

NGHIÊN CỨU SINH TỔNG HỢP FERULOYL ESTERAZA BỞI NẤM TRÊN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY LÔNG VỚI CƠ CHẤT GIÀU LICNOXENLULOZA

Vũ Đình Giáp¹, Đỗ Hữu Chí²,
Lê Mai Hương¹, Đỗ Hữu Nghị¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, 29 chủng nấm thuộc nấm đảm (*Basidiomycota*) và nấm túi (*Ascomycota*) được đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzym feruloyl esteraza đối với cơ chất etyla ferulate (EFA). Qua đó đã xác định được hai chủng *Cladosporium spories* SH01 và *Alternaria* sp.SP66 có hoạt tính cao nhất. Do vậy chúng được nghiên cứu khả năng thủy phân cơ chất metyla ferulate (MFA) khi phát triển trên môi trường bổ sung các cơ chất cảm ứng giàu licnoxenluloza và este như: triaxetin (TR), cà chua (CC), đậu tương (ĐT), khoai tây (KT), mùn gỗ (MG), bã ngô (BN), dầu oliu (OL) và rom lúa (RR). Kết quả cho thấy chủng *C.spories* SH01 sinh tổng hợp feruloyl esteraza mạnh trên môi trường bổ sung các cơ chất như mùn gỗ, triaxetin, rom, dầu oliu và bã ngô trong thời gian lên men 21 ngày cho hoạt tính từ 434,9 UL⁻¹ (trên môi trường cơ chất là triaxetin) đến 937,6 UL⁻¹ (trên môi trường cơ chất rom). Chủng *Alternaria* sp.SP66 sinh tổng hợp feruloyl esteraza mạnh trên môi trường bổ sung cà chua, bã ngô, đậu tương, rom, khoai tây và mùn gỗ trong 21 ngày lên men với hoạt tính từ 198,6 UL⁻¹ (trên môi trường bổ sung khoai tây) đến 564,6 UL⁻¹ (trên môi trường cơ chất rom). Điều kiện thích hợp cho sự sinh tổng hợp feruloyl esteraza của chủng *C.spories* SH01 là 28°C, pH=7, hoạt tính enzym cao nhất đạt 1354,5 UL⁻¹. Chủng *Alternaria* sp. SP66 thích hợp ở 25°C, pH=7, hoạt tính enzym cao nhất đạt 1154,4 UL⁻¹.

Từ khóa: Nấm *Cladosporium spories* SH01, *Alternaria* sp.SP66, feruloyl esteraza, cơ chất licnoxenluloza.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi sinh vật phân hủy licnoxenluloza đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì vòng tuần hoàn các bon nhờ khả năng chuyển hóa hiệu quả các vật liệu thực vật bởi hệ enzym thủy phân. Trong số các vi sinh vật phân hủy licnoxenluloza, các loài nấm thuộc *Basidiomycota* và *Ascomycota* được biết là có hệ enzym xúc tác sinh học hiệu quả nhất và được chia thành 3 nhóm: nấm mục trắng, nấm mục nâu và nấm mục mềm. Trong khi có nhiều nghiên cứu tập trung vào nhóm nấm mục trắng và mục nâu (chủ yếu thuộc ngành *Basidiomycota*), có rất ít các nghiên cứu trên hệ enzym chuyển hóa licnoxenluloza bởi nhóm nấm mục mềm (phần lớn thuộc ngành *Ascomycota*). Các loại nấm thuộc *Ascomycota* dường như thiếu các enzym peroxidaza chuyển hóa linhin, nhưng thay vào đó, chúng có các enzym thủy phân cho phép chuyển hóa hiệu quả licnoxenluloza (Liers & cs., 2006; Nghi

& cs., 2012).

Việt Nam có sự đa dạng nấm ở các môi trường sống khác nhau với trên 850 loài nấm lớn (bao gồm các nấm túi và nấm đảm sinh quả thể) đã được xác định và mô tả (Trịnh Tam Kiệt, 2011; Dorfelt & cs., 2004).

Enzym feruloyl esteraza (EC 3.1.1.73) hoạt động trên các chuỗi nhánh của cấu trúc polysacarit thành tế bào để phân cắt liên kết cầu nối giữa các chuỗi xylan và giữa xylan với linhin để tách riêng phần linhin ra khỏi cấu trúc licnoxenluloza. Feruloyl esteraza có thể phá vỡ một phần cấu trúc và loại bỏ một phần thành tế bào thực vật (Benoit I., 2006). Do đó, phức hợp linhin - hydratcacbon có thể trở nên dễ bị tấn công bởi hoạt độ xúc tác của enzym và sự hòa tan sản phẩm chuyển hóa tốt hơn. Do vậy, chúng đóng một vai trò quan trọng ở giai đoạn đầu quá trình thủy phân licnoxenluloza (Hofrichter *et al.*, 2002). Enzym thủy phân này gần đây nhận được nhiều sự quan tâm bởi vai trò của chúng ứng dụng trong công nghiệp giấy và bột giấy (Bauer *et al.*, 2012). Vai trò của feruloyl esteraza từ một số loài nấm trong quá trình phân hủy licnoxenluloza của một số phụ phẩm công-nông nghiệp để giải phóng

