợp được bổ sung 1 ml dung dịch arsenomolybdate (5% (w/v) ammonium molybdate: 5% (v/v) H_2SO_4 đặc; 0,6% (w/v) $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) lắc đều đến khi hết bọt khí. Sau khi ly tâm 5 phút với 8.000 rpm, dịch nổi được đo ở bước sóng 660 nm

Ông đối chứng được tiến hành tương tự, sau khi trộn enzyme với cơ chất thêm ngay các hóa chất định lượng đường khử. Hiệu số giá trị OD ống thí nghiệm với ống đối chứng được đổi chiều với đồ thị chuẩn suy ra hàm lượng đường khử. Một đơn vị hoạt tính (U) được định nghĩa là lượng enzyme thủy phân cơ chất thành đường khử tương đương 1 μmol glucose trong một phút ở điều kiện phản ứng.

Tách chiết DNA tổng số

DNA của các chủng nấm được tách chiết bằng phương pháp sử dụng CTAB. Tế bào nấm được nghiền nhẹ 5 phút ở -85°C. Mẫu được ủ với dung dịch 2% CTAB và protease K trong 3 h ở 65°C, sau đó được bổ sung 200 μl dung dịch 5 M K-acetate và ủ 10 phút ở -20°C. Sau khi ly tâm 10 phút ở 4°C với 10.000 vòng/phút, dịch nổi chứa DNA được chiết bằng chloroform : isoamyl alcohol (24:1) và rửa bằng 100% isopropanol. DNA được hòa trong đệm TE, pH 8,0 bảo quản ở -20°C.

Phân tích trình tự 28S rRNA

Cặp mồi NL1 (5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG -3'), NL4 (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G -3') được sử dụng để nhân phân đoạn 28S rRNA (khoảng 614 kb) của chủng RM1.1 và RM1.5; cặp mồi PN 4 (5'- CCT TGG TCC TGT TTC AAG ACG GG -3'), PN 9 (5'- CTT AAG CAT ATC AAT AAG CGG AGG -3') được sử dụng để nhân đặc hiệu phân đoạn 28S rRNA của chủng HK1. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 1,5 μl DNA khuôn; 1 μl mỗi mồi loại; 2 μl MgCl_2 ; 1 μl *Taq* DNA polymerase; 2 μl dNTP; 2,5 μl đệm; nước cất khử ion đến 25 μl . Nhiệt độ gắn mồi cặp NL1, NL4 là 50°C; cặp PN4, PN9 là 54°C. PCR được tiến hành: 95°C/5'; 30 chu kỳ (95°C/1', nhiệt độ gắn mồi 50/54°C/1', 72°C/1'); 72°C/10'.

Sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào vector pTZ57R/T nhờ *T_4*-ligase. Sản phẩm gắn được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 α và chọn lọc trên môi trường LB đặc có chứa 100 mg/l ampicillin, 80 mg/l

X-gal, nuôi cấy ở 37°C qua đêm. DNA plasmid được tách chiết và làm sạch bằng Kit QIAGEN.

Trình tự 28S rRNA được đọc trên máy đọc tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Trình tự nucleotide được xử lý bằng phần mềm DNASTar để xác định hệ số tương đồng và dựng cây phân loại.

Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến khả năng sinh tổng hợp enzyme

Trong những thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp cellulase, chủng HK1 được lên men chìm trong môi trường CPY có bổ sung 0,5% bột giấy làm nguồn cơ chất cảm ứng, nuôi lắc ở 30°C với 200 vòng/phút, sau 120 h nuôi cấy, dịch nổi được xác định hoạt tính.

