Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Kỹ thuật và Công nghệ; ISSN 2588–1175

Tập 127, Số 2A, 2018, Tr. 55–68; DOI: 10.26459/hueuni-jtt.v127i2A.4960

SẢN XUẤT CHẾ PHẨM *Aspergillus oryzae* KZ3 KẾT HỢP *Aspergillus awamori* HK1 CÓ KHẢ NĂNG SINH PROTEASE CAO TRÊN MÔI TRƯỜNG BÁN RẮN (NGÔ MẢNH – BỘT MỲ)

Dương Thị Hương, Nguyễn Hiền Trang*

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

Tóm tắt. Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình sản xuất chế phẩm *Aspergillus oryzae* KZ3 kết hợp *Aspergillus awamori* HK1 sinh protease cao trên môi trường bán rắn (ngô mảnh – bột mỳ). Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt độ protease và mật độ tế bào thu được cao nhất lần lượt là 1976,3 (UI/g chất khô) và 8,608 (logtb/g) trên môi trường bán rắn 70% ngô mảnh : 30% bột mỳ; độ ẩm ban đầu của cơ chất thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp protease của chủng *A. oryzae* KZ3 và *A. awamori* HK1 là 55%; tỷ lệ sinh khối nấm mốc *A. oryzae* KZ3 : *A. awamori* HK1 là 0,3:0,1% (so với khối lượng môi trường) với mật độ tế bào lần lượt là 3×10^6 và 1×10^6 sau thời gian nuôi cấy 3 ngày. Chế phẩm được sấy ở 40 °C trong vòng 6 giờ và được bao gói trước khi bảo quản. Kết quả nghiên cứu đã đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1 trên môi trường đã nêu.

Từ khóa: mật độ tế bào, ngô mảnh – bột mỳ, protease, sinh khối nấm mốc

1 Đặt vấn đề

Aspergillus oryzae và *Aspergillus awamori* được biết đến là các loài nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp các enzyme amylase, protease, cellulase... có hoạt tính cao trong môi trường bán rắn theo phương pháp nuôi cấy bề mặt (Lương Đức Phẩm, 1998; Manan và Webb, 2016) [9, 14]. Trong môi trường tự nhiên và nhân tạo, vi sinh vật thường sống thành một quần thể, trong khi ở điều kiện phòng thí nghiệm lại chủ yếu sử dụng chủng riêng lẻ vì một số chủng có tính đối kháng với nhau. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, các chủng vi sinh vật khác nhau lại có tính hợp tác; chúng kết hợp cùng nhau để sản xuất các enzyme khác nhau. Benoit-Gelber và cộng sự (2017) đã thực hiện nghiên cứu việc nuôi cấy kết hợp *A. niger* và *A. oryzae* trên môi trường cám lúa mỳ có khả năng sinh enzyme carbohydrate; Gutierrez- Correa và Portal (1999) đã nghiên cứu và kết luận rằng hoạt độ cellulase tăng lên khi nuôi cấy hỗn hợp *A. niger* và *Trichoderma reesei* trên bã mía [3], [7]. Đặc biệt vào năm 2009, Pilar Dorado và cộng sự đã nghiên cứu và cho rằng việc nuôi cấy hệ lên men rắn (SSF) của hai chủng *A. oryzae* và *A. awamori* trên cám lúa mỳ sẽ sản xuất các phức hợp enzyme giàu enzyme phân giải tinh bột và protein [15].

* *Liên hệ: nguyenhientrang@huaf.edu.vn*

Nhận bài: 27–8–2018; Hoàn thành phản biện: 18–10–2018; Ngày nhận đăng: 10–11–2018

Protease ngoại bào có thể được sản xuất theo phương pháp lên men chìm hoặc lên men bán rắn. Phương pháp lên men bán rắn đặc biệt thích hợp cho sự phát triển của nấm vì chúng yêu cầu độ ẩm thấp hơn so với vi khuẩn (Ogawa và cộng sự, 1995) [11]. Ngoài ra, phương pháp lên men này tương đối đơn giản, rẻ tiền và mang lại hiệu suất sinh tổng hợp enzyme cao (Wang và cộng sự, 2005; Thanapimmetha và cộng sự, 2012) [17], [20]. Cơ chất dùng trong phương pháp lên men này là các sản phẩm nông nghiệp như gạo, cám, ngô mảnh, bột mỳ hay các phế phụ phẩm (Nguyễn Đức Lượng, 2010; Lương Đức Phẩm, 1998) [8], [14]. Trong đó, ngô mảnh là một loại vật liệu rời, tinh bột có trong ngô mảnh thường không tạo thành khối kết dính nên rất thuận lợi để làm môi trường bán rắn trong nuôi cấy bề mặt (Nguyễn Đức Lượng, 2010) [8]. Bên cạnh đó, bột mỳ được xem là nguồn cơ chất tổng hợp protease cao trên môi trường bán rắn (Negi và cộng sự, 2006; Nguyễn Hiền Trang và cộng sự, 2013) [10], [18].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên hoạt độ protease và mật độ tế bào trong chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1 trên môi trường bán rắn (ngô mảnh – bột mỳ) gồm tỷ lệ sinh khối nấm mốc bổ sung, thành phần môi trường, độ ẩm ban đầu của cơ chất, thời gian nuôi cấy và nhiệt độ sấy.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Chủng *A. oryzae* KZ3 và chủng *A. awamori* HK1 phân lập từ các hạt ngũ cốc (đậu tương, ngô) để ứng dụng trong sản xuất *koji* tương, rượu và được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm vi sinh, Khoa Cơ khí – Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

Ngô mảnh được mua tại chợ Tây Lộc, thành phố Huế với thành phần protein 7,9%; glucid 68%; lipid 3,2%, cellulose 1,8%; tro 1,16% và kích thước ≤1,7 mm (tự phân tích).