¹ Viện Hồ Các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm
Khoa học Công nghệ Việt Nam
² Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học &
Công nghệ Việt Nam

các hợp chất phenolic đã được đánh giá bởi Benoit *et al.* (2006), De Vries (1999), Faulds *et al.* (2006) cũng như bởi nhóm nghiên cứu của chúng tôi (Nghị *et al.*, 2012). Tuy nhiên, hiện nay ở Việt Nam có rất ít các công bố liên quan đến việc sử dụng enzym feruloyl esteraza từ một số loài nấm trong quá trình phân hủy licnoxenluloza từ phụ phẩm công-nông nghiệp. Trên thế giới, một số công bố về feruloyl esteraza liên quan đến sự thủy phân licnoxenluloza đã được tinh sạch và nghiên cứu đặc tính, chủ yếu là từ nguồn nấm và vi khuẩn theo Wong 2006 (ví dụ: *Clostridium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Aspergillus spp* và *Penicillium spp*).

Trong công bố này, trình bày một số kết quả nghiên cứu về sàng lọc các chủng nấm đảm (*Basidiomycota*) và nấm túi (*Ascomycota*) và tối ưu các điều kiện sinh tổng hợp feruloyl esteraza trên môi trường cơ chất giàu licnoxenluloza từ phụ phẩm công-nông nghiệp trên hai chủng nấm *C.spories* SH01 và *Alternaria sp.SP66*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Cơ chất: Các cơ chất giàu licnoxenluloza và cơ chất este khác nhau như: đậu tương, cà chua, khoai tây, rom rạ, mùn gỗ, bã ngô, dầu oliu, triaxetin.

Bộ chủng giống: 29 chủng nấm thuộc ngành *Ascomycota* và *Basidiomycota* được phân lập từ các mẫu thu thập tại VQG Cúc Phương và Tam Đảo hiện đang được lưu giữ tại Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên.

Nấm được phát triển trên môi trường thạch malt (20 gL⁻¹) ở nhiệt độ 23°C và lưu giữ ở 4°C sau khi khuẩn ty phát triển đầy bề mặt thạch. Để nhân giống cho quá trình sinh tổng hợp enzym tiếp theo, khuẩn ty nấm từ môi trường thạch được cấy chuyển sang các đĩa môi trường thạch malt mới, nuôi cấy ở 23°C khoảng 3 tuần để nấm phát triển phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2. Phương pháp đánh giá hoạt độ enzym feruloyl esteraza

Sàng lọc trên đĩa thạch

Các chủng nấm lựa chọn được sàng lọc khả năng sinh feruloyl esteraza dựa trên khả năng thủy phân các liên kết este của các cơ chất chỉ thị trên đĩa thạch (etyla ferulat- EFA).

Dưới các điều kiện vô trùng, khoan thạch (Ø 1

cm) được cắt từ môi trường nuôi cấy đã có sự phát triển của các sợi nấm và cấy chuyển lên đĩa thạch có môi trường Kirk (Kirk *et al.*, 1978) bổ sung cơ chất chỉ thị etyla ferulat (0,1%; w/v). Sau thời gian nuôi cấy 3-7 ngày, nếu vòng phân giải được tạo thành chứng tỏ có sự hoạt động của hoạt tính enzym feruloyl esteraza.

Feruloyl esteraza

Hoạt tính feruloyl esteraza được xác định dựa trên khả năng để metyla hóa metyla ferulat (MFA; 1 mM) thành axit ferulic trong đệm MOPS (3-(*N*-morpholino) propanesulfonic axit). Phản ứng được bắt đầu khi ủ hỗn hợp enzym trong thời gian thích hợp (10-30 phút, phụ thuộc vào mẫu enzym), sau đó ngừng phản ứng bằng cách thêm axetic/axetonitril (11,3%) với thể tích tương đương (Faulds & Williamson, 1994). Sau khi ly tâm, sản phẩm phản ứng là axit ferulic được phân tích bằng HPLC (Alliance series 2695, detector PDA 2996 Waters-Mỹ) sử dụng cột pha đảo C₁₈ và đầu dò DAD (λ=323 nm).