Trong trường hợp cụ thể, từng yếu tố được thay đổi mà vẫn giữ nguyên các yếu tố khác như trên. Xác định nồng độ cơ chất cảm ứng: nồng độ bột giấy biến đổi từ 0,2 - 2%; Xác định khả năng sinh tổng hợp cellulase: thời gian thu mẫu cách nhau 24 h từ 24 - 144 h; Xác định ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường: 4 bình lên men chìm được nuôi cấy ở các nhiệt độ 28, 30, 37 và 40°C; Xác định ảnh hưởng của pH môi trường: 12 bình lên men chìm được nuôi cấy với pH ban đầu được điều chỉnh pH từ 3,0 đến 8,5 (cách nhau 0,5) bằng HCl/NaOH; Xác định ảnh hưởng của nguồn nitrogen và carbon: chủng HK1 được lên men chìm ở pH 5,5, nguồn peptone cũng như cao nấm

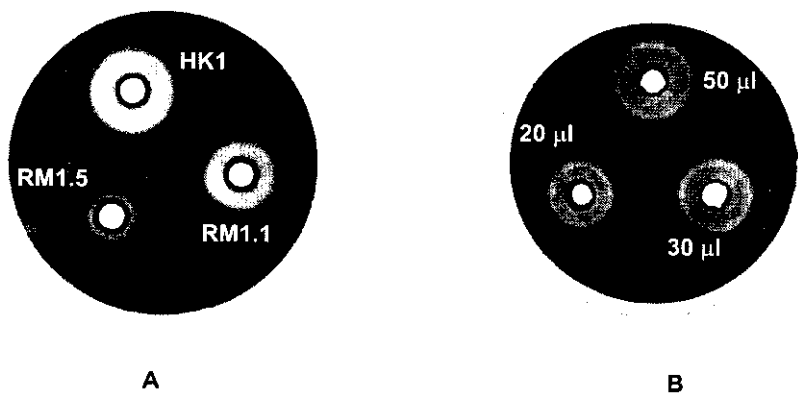
men lần lượt được thay thế bằng các nguồn nitrogen và carbon khác có cùng nồng độ.

Trong môi trường thay thế: nồng độ rơm biến đổi từ 0,1 đến 1,2%; Xác định nồng độ bột đậu tương: biến đổi từ 0,2 đến 1,8% với nồng độ rơm 0,6%; các thành phần khác giữ nguyên như môi trường CPY.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tuyển chọn các chủng vi sinh phân hủy cellulose

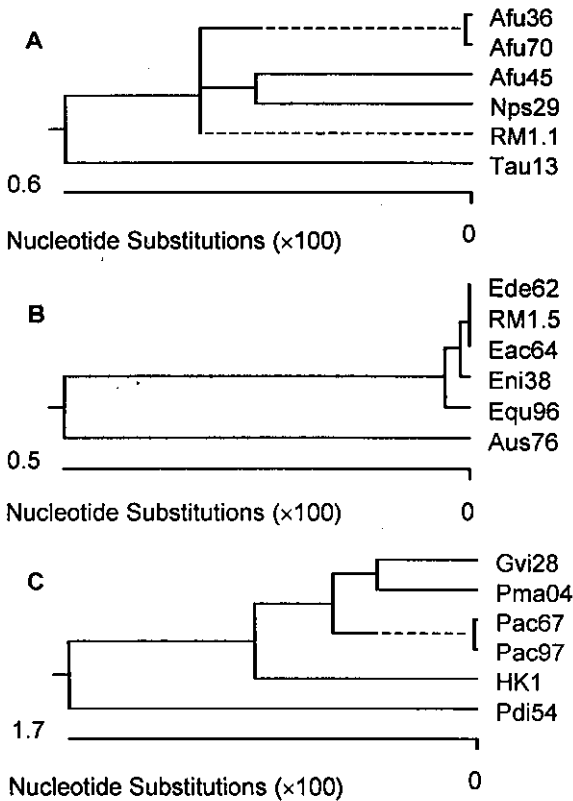
Các mẫu ĐBR, ĐR, RM, NT được phân lập trên môi trường Hutchinson-Clayton thu được 36 chủng nấm sợi, trên môi trường Gauze 1 thu được 10 chủng xạ khuẩn. Mẫu HK phân lập trên môi trường PGA có bổ sung 0,2% CMC thu được 3 chủng nấm sợi. Các chủng nấm sợi và xạ khuẩn được lên men lần lượt trong môi trường Czapek và Gauze 1 với nguồn carbon bằng 0,5% bột giấy. Sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch của hoạt tính cellulase, 36 chủng nấm sợi và xạ khuẩn có hoạt tính cellulase ngoại bào. Trong đó, 3 chủng nấm sợi RM1.1, RM1.5 và HK1 có hoạt tính mạnh nhất. Ba chủng nấm sợi này được nuôi cấy ở 30°C trong môi trường CPY chứa 0,5% bột giấy làm cơ chất cảm ứng sinh cellulase. Dịch nổi nuôi cấy sau 96 h cho thấy chủng HK1 có đường kính vòng phân giải cơ chất lớn nhất trong 3 chủng (Hình 1A), và được chọn để tối ưu môi trường nuôi cấy và đánh giá tính chất lý hóa của cellulase.