Bột mỳ trắng được mua tại chợ Tây Lộc, thành phố Huế có thành phần protein ≥9%; lipid ≥1%; carbonhydrate ≥72%, năng lượng ≥340 Kcal.

2.2 Phương pháp

Bố trí thí nghiệm

Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm mốc bổ sung đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc Aspegillus oryzae KZ3 kết hợp Aspergillus awamori HK1

Chuẩn bị 100 g môi trường bán rắn với tỷ lệ 70% ngô mảnh : 30% bột mỳ; môi trường được trải đều với chiều dày 2 cm; độ ẩm ban đầu của cơ chất là 55%; tỷ lệ sinh khối nấm mốc (thu nhận sau quá trình nuôi cấy trên môi trường Czapek-dox ở các điều kiện thích hợp đã khảo sát) bổ sung lần lượt theo các công thức trong Bảng 1. Sau 3 ngày, thu chế phẩm sấy ở 40

°C trong 6 giờ, làm nguội trong bình hút ẩm, bao gói và bảo quản lạnh. Xác định hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm (Nguyễn Đức Lượng, 2010; Nguyễn Hiền Trang và cộng sự, 2013) [8], [18].

Ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần môi trường (ngô mảnh – bột mỳ) đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc Aspegillus oryzae KZ3 kết hợp Aspergillus awamori HK1

Chuẩn bị môi trường bán rắn theo các tỷ lệ trong Bảng 2. Môi trường được hấp tiệt trùng ở 121 °C, 15 phút và điều chỉnh độ ẩm lên 55% bằng nước cất tiệt trùng trước khi bổ sung sinh khối nấm mốc *A. oryzae* KZ3: *A. awamori* HK1 theo tỷ lệ đã chọn. Tiến hành nuôi cấy nấm mốc trên khay ở nhiệt độ phòng trong vòng 3 ngày. Thu mẫu sau 3 ngày và sấy ở 40 °C trong 6 giờ, làm nguội trong bình hút ẩm, bao gói và bảo quản lạnh. Xác định hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm.

Bảng 1. Tỷ lệ sinh khối nấm mốc so với khối lượng môi trường (%)

Đơn vị		**Ký hiệu**									
		ĐC1		ĐC2		CT1		CT2		CT3	
		(%)	CFU/g	(%)	CFU/g	(%)	CFU/g	(%)	CFU/g	(%)	CFU/g
A. oryzae KZ3	**Tỷ lệ**	0,4	4×10^6	0	0	0,1	1×10^6	0,2	2×10^6	0,3	3×10^6
A. awamori HK1		0	0	0,4	4×10^6	0,3	3×10^6	0,2	2×10^6	0,1	1×10^6

Ghi chú: ĐC1: 0,4% *A. oryzae* KZ3; ĐC2: 0,4% *A. awamori* HK1; CT1: 0,1% *A. oryzae* KZ3: 0,3% *A. awamori* HK1; CT2: 0,2% *A. oryzae* KZ3: 0,2% *A. awamori* HK1; CT2: 0,3% *A. oryzae* KZ3: 0,1% *A. awamori* HK1

Bảng 2. Thành phần môi trường nuôi cấy (% tổng khối lượng môi trường)

Ký hiệu		TL 5:5	TL 6:4	TL 7:3	TL 8:2	TL 9:1
Tỷ lệ (%)	**Ngô mảnh**	50	60	70	80	90
	Bột mỳ	50	40	30	20	10

Ảnh hưởng độ ẩm cơ chất đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc

Chuẩn bị môi trường bán rắn gồm ngô mảnh – bột mỳ theo tỷ lệ thích hợp nhất. Tiệt trùng môi trường và điều chỉnh độ ẩm với các giá trị: 40, 45, 50, 55 và 60%. Bổ sung sinh khối nấm mốc *A. oryzae* KZ3 : *A. awamori* HK1 theo tỷ lệ thích hợp đã khảo sát ở trên và nuôi cấy trên khay với bề dày môi trường 2 cm, ở nhiệt độ phòng trong vòng 3 ngày. Thu mẫu sấy ở 40

°C trong 6 giờ, làm nguội trong bình hút ẩm, bao gói và bảo quản lạnh. Xác định hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc

Tạo môi trường bán rắn với các thông số về thành phần môi trường, độ ẩm ban đầu của cơ chất sinh khối nấm mốc đã được chọn ở trên và nuôi cấy trên khay ở nhiệt độ phòng. Tiến hành thu mẫu sau 24, 48, 72, 96 và 120 giờ, sấy ở 40 °C trong 6 giờ, làm nguội trong bình hút ẩm, bao gói và bảo quản lạnh. Xác định hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm.

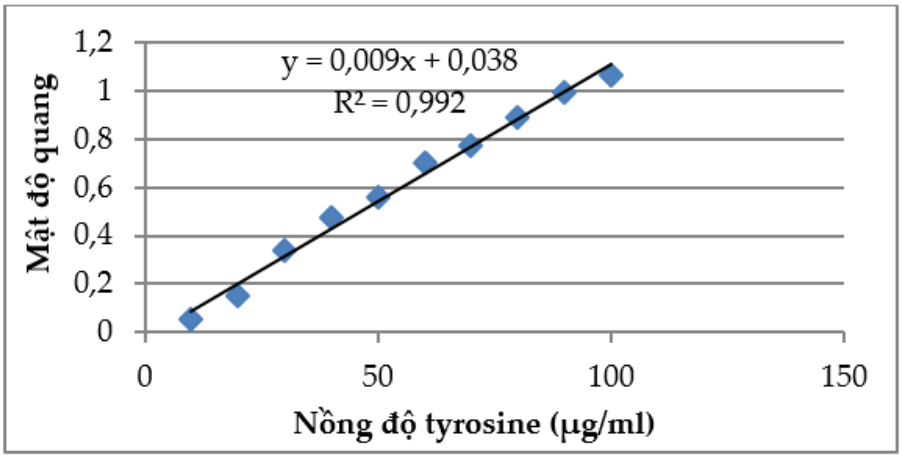
Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc

Tiến hành nuôi cấy chế phẩm với các điều kiện đã khảo sát ở các thí nghiệm trên. Mẫu sau lên men được sấy ở 40, 45, 50 và 55 °C trong 6 giờ để giảm độ ẩm của chế phẩm tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình bảo quản (Nguyễn Hiền Trang và cộng sự, 2013; Lương Đức Phẩm, 1998). Kiểm tra hoạt độ protease, mật độ tế bào và độ ẩm của chế phẩm sau quá trình sấy.