2.3. Xác định nguồn nitơ và cơ chất licnoxenluloza thích hợp

Môi trường cơ bản bao gồm các thành phần: MgSO₄ 0,5 gL⁻¹, KH₂PO₄ 1,5 gL⁻¹, cao nấm men 3,0 gL⁻¹, dịch vi lượng 0,01 L và bổ sung 2% (w/v) cơ chất giàu licnoxenluloza và cơ chất este khác nhau như: đậu tương, cà chua, khoai tây, rom rạ, mùn gỗ, bã ngô, dầu oliu, triaxetin. Các cơ chất trên đều được rửa sạch, nghiền nhỏ (kích thước dài 0,5-0,7 cm), sấy khô, trước khi bổ sung vào bình nón (250 mL) chứa môi trường cơ bản và khử trùng (121°C trong 30 min).

Sử dụng môi trường với thành phần trên, cao nấm men được thay bằng các nguồn nitơ khác nhau: KNO₃ 3,0 gL⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 3,0 gL⁻¹, pepton 3,0 gL⁻¹, NaNO₃ 3,0 gL⁻¹ để xác định khả năng đồng hóa các nguồn nitơ khác nhau.

Nấm được nuôi cấy ở điều kiện thích hợp trong các bình Erlenmeyer 1000 mL hoặc trên thiết bị lên men 2,5 L (AmAr, Mumbai, Ấn Độ) trong điều kiện có sục khí và lắc liên tục (200 v/ph). Cứ 3 ngày lấy 1 ml mẫu để xác định hoạt tính enzym và sự thay đổi pH môi trường. Thử nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần, kết quả thể hiện là giá trị trung bình của các lần thực nghiệm lặp lại.

2.4. Xác định nhiệt độ, pH tối ưu

Chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường cơ

bản (pH 6,5) bổ sung cơ chất và nguồn nitơ thích hợp (2%). Nhiệt độ và pH tối ưu của feruloyl esteraza được xác định bằng cách đo hoạt tính enzym theo phương pháp đã mô tả ở trên sử dụng đệm axetat 100 mM (pH 5,0-5,5) và đệm photphat 100 mM (pH 5,5-8,0), nhiệt độ thay đổi trong khoảng 23-37°C và pH thay đổi 5,0-8,0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc chủng nấm có hoạt tính feruloyl esteraza

Khả năng sinh tổng hợp enzym feruloyl esteraza của 29 chủng nấm thuộc ngành Ascomycota và Basidiomycota được đánh giá qua sự phân giải cơ chất etyla ferulat (etyla 4-hydroxy-3-methoxycinnamat) trên đĩa thạch. Bằng cách quan sát và đo đường kính vòng phân giải cơ chất, 9 trong tổng số 11 chủng nấm thuộc ngành Ascomycota đã được xác định là có khả năng sinh enzym này, trong đó số lượng chủng nấm thuộc ngành Basidiomycota có khả năng sinh enzym trên là 7/18 chủng. Kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Hoạt tính sinh feruloyl esteraza của các chủng nấm nghiên cứu

STT	Tên chủng	Hoạt tính feruloyl esteraza trên đĩa thạch (mm) ⁽¹⁾
Nấm đảm (Basidiomycota)		
1	<i>Coriolus unicolor</i> SH1	0
2	<i>Campanella junghuhnii</i> SH2	0
3	<i>Coprinus disseminates</i> SH7	10,3
4	<i>Inonotus substygius</i> SH9	0
5	<i>Auricularia delicate</i> SH18	2,1
6	<i>Trametes gibbosa</i> SH3	12,2
7	<i>Marasmius maximus</i> SH10	0
8	<i>Ganoderma komingshegii</i> SH11	0
9	<i>Ganoderma</i> sp. CP224	12,1
10	<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i> SH19	0
11	<i>Mycena galericulata</i> . CP227	0
12	<i>Nigroporus aratus</i> CP552	0
13	<i>Hexagonia apiaria</i> CP702	0
14	<i>Ganoderma applanatum</i> CP800	3,6
15	<i>Trametes consors</i> G1	5,4
16	<i>Poria versipora</i> HL02	0
17	<i>Phellinus</i> sp. CP668	0
18	<i>Bionectria</i> sp. CP587	17,6
Nấm túi (Ascomycota)		
19	<i>Hypoxylon monticulosum</i> CP629	20,1
20	<i>Cladosporium spories</i> SH01	24,3
21	<i>Hypoxylons deustrum</i> SH01	4,3
22	<i>Xylaria polymorpha</i> A32	10,6
23	<i>Xylaria polymorpha</i> A34	5,7
24	<i>Xylaria polymorpha</i> A35	23,0
25	<i>Morchela elata</i> A30	4,3
26	<i>Xylaria hypoxylon</i> A38	6,5
27	<i>Daldinia concentrica</i> A20	0
28	<i>Daldinia vernicosa</i> A31	0
29	<i>Alternaria</i> sp. SP66	25,0