Hình 1. Vòng hoạt tính cellulase ngoại bào của 3 chủng RM1.1, RM1.5, HK1 (A) và của chủng HK1 với thể tích dịch nổi khác nhau (B).

Phân loại các chủng nấm sợi dựa vào 28S rRNA

DNA tổng số của 3 chủng nấm trên được tách chiết theo phương pháp CTAB, điện di trên gel agarose, và làm khuôn cho phản ứng PCR với hai cặp mồi NL1, NL4 và PN4, PN9. Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 600 bp được gắn vào vector pTR57R/T, biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Plasmid tái tổ hợp được tinh sạch, cắt kiểm tra với hai enzyme hạn chế *EcoRI* và *HindIII* và đọc trình tự.

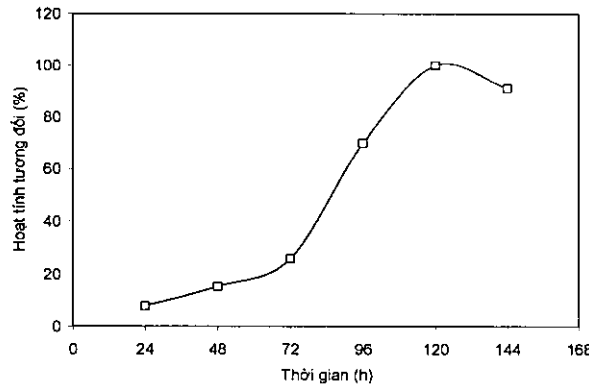


Hình 2. Cây phân loại các chủng nấm sợi: A: Chủng RM1.1; B: Chủng RM1.5; C: Chủng HK1; Afu70: *Aspergillus fumigatus* AY216670; Afu36: *Aspergillus fumigatus* AF109336; Afu45: *Aspergillus fumigatus* AJ438345; Nps29: *Neosartorya pseudofischeri* AF459729; Tau13: *Thermoascus aurantiacus* DQ010013; Aus76: *Aspergillus ustus* AY216676; Eac64: *Emericella acristata* EAU29864; Ede62: *Emericella dentata* EDU29862; Eni38: *Emericella nidulans* AF109338; Equ96: *Emericella quadrilineata* AY213696; Gvi28: *Geosmithia viridis* AB047228; Pac97: *Penicillium aculeatum* AF033397; Pac67: *Penicillium aculeatum* U15467; Pdi54: *Penicillium diversum* DQ308554; Pma04: *Penicillium mameffei* AB219804.

Trình tự phân đoạn gen 28S rRNA của chủng RM1.1, RM1.5 và HK1 lần lượt có chiều dài 614, 615 và 623 bp. So sánh trình tự 28S rRNA với các trình tự trong GenBank cho thấy chủng RM1.1 có độ tương đồng 100% so với *Aspergillus fumigatus* (AY216670, AF109336), 99,7% với chủng *Aspergillus fumigatus* (AJ438345) (Hình 2A); chủng RM1.5 có độ tương đồng 99,8% so với chủng *Emericella acristata* (EAU29864) (Hình 2B); chủng HK1 có độ tương đồng 98,8% với chủng *Penicillium aculeatum* (U15467), 98,5% so với chủng *Penicillium aculeatum* (AF033397), 96,8% với chủng *Penicillium diversum* (DQ308554) (Hình 2C) trên GenBank. Trình tự gen 28S rRNA của các chủng này đã được đăng ký trong GenBank với mã số lần lượt là EF012766 (*Aspergillus fumigatus* strain DTQ-RM1.1); EF025927 (*Emericella* sp. DTQ-RM1.5); EF087978 (*Penicillium* sp. DTQ-HK1).