Phương pháp phân tích

Xác định số bào tử nấm sợi bằng buồng đếm hồng cầu: Số bào tử nấm mốc *A. oryzae* KZ3 và *A. awamori* HK1 sau khi làm thuần được xác định bằng phương pháp đếm số bào tử nấm sợi bằng buồng đếm hồng cầu.

Xác định hoạt độ protease bằng phương pháp Anson cải tiến: Hoạt độ protease được xác định dựa theo phương pháp Anson (1938) và Folin cùng cộng sự (1929) với casein làm cơ chất [1], [6]. Cân 1 g mẫu, nghiền mịn và thêm vào 50 mL nước cất. Lắc hỗn hợp để trích ly enzyme (180 vòng/phút, trong 30 phút). Lọc hỗn hợp để thu dịch trích ly và và bảo quản ở 4 °C (không quá 5 ngày để phân tích). Xác định hoạt độ với hỗn hợp phản ứng thủy phân gồm 1 mL dung dịch enzyme và 2 mL dung dịch casein 2% ủ ở 30 °C trong 10 phút để phản ứng thủy phân xảy ra. Sau đó, để kết thúc phản ứng bằng 5 mL dung dịch tricloacetic acid (TCA) 5% (để bất hoạt enzyme và kết tủa chất không được thủy phân) và lắc đều, để yên ở nhiệt độ phòng trong thời gian 10 phút. Tiếp theo, lọc tách kết tủa và thu dung dịch trong suốt. Dung dịch thu được dùng để làm phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin 0,2 N có mặt Na_2CO_3 6%. Cho 1 mL dịch lọc enzyme và 4 mL Na_2CO_3 6% lắc đều. Sau đó, cho thêm 1 mL thuốc thử Folin 0,2 N lắc đều, giữ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 750 nm để xác định hoạt độ protease. Đường chuẩn tyrosin được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Đường chuẩn tyrosine

Cách tính hoạt độ:

Tính đơn vị hoạt độ protease của 1 mL dịch enzyme theo công thức:

$$\text{Hđ}_{\text{proteaase}}\ (\text{UI/mL}) = \frac{\mu mol\ tyrosin \times 8}{t}$$

trong đó, 8 là tổng tỷ lệ thể tích toàn bộ hỗn hợp phản ứng (1 enzyme : 2 casein : 5 TCA); t là thời gian để enzyme tác dụng với cơ chất (10 phút).

Xác định độ ẩm: Độ ẩm cơ chất được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi theo AOAC (1984) ở 103 ± 2 °C trong 2 giờ [2].

Xử lý số liệu

Sử dụng Microsoft excel để xử lý các số liệu thô thu được từ thí nghiệm và phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) để xác định sự sai khác giữa các trung bình bằng phần mềm Minitab 16.

3 Kết quả và thảo luận

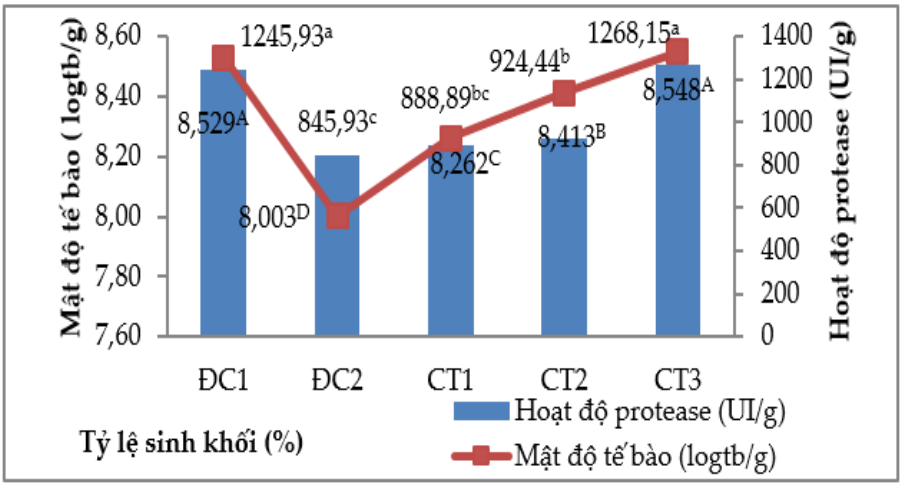
3.1 Ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình sản xuất chế phẩm *Aspergillus oryzae* KZ3 kết hợp *Aspergillus awamori* HK1 trên môi trường bán rắn (ngô mảnh – bột mỳ)

Để bố trí thực hiện thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần môi trường và các điều kiện nuôi cấy đến hoạt độ protease, chúng tôi đã tham khảo một số tài liệu sử dụng phương pháp nuôi cấy bề mặt trên môi trường bán rắn để sản xuất chế phẩm enzyme thô như Nguyễn Đức Lượng (2010), Lương Đức Phẩm (1998) [8], [14].

Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm mốc bổ sung đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc

Theo kết quả Hình 2 ta thấy có sự khác nhau về hoạt độ protease và mật độ tế bào ở những tỷ lệ nấm mốc bổ sung khác nhau. Mẫu ĐC2 cho hoạt độ enzyme và mật độ tế bào thấp nhất với giá trị hoạt độ protease và mật độ tế bào lần lượt là 845,93 UI/g và 8,003 logbt/g. Hoạt độ protease và mật độ tế bào cao nhất ở CT3 với giá trị đạt được tương ứng là 1268,15 UI/g và 8,548 logtb/g. Ở ĐC1 và CT3 ta thu được giá trị hoạt độ protesae và mật độ tế bào không có sự sai khác ($p < 0,05$). Điều này cho thấy không có sự cạnh tranh đáng kể khi nuôi kết hợp *A. oryzae* KZ3 và *A. awamori* HK1 trên môi trường bán rắn (ngô mảnh – bột mỳ). Theo Du và cộng sự (2008), lên men dạng rắn sử dụng *A. oryzae* và *A. awamori* trên môi trường cám mỳ sẽ tạo ra dung dịch giàu enzyme thủy phân tinh bột và protein tạo nên dung dịch giàu amino acid và glucose. Dorado và cộng sự (2009) cũng cho rằng việc bổ sung *A. oryzae* và *A. awamori* vào môi trường rắn cám nghiền mịn hoặc dạng mảnh sẽ tạo ra sản phẩm lên men thức ăn chăn nuôi giàu cacbon và nitơ [5].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với Pilar Dorado và cộng sự (2009). Nhóm tác giả này cho rằng việc nuôi cấy hệ lên men rắn (SSF) của hai chủng *A. oryzae* và *A. awamori* trên cám lúa mỳ sẽ sản xuất các phức hợp giàu enzyme phân giải tinh bột và protein [5]. Bên cạnh đó, Benoit-Gelber và cộng sự (2017) cũng cho rằng việc nuôi kết hợp hai chủng *A. oryzae* và *A. niger* trên môi trường cám lúa mỳ có khả năng sinh enzyme GH7, GH13, GH28, GH31 cao hơn việc nuôi cấy riêng lẻ [3].



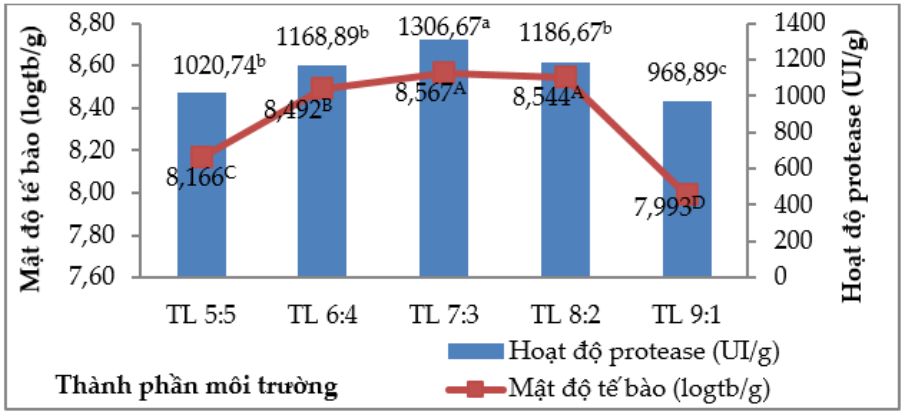
Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm mốc bổ sung đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1

Số liệu có các chữ cái a, b, c; A, B, C biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình với p < 0,05.

Ngoài ra, hoạt độ protease thu được ở ĐC1 cao hơn 2,09 lần so với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hiền Trang và cộng sự, 2013 khi bổ sung riêng rẽ nấm mốc *A. oryzae* N2 (0,4%) trong sản xuất *koji* tương và cũng cao hơn kết quả của Xiu-Juan Wang và cộng sự (2006) khi nghiên cứu tối ưu hóa quá trình sản xuất chế phẩm đa enzyme trên môi trường rắn bởi hỗn hợp hai chủng *A. niger* F_3 và F_4 theo tỷ lệ 1:4 có hoạt độ protease acid là 5,583 U/g [18], [21]. Oyashiki và cộng sự (1989) chọn tỷ lệ nấm mốc bổ sung là 0,2% khi nghiên cứu điều kiện sản xuất *koji* tương từ *A. oryzae* [12]. Đặc biệt, Benoit-Gelber và cộng sự (2017) cũng đã nghiên cứu thành công việc nuôi kết hợp *A. niger* và *A. oryzae* trên môi trường cám mỳ [3]. Nhóm tác giả này cho rằng giữa hai chủng này có sự tương tác ổn định và không có sự cạnh tranh đáng kể nào. Bên cạnh đó, việc kết hợp hai chủng này còn là một lựa chọn thích hợp cho quá trình lên men.

Ảnh hưởng của thành phần môi trường (ngô mảnh – bột mỳ) đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc

Kết quả ở Hình 3 cho thấy hoạt độ protease và mật độ tế bào có xu hướng tăng khi tăng tỷ lệ ngô mảnh và đạt giá trị cực đại là 1306,67 UI/g và 8,567 logtb/g ở tỷ lệ 7:3, nhưng khi tiếp tục tăng ngô mảnh thì hoạt độ enzyme và mật độ tế bào có xu hướng giảm mạnh. Điều này có thể được giải thích như sau: khi bổ sung ngô mảnh vào môi trường lên men thì độ xốp và độ thoáng khí của môi trường được cải thiện dẫn đến khả năng tăng sinh khối của nấm mốc được cải thiện, do đó protease ngoại bào tăng. Ở tỷ lệ 7:3, hoạt độ protease thu được là cao nhất có thể do mức độ thoáng khí và hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy được đảm bảo. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng tỷ lệ ngô mảnh đồng thời giảm tỷ lệ bột mỳ thì độ xốp và độ thoáng khí của môi trường được cải thiện không đáng kể và dinh dưỡng của môi trường giảm nên tốc độ tăng sinh khối và tiết protease ngoại bào giảm vì bột mỳ là nguồn cơ chất sinh protease và amylase cao (Negi và cộng sự, 2006) [10].