Khả năng sinh cellulase theo thời gian

Khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào tăng chậm từ 8% (0,031 U/ml) ở 24 h nuôi cấy đến 26% (0,103 U/ml) ở 72 h nuôi cấy, sau 72 h hoạt tính tăng mạnh và đạt cực đại 100% ở 120 h nuôi cấy (0,397 U/ml) sau đó giảm xuống 91% (0,362 U/ml) ở 144 h nuôi cấy (Hình 3).



Hình 3. Khả năng sinh tổng hợp cellulase theo thời gian của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1.

Những nghiên cứu trước đây trên vi khuẩn cho thấy, một số chủng vi khuẩn chịu nhiệt phân lập từ bể ủ rác thải sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất sau 48 h nuôi cấy (Tăng Thị Chính *et al.*, 1999). Các chủng xạ khuẩn chịu nhiệt phân lập từ bể ủ rác thải sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất sau 48 - 72 h nuôi cấy (Tăng Thị Chính *et al.*, 1999), còn các chủng xạ

khuẩn *Actinomyces* ưa ẩm sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất sau 72 - 96 h nuôi cấy (Nguyễn Đức Lương, Đặng Vũ Bích Hạnh, 1999; Phạm Thị Ngọc Lan *et al.*, 1999). Các chủng nấm sợi phân lập từ rác sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất sau 144 h nuôi cấy (Đặng Minh Hằng, 1999), còn ba chủng nấm sợi *Penicillium pinophilum*, *P. persicinum*, *P. brasilianum* có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất (khoảng 0,4 U/ml) sau 110 - 140 h nuôi cấy (Henning *et al.*, 2005). Như vậy, các chủng nấm sợi thường sinh tổng hợp cellulase chậm hơn so với các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn. Chủng nấm sợi *Penicillium* sp. DTQ-HK1 có thời gian và khả năng sinh tổng hợp cellulase tương đương với các chủng *Penicillium* đã công bố (Henning *et al.*, 2005) và cao hơn chủng *P. purpurogenum* (Takashi *et al.*, 1992).

Nhiệt độ nuôi cấy

Chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 là chủng ưa ẩm và nhiệt độ tối ưu cho khả năng sinh tổng hợp cellulase là 30°C trong các nhiệt độ khảo sát. Khả năng sinh tổng hợp cellulase tăng từ 91% (1,1 U/ml) ở 28°C và đạt cực đại 100% (1,17 U/ml) ở 30°C. Khi nhiệt độ tăng cao hơn thì khả năng sinh tổng hợp lại giảm đi và chỉ còn 91% (1,06 U/ml) ở 37°C và 69% (0,81 U/ml) ở 40°C. Các chủng nấm sợi ưa ẩm khác cũng sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất ở dải nhiệt độ 31 - 34°C (Đặng Minh Hằng, 1999).