Hình 3. Ảnh hưởng của thành phần môi trường (ngô mảnh – bột mỳ) đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1

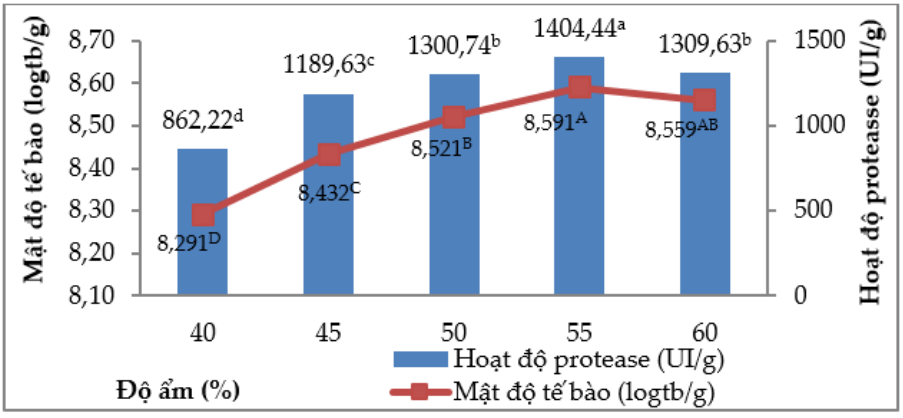
Số liệu có các chữ cái a, b, c; A, B, C biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình với p < 0,05.

Kết quả nghiên cứu phù hợp với kết quả của Nguyễn Hiền Trang và cộng sự (2013) khi bổ sung 6% bột mỳ vào môi trường nuôi cấy sẽ thu được chế phẩm *koji* có hoạt độ protease cao gấp 3,12 lần so với môi trường nuôi cấy chỉ có cám gạo và trấu [18] và cũng phù hợp với kết quả của Benoit-Gelber và cộng sự (2017) khi nghiên cứu nuôi kết hợp *A. niger* và *A. oryzae* trên môi trường cám mỳ cho kết quả tương tác ổn định và không xảy ra cạnh tranh đáng kể nào giữa hai chủng [3]. Bên cạnh đó, Pilar Dorado và cộng sự (2009) cũng chọn cám lúa mỳ làm nguồn cơ chất lên men rắn cho hai chủng *A. oryzae* và *A. awamori* [15]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu thấp hơn Negi và Banerjee (2006) khi nghiên cứu việc tối ưu hóa sản xuất amylase và protease trên môi trường rắn (cám lúa mỳ làm chất nền) trong thiết bị bioreactor với hoạt độ protease thu được là 1930 UI/g [10].

Ảnh hưởng của độ ẩm cơ chất ban đầu đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc

Sự có mặt của nước giúp vi sinh vật hấp thu chất dinh dưỡng từ môi trường dễ dàng hơn. Ngoài ra, nước còn ảnh hưởng đến tính chất lý hóa của cơ chất dẫn đến ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của nấm mốc (Chutmanop và cộng sự, 2008) [4].

Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt độ protease và mật độ tế bào trong chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1 phụ thuộc rất lớn vào hàm lượng ẩm bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Cụ thể, hoạt độ protease và mật độ tế bào tăng từ độ ẩm môi trường 40% đến 55% sau đó có xu hướng giảm dần tới 60%. Kết quả thấp nhất đạt được ở độ ẩm môi trường 40% (826,22 UI/g và 8,291 logtb/g) và đạt giá trị cao nhất ở độ ẩm môi trường 55% (1404,44 UI/g và 8,591 logtb/g).



Hình 4. Ảnh hưởng của độ ẩm cơ chất ban đầu đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1

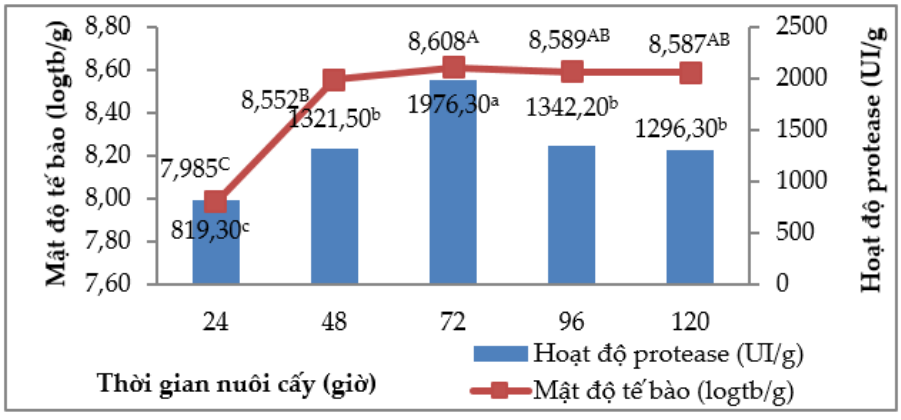
Số liệu có các chữ cái a, b, c; A, B, C biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình với p < 0,05.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với một số tài liệu của Lương Đức Phẩm (1998); Nguyễn Đức Lượng (2010) về độ ẩm môi trường nuôi cấy nấm mốc theo phương pháp bề mặt [8], [14]. Kết quả này cao hơn so với độ ẩm là 50% theo nghiên cứu của Chutmanop và cộng sự (2008) và thấp hơn độ ẩm thích hợp trong nghiên cứu của chúng tôi đã chọn là 60% (Nguyễn Hiền Trang và cộng sự, 2014) [4]. Sự khác nhau này có thể là do thành phần môi trường khác nhau nên yêu cầu về độ ẩm cần cho quá trình tổng hợp enzyme cực đại là khác nhau.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc

Qua kết quả Hình 5 ta thấy rằng hoạt độ protease và mật độ tế bào có sự thay đổi có nghĩa theo thời gian. Hoạt độ protease và mật độ tế bào có xu hướng tăng từ 24 giờ (819,30 UI/g; 7,985 logtb/g) và đạt cực đại ở 72 giờ nuôi cấy là 1976,30 UI/g và 1976,3 logtb/g. Sự giảm hoạt độ enzyme và mật độ của chế phẩm có thể là do càng về thời gian sau của quá trình nuôi cấy, hàm lượng chất dinh dưỡng trong môi trường giảm và sự gia tăng các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật gây bất hoạt enzyme, do đó hoạt độ protease giảm (Wang và cộng sự, 2005; Sankeerthan, 2013) [16], [20].

Kết quả nghiên cứu hoàn toàn phù hợp với Parathaman và cộng sự (2009) khi nuôi cấy *A. niger* để sản xuất protease từ dịch nước thải từ gạo trên môi trường bán rắn [13]. Lương Đức Phẩm cũng cho rằng thời gian nuôi cấy chủng *A. awamori* để thu nhận enzyme là khoảng 48–72 giờ [14]. Trong khi đó, Chutmanop và cs. nhận thấy hoạt độ protease đạt cực đại sau 60 giờ khi nuôi cấy *A. oryzae* trên môi trường cám gạo hoặc cám mỳ [4].



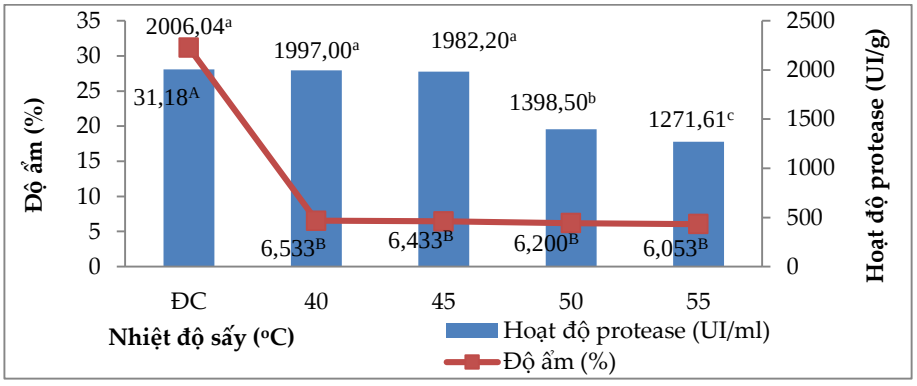
Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1

Số liệu có các chữ cái a, b, c; A, B, C biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình với p < 0,05.

Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến chất lượng của chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1

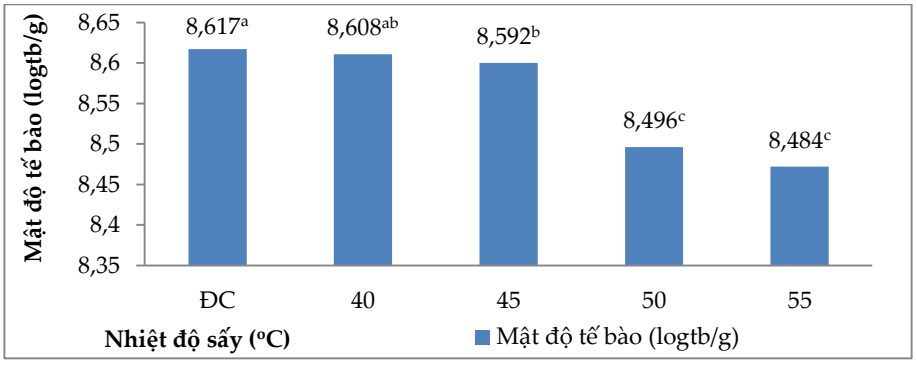
Kết quả ở Hình 5, Hình 6 cho thấy độ ẩm chế phẩm sau 6 giờ sấy giảm mạnh so với mẫu ĐC (giảm 4,8 lần). Việc tăng nhiệt độ sấy từ 40 °C đến 55 °C không có sự ảnh hưởng đáng kể đến sự biến thiên độ ẩm của chế phẩm. Tuy nhiên, hoạt độ protease và mật độ tế bào có xu hướng giảm mạnh khi tiếp tục tăng nhiệt độ sấy từ 1997 UI/g và 8,608 logtb/g ở 40 °C xuống còn 1271,61 UI/g và 8,484 logtb/g ở 55 °C. Do đó, chế độ sấy ở 40 °C trong 6 giờ sẽ đảm bảo độ ẩm và hoạt độ protease và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae KZ3* kết hợp *A. awamori* HK1.

Kết quả nghiên cứu phù hợp với yêu cầu về độ ẩm chế phẩm enzyme thô sau quá trình sấy kết thúc là <10% của Nguyễn Đức Lượng (2010) [8] và cũng phù hợp với chế độ sấy chế phẩm *koji* tương của Nguyễn Hiền Trang và cộng sự, 2013 [18]. Do đó, 40 °C là nhiệt độ thích hợp để sấy chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1.



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hoạt độ protease và độ ẩm của chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1 trong 6 giờ

Số liệu có các chữ cái a, b, c; A, B, C biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình với p < 0,05.