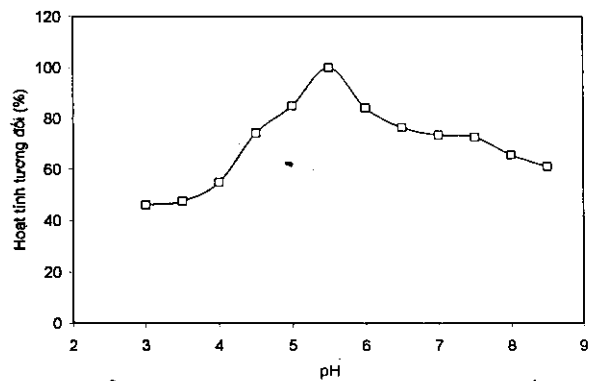
pH môi trường nuôi cấy ban đầu

Khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào mạnh (84 - 100%) trong khoảng pH 5,0 - 6,0 và đạt cực đại 100% ở pH 5,5 (2,59 U/ml). Ở pH thấp (pH < 4,5) và pH cao (pH > 7,0) hoạt tính cellulase ngoại bào chỉ đạt 46 - 73% so với hoạt tính cực đại (Hình 4). Theo nghiên cứu trước đây, các chủng nấm sợi sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất trong khoảng pH 4,5 - 6,0 (Đặng Minh Hằng, 1999). pH ban đầu thích hợp với các chủng vi khuẩn là 6 - 10, còn đối với xạ khuẩn là 7-10 (Tăng Thị Chính *et al.*, 1999). Như vậy, chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 sinh tổng hợp cellulase mạnh trong điều kiện pH môi trường ban đầu nghiêng về acid.

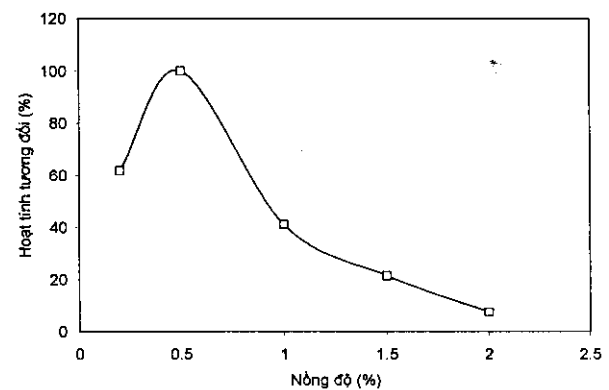
Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất cảm ứng

Tốc độ sinh tổng hợp cellulase ngoại bào tăng từ 62% ở nồng độ 0,2% bột giấy lên cực đại 100% (1,07 U/ml) ở 0,5% bột giấy, sau đó giảm mạnh chỉ còn 7% ở nồng độ 2% bột giấy (Hình 5). Như vậy, bột giấy với nồng độ 0,5% có vai trò cảm ứng còn ở

nồng độ cao lại ức chế khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1.



Hình 4. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1.



Hình 5. Ảnh hưởng của cơ chất bột giấy lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1.

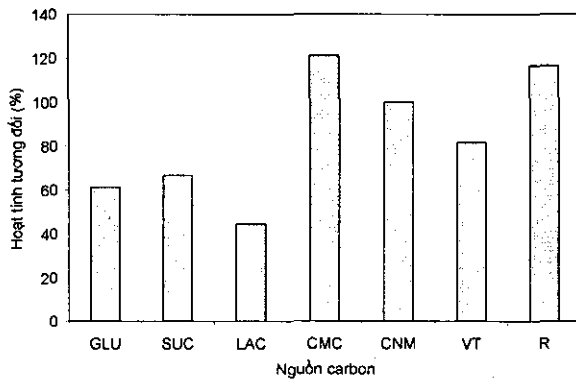
Ảnh hưởng của nguồn carbon

Kết quả cho thấy, khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào trong môi trường có nguồn carbon là CMC và rơm lần lượt tăng 17 và 21% so với môi trường có nguồn carbon là cao nấm men (Hình 6). Trong môi trường có nguồn carbon là lactose và glucose thì khả năng sinh tổng hợp cellulase chỉ đạt 45 và 61% tương ứng so với môi trường chứa cao nấm men.

Hoạt tính cellulase cao nhất ở môi trường chứa

CMC (2,49 U/ml) nhưng đáng chú ý môi trường chứa nguồn carbon là rom (nguồn nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm ở Việt Nam) cũng cho hoạt tính rất cao (2,4 U/ml).

Theo những nghiên cứu trước đây, các chủng nấm sợi sinh tổng hợp cellulase mạnh trong những môi trường có nguồn carbon tự nhiên (Đặng Minh Hằng, 1999; Hoàng Quốc Khánh *et al.*, 2003). Ở một số chủng *Penicillium* có khả năng sinh tổng hợp endoglucanase và β -glucosidase mạnh trong môi trường có nguồn cơ chất cellulose tự nhiên còn đối với nguồn cơ chất là xylan yến mạch và birchwood xylan thì hoạt tính rất thấp (Henning *et al.*, 2005).