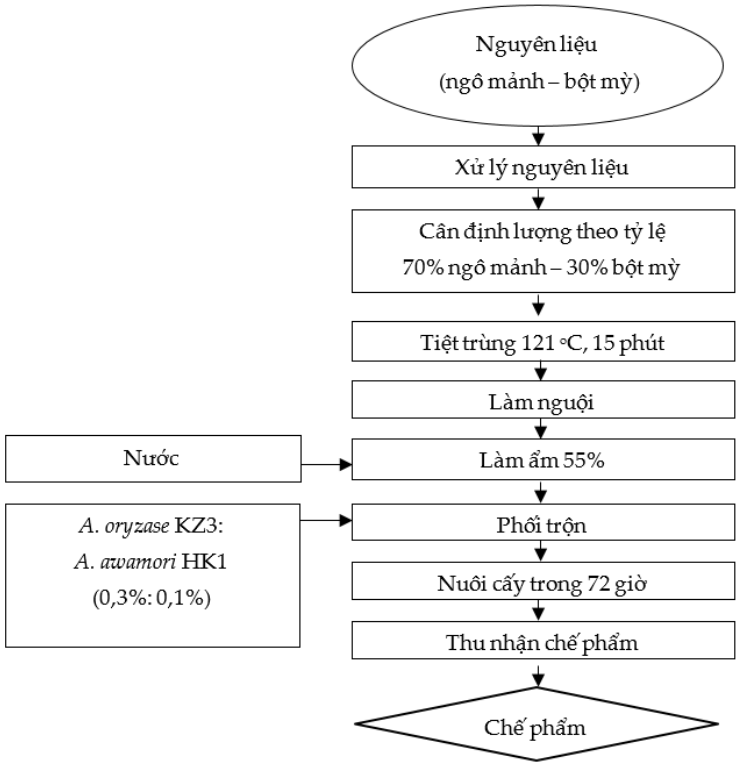
Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến mật độ tế bào của chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1 trong 6 giờ

Số liệu có các chữ cái a, b, c; A, B, C biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình với p < 0,05.

3.2 Đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm *Aspergillus oryzae* KZ3 kết hợp *Aspergillus awamori HK1* có khả năng sinh protease cao trên môi trường bán rắn (ngô mảnh – bột mỳ)

Từ các kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi đã xác định được các điều kiện thích hợp để *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1 sinh protease cao trên môi trường bán rắn (ngô mảnh – bột mỳ). Trên cơ sở đó, chúng tôi đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1.

Chuẩn bị nguyên liệu môi trường (100 g/khay): Nguyên liệu sử dụng cho quá trình nuôi cấy *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1 theo phương pháp bề mặt để sinh tổng hợp protease là 70% ngô mảnh và 30% bột mỳ trong tổng khối lượng môi trường nuôi cấy. Môi trường bán rắn được làm ẩm đến độ ẩm 55% nhằm tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sinh trưởng và phát triển. Sau khi chuẩn bị môi trường, tiến hành tiệt trùng ở 121 °C trong 15 phút để tiêu diệt các vi sinh vật nhiễm vào môi trường nuôi cấy. Để nguội môi trường và bổ sung sinh khối nấm mốc cấy *A. oryzae* KZ3 và *A. awamori* HK1 theo tỷ lệ là 0,3% và 0,1% (mật độ tế bào lần lượt 3×10^6 và 1×10^6, trộn đều và tiến hành nuôi cấy.



Hình 8. Quy trình sản xuất chế phẩm *Aspergillus oryzae* KZ3 kết hợp *Aspergillus awamori* HK1 có khả năng sinh protease cao trên môi trường bán rắn (ngô mảnh – bột mỳ)

Quá trình nuôi cấy nấm mốc: Để đảm bảo cho nấm mốc mọc đều trên môi trường và sử dụng được nhiều chất dinh dưỡng sản sinh enzyme, những lớp môi trường cần được rải mỏng với chiều dày khoảng 2 cm, sau đó đưa vào phòng nuôi cấy. Tiến hành nuôi cấy trong vòng 72 giờ ở nhiệt độ môi trường 28–30 °C và độ ẩm không khí 90–98%. Trong quá trình nuôi cấy cần đảo trộn và bổ sung ẩm thường xuyên để đảm bảo cho nấm mốc phát triển tốt nhất.

Khi thời gian nuôi cấy đạt 3 ngày thì tiến hành thu nhận khối mốc, sấy ở 40 °C trong vòng 6 giờ rồi đem đi nghiền mịn, bảo quản ở 4 °C trong túi nilon kín. Sản phẩm thu được gọi là chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1 ở dạng rắn thô.

4 Kết luận

Chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* KZ3 kết hợp *A. awamori* HK1 được sản xuất với các điều kiện nuôi cấy thích hợp sau: tỷ lệ phối trộn nguyên liệu ban đầu: 70% ngô mảnh và 30% bột mỳ; độ ẩm cơ chất ban đầu là 55, có bổ sung 0,3% *A. oryzae* KZ3 và 0,1% *A. awamori* HK1 (so với khối lượng môi trường); thời gian nuôi cấy 3 ngày. Sau khi nuôi cấy, sấy ở 40 °C trong 6 giờ để giảm độ ẩm của chế phẩm thuận lợi cho quá trình bảo quản nhưng vẫn đảm bảo hoạt độ protease và mật độ tế bào trong chế phẩm cao (1997 UI/g và 8,608 logtb/g).