Hình 6. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên khả năng sinh tổng hợp cellulase. GLU: glucose; SUC: sucrose; LAC: lactose; CMC: carboxyl methyl cellulose; CNM: cao nấm men; VT: vỏ trấu; R: rom.

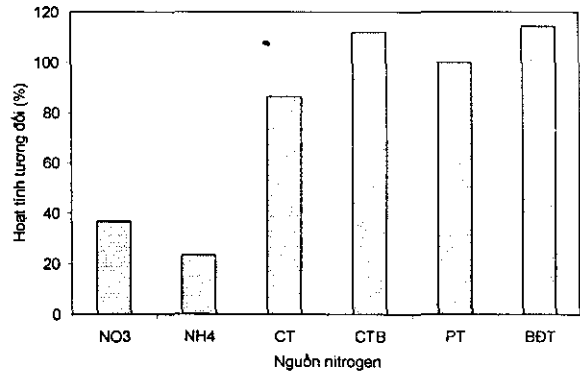
Ảnh hưởng của nguồn nitrogen

Việc sử dụng một số nguồn nitrogen thay thế peptone trong môi trường CPY cho thấy, nguồn nitrogen vô cơ làm giảm khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào xuống còn 23 - 37% so với peptone (Hình 7). Trong khi đó, nguồn nitrogen hữu cơ, đặc biệt nguồn bột đậu tương làm tăng 15% sinh tổng hợp cellulase ngoại bào (2,63 U/ml) của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 so với peptone.

Điều này có thể giải thích vì bột đậu tương vừa cung cấp nguồn nitrogen cho quá trình sinh trưởng vừa chứa các thành phần cellulose khác nhau. Chính thành phần cellulose này đã cảm ứng sinh tổng hợp cellulase nhiều hơn để thủy phân polysaccharide nhằm cung cấp đường khử cho quá trình sinh trưởng.

Nghiên cứu của Tăng Thị Chính và đồng tác giả (1999) cũng nhận thấy rằng nguồn nitrogen hữu cơ

(peptone, cao nấm men và bột đậu tương) thích hợp cho quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của các chủng vi khuẩn chịu nhiệt. Bột đậu tương cũng là nguồn nitrogen ảnh hưởng mạnh tới khả năng sinh cellulase của chủng *Aspergillus niger* (Hoàng Quốc Khánh *et al.*, 2003).



Hình 7. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1. NO₃: NaNO₃; NH₄: (NH₄)₂SO₄; CT: cao thịt; CTB: cao thịt bò; PT: peptone; BDT: bột đậu tương.

Môi trường thay thế

Từ những kết quả trên, chúng tôi đã chọn môi trường thay thế từ những nguyên liệu có sẵn trong nước bằng cách giữ nguyên các thành phần khoáng trong môi trường CPY, thay nguồn peptone và cao nấm men bằng bột đậu tương và rom với nồng độ tương ứng. Khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào trong môi trường thay thế đạt 78% ($1,24 \pm 0,032$ U/ml) so với môi trường CPY ($1,58 \pm 0,032$ U/ml).

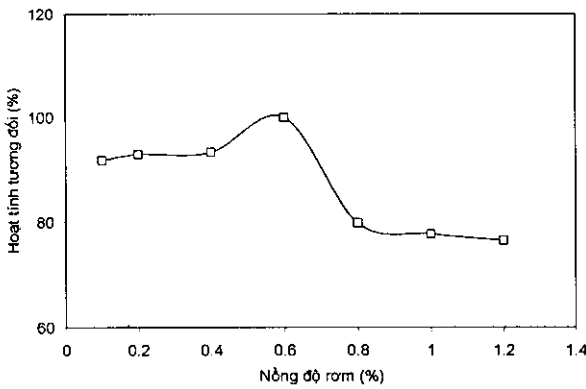
Tối ưu nồng độ rom

Khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào của chủng DTQ-HK1 trong môi trường nuôi cấy thay thế tăng dần từ 92% ở nồng độ rom 0,1% lên cực đại 100% (4,6 U/ml) ở nồng độ rom 0,6% và sau đó giảm xuống 77% ở nồng độ rom 1,2% (Hình 8).

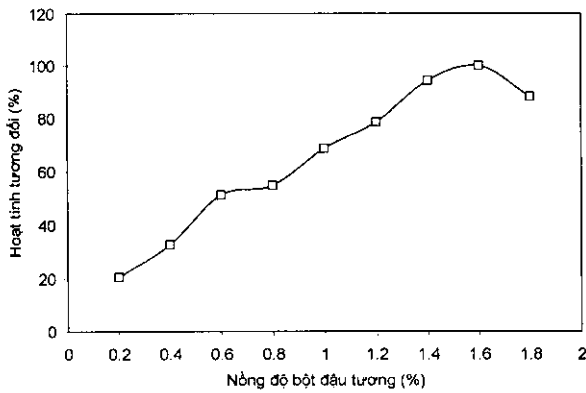
Tối ưu nồng độ bột đậu tương

Khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào của chủng DTQ-HK1 trong môi trường thay thế với 0,6% rom tăng gần như tuyến tính từ 21% ở nồng độ bột đậu tương 0,2% lên 100% (5,09 U/ml) ở nồng độ bột đậu tương 1,6% (Hình 9). Sau đó, hoạt tính giảm xuống 88% ở nồng độ bột đậu tương 1,8%.

Khả năng sinh cellulase ngoại bào của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 trong môi trường thay thế sau khi tối ưu nồng độ bột đậu tương và rơm đã tăng 222% (5,09 U/ml) so với môi trường CPY ban đầu (1,58 U/ml) và 311% so với môi trường thay thế chưa tối ưu nồng độ bột đậu tương và rơm (1,24 U/ml). Để sinh tổng hợp cellulase từ chủng DTQ-HK1 trong một môi trường dễ kiểm, có thể sử dụng 1 lít môi trường thay thế bao gồm 5 g bột giấy; 16 g bột đậu tương; 6 g rơm; 1 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $MgSO_4$; 0,5 g KCl; 10 mg $FeSO_4$; pH 5,5.



Hình 8. Ảnh hưởng của nồng độ rơm đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 trong môi trường thay thế.



Hình 9. Ảnh hưởng của nồng độ bột đậu tương lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 trong môi trường thay thế.

KẾT LUẬN

Từ các mẫu rác thải, rơm mục, đất, giấy ăn và nước thải nhà máy giấy, 49 chủng vi sinh vật đã

được phân lập, trong đó 36 chủng có hoạt tính cellulase. Ba chủng nấm sợi RM1.1, RM1.5, HK1 có khả năng phân hủy cellulose mạnh nhất. So sánh trình tự nucleotide đoạn gen mã hóa 28S rRNA cho thấy chủng RM1.1 có độ tương đồng 100% với chủng *Aspergillus fumigatus* ATCC 16907, chủng RM1.5 có độ tương đồng cao với một số đại diện của chi *Emericella* (99,8%) và chủng HK1 với chi *Penicillium* (98,6%); các trình tự nucleotide này đã được đăng ký trên GenBank với các mã số EF012766 (*Aspergillus fumigatus* strain DTQ-RM1.1), EF025927 (*Emericella* sp. DTQ-RM1.5), EF087978 (*Penicillium* sp. DTQ-HK1).

Chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 sinh tổng hợp cellulase ngoại bào mạnh nhất sau 120 h lên men chìm ở nhiệt độ 30°C, pH môi trường ban đầu 5,5, trong môi trường CPY bổ sung 0,5% cơ chất cảm ứng bột giấy. Nguồn carbon và nitrogen thích hợp là CMC và bột đậu tương.