Tài liệu tham khảo

1. Anson M.L. (1938), The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *Journal of General Physiology*, 22, pp. 79 – 89.
2. AOAC (1984), *Official Methods of* Analysis (OMA), 14th edn, Association of Official Agricultural Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
3. Benoit-Gelber I., Gruntjes T., Vinck A., Van Veluw J.G., Wösten H.A.B. , Boeren S., Vervoort J.J.M., De Vries R.P. (2017), Mixed colonies of Aspergillus niger and Aspergillus oryzae cooperatively degrading wheat bran, *Fungal Genetics and Biology*, 102, pp. 31–37.
4. Chutmanop J., Sinsupha Chuichulcherm, Yusuf Chisti, Penjit Srinophakun (2008),. Protease production by Aspergillus oryzae in soil-state fermentation usinggagroindustrial substrates, *Journal of Chem. Techol. Biotechnol*, 83, pp. 1012 – 1018.
5. Dorado M. P.,Lin S. K. L.,Koutinas A., Du C., Wang R., Web C. (2009), Cereal-based biorefinery development: Utilisation of wheat milling by-productsfor the production of succinic acid, *Journal of Biotechnology*, 143, pp. 51–59.
6. Folin O., Ciocatteu V. (1929), On tyrosine and tryptophan determination in protein, *Journal of Biological Chemistry*, 73, pp. 627
7. Gutierrez-Correa M., Portal L. (1999), Mixed culture solid substrate fermentation of Trichoderma reesei with Aspergillus niger on sugar cane bagasse, *Bioresour, Technol,* 68(2), pp. 173–178
8. Nguyễn Đức Lượng (2010), *Công nghệ vi sinh tập 2*, NXB Đại học quốc gia TP.HCM.
9. Manan M. A. and Webb C. (2016), Multi-enzymes Production Studies in Single Tray Solid State Fermentation with Opened and Closed System, *Journal of Life Sciences*, 10, pp. 342–356

10. Negi S. and Banerjee R. (2006), Optimization of Amylase and Protease Production from Aspergillus awamori in Single Bioreactor Through EVOP Factorial Design Technique, *Food Technol, Biotechnol*, 44 (2), pp. 257–261.
11. Ogawa A., Yasuhara A., Tanaka T., Sakiyama T. and Nakanishi K. (1995), Production of neutral protease by membrane – surface liquid culture of Aspergillus oryzae IAM2704, *J. Ferment. Bioeng*, 80, pp. 35–40.
12. Oyashiki H., Uchida M., Obayashi A., Oka S. (1989), Evalution of koji prepared with various molds for Mirin-Marking, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 67, pp. 163–168.
13. Paranthaman R., Alagusundaram K. and Indhumathi J. (2009), Production of Protease from Rice Mill Wastes by Aspergillus niger in Solid State Fermentation, *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(3), pp. 308–312.
14. Lương Đức Phẩm (1998), *Công nghệ vi sinh vật*, NXB Nông nghiệp – Hà Nội.
15. PilarDorado M., SzeKiCarolLin, ApostolisKoutinas, ChenyuDu, RuohangWang ,ColinWebb (2009), Cereal-based biorefinery development: Utilisation of wheat milling by-productsfor the production of succinic acid, *Journal of Biotechnology*, 143, pp. 51–59.
16. Sankeerthana C., Shabana Pinjar, Rizwana Tabassum Jambagi, Shamala Bhavimani, AnupamaS., Sarovar B. and Shashikala R. Inamdar (2013), Production and Partial Characterization of Protease from Aspergillus Flavus using Rice Mill Waste as a Substrate and its Comparision with Aspergillus niger Protease, *International Journal of Current Engineering and Technology*.
17. Thanapimmetha A., Luadsongkram A., Tipatiwatanakun B., Srinophakun P. (2012), Value added waste of Jatropha curcas residue: Opitimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology, *Industrial Crops and Products*, 37, pp. 1– 5.
18. Nguyễn Hiền Trang, Phạm Trần Thùy Hương, Nguyễn Thị Thủy Tiên (2013), Ảnh hưởng của một số yếu tố tới sự thu nhận protease ngoại bào từ chủng Aspergillus oryzae N2 nuôi cấy trên môi trường bán rắn trong quá trình sản xuất koji tương, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*,24, tr. 65–65.
19. Nguyễn Hiền Trang, Phạm Trần Thùy Hương, Nguyễn Thị Thủy Tiên (2014), Ảnh hưởng của một số yếu tố lên hoạt độ amylase ngoại bào trong chế phẩm koji tương sản xuất từ chủng Aspergillus oryzae N2 nuôi cấy trên môi trường bán rắn, *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, 91(3), tr. 247–256.
20. Wang R., Law R. C. S. and Webb C. (2005), Protease production and conidiation by Aspergillus oryzae in flour fermentation, *Process Biochem*, 40, pp. 217 – 227
21. Xiu-Juan Wang, Ji-Gang Bai and Yun-Xiang Liang (2006), Optimization of multienzyme production by two mixed strains in solid-state fermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), pp. 533 – 540

PREPARATION OF *Aspergillus oryzae* KZ3 COMBINED WITH *Aspergillus awamori* HK1 FOR HIGH PROTEASE BIOSYNTHESIS ON SOLID-STATE MEDIUM (CORN-WHEAT FLOUR)

Duong Thi Huong, Nguyen Hien Trang*

University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

Abstract. This study aimed to investigate the effect of some factors on the protease production on *Aspergillus oryzae* KZ3 combined with *Aspergillus awamori* HK1 preparations on a solid-state medium (corn-wheat flour). The results showed that the highest protease activity and cell density were 1976.3 (UI/g dry material) and 8.608 (log cell/g), respectively, on the solid-state medium containing 70% corn and 30% wheat flour (weight). The moisture content suitable for the protease production of the strains was 55%; the ratio of *A. oryzae* KZ3:*A. awamori* HK1 was 0.3:0.1% (compared with the weight medium) with a cell density of 3×10^6 and 1×10^6 after 3 days of culture. The product was dried at 40 °C for 6 hours and packed before storage. The results of the study suggested a production process of *A. oryzae* KZ3 combined with *A. awamori* HK1 preparations on the solid-state medium (corn-wheat flour).

Keywords: cell density, corn-wheat flour, protease, mold preparations