Môi trường dễ kiểm từ những nguyên liệu sẵn có ở Việt Nam thích hợp với quy mô lên men để sản xuất cellulase là: 5 g bột giấy, 16 g bột đậu tương, 6 g rơm, 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g KCl, 10 mg $FeSO_4$ trong 1 lít môi trường, pH 5,5. Với môi trường này khả năng sinh tổng hợp enzyme tăng gấp 3 lần (5,09 U/ml) so với môi trường CPY (1,59 U/ml).

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm đa enzyme có chất ngjtwf 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

Cheryan MS, Shah PM, Witjitra K (1997) Production of acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Adv Appl Microbiol* 43: 1-33.

Đặng Minh Hằng (1999) Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của một số chủng vi sinh vật đề xử lý rác. *Báo cáo Khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 333-339.

Dürre P (1998) New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 639-648.

Henning J, Morkeberg A, Krogh K, Olsson L (2005)

Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme Microb Tech* 36: 42-48.

Hoàng Quốc Khánh, Ngô Đức Duy, Nguyễn Duy Long (2003) Khả năng sinh tổng hợp và đặc điểm cellulase của *Aspergillus niger* RNNL-363. *Báo cáo Khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 304-307.

Nelson N (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153: 375-380.

Nguyễn Đức Lương, Đặng Vũ Bích Hạnh (1999) Khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Atinomyces griseus*. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 804-809.

Ole K, Borchert T, Fuglsang C (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotech* 13: 345-351.

Phạm Thị Ngọc Lan, Phạm Thị Hòa, Lý Kim Bảng (1999) Tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ mùn rác. *Báo cáo Khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 177-182.

Takashi K, Makoto I Y, Manabu S, Yoichi K, Shoichi T, Fusao T (1992) Induction of cellulase by centiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Appl Environ Microbiol* 58: 106-110.

Tăng Thị Chính, Lý Kim Bảng, Lê Gia Hy (1999) Nghiên cứu sản xuất cellulase của một số chủng vi sinh vật ưa nhiệt phân lập từ bể ủ rác thải. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 790-797.

Teather R, Wood P (1982) Use of congo red-polysaccharide Interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 43: 777-780.

SCREENING AND INVESTIGATING EFFECTS OF CULTIVATION FACTORS ON THE CELLULASE PRODUCTION BY *PENICILLIUM* SP. DTQ-HK1

Trịnh Đình Khả¹, Quyen Dinh Thi^{2,*}, Nguyen Sy Le Thanh²

¹Thai Nguyen University

²Institute of Biotechnology

SUMMARY

Among 49 microbial strains isolated from waste composting, soil, straw, waste water and tissue, 36 strains showed cellulase activity. Three fungal strains RM1.1, RM1.5, HK1 indicating highest activities were selected for study. Alignment of 28S rRNA fragments indicated that strain RM1.1 had 100% homology with *Aspergillus fumigatus* strain ATCC 16907, strains RM1.5 and HK1 had high homology to some representatives of genus *Emericella* (99.8%) and genus *Penicillium* (98.6%), respectively. The 28S rRNA fragment of these strains were deposited in GenBank with accession number EF012766 (*Aspergillus fumigatus* strain DTQ-RM1.1), EF025927 (*Emericella* sp. DTQ-RM1.5), and EF087978 (*Penicillium* sp. DTQ-HK1). *Penicillium* sp. DTQ-HK1 showed maximal cellulase activity (1.58 U/ml) after 120 hours of cultivation at 30°C, pH 5.5, in the CPY medium containing 0.5% paper powder. Soybean powder and straw were suitable nitrogen and carbon sources for maximal cellulase production, respectively. A simple and locally-available medium for large-scale fermentation contained per liter: 5 g cellulose powder, 16 g soybean, 6 g straw, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄, 0.5 g KCl; 10 mg FeSO₄, pH 5.5. In this medium, cellulase production was three times (5.09 U/ml) as high as that in the CPY medium (1.58 U/ml)

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, cellulase production, *Emericella*, *Penicillium*, 28S rRNA

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7568260; Fax: 84-4-8363144; E-mail: quyen@ibt.ac.vn