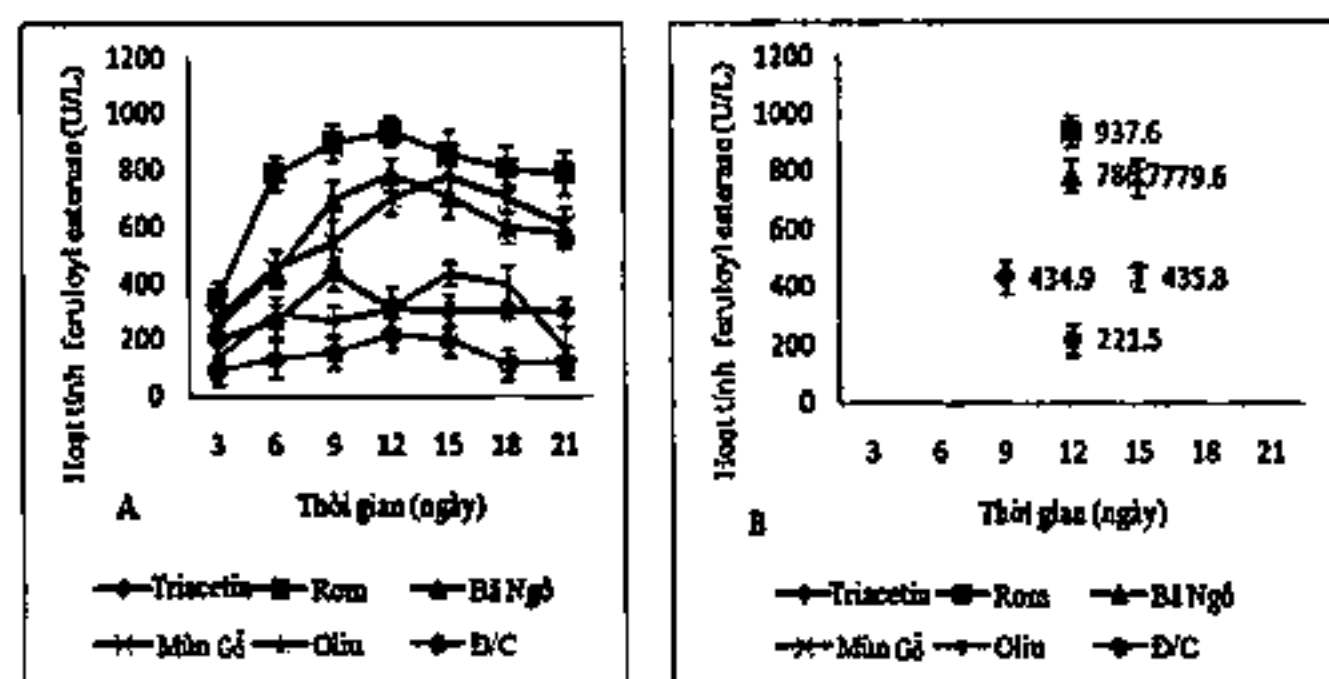
⁽¹⁾ Hoạt tính sinh feruloyl esteraza được xác định thông qua đường kính vòng phân giải cơ chất etyla ferulat của chủng sau 3-5 ngày cấy trên đĩa thạch.

Số liệu ở bảng 1 cho thấy nhiều loài nấm có khả năng sinh tổng hợp enzym feruloyl esteraza, đặc biệt là các loài thuộc Ascomycetes. Theo kết quả ở bảng 1, tỉ lệ chủng nấm có khả năng sinh feruloyl esteraza thuộc ngành *Ascomycota* là 9/11 chủng, tương đương 81% cao hơn đáng kể so với các chủng thuộc *Basidiomycota* là 7/18 chủng, tương đương ~40%. Đường kính vòng phân giải lớn nhất xác định được đối với các chủng thuộc ngành *Ascomycota* là *Cladosporium spories* SH01 và *Alternaria* sp. SP66 (đường kính vòng phân giải lần lượt là $d = 24,3$ mm và 25,0 mm). Hai chủng thuộc *Basidiomycota* có khả năng sinh enzym cao nhất là *Bionectria* sp. CP587 và *Ganoderma* sp. CP224 (đường kính vòng phân giải $d = 17,6$ mm và 12,1 mm).

Do biểu hiện hoạt tính feruloyl esteraza cao của hai chủng *C.spories* SH01 và *Alternaria* sp. SP66, vì vậy hai chủng nấm trên được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo để xác định các điều kiện nuôi cấy như thời gian, cơ chất/nguồn các bon, nguồn nitơ, nhiệt độ và pH.

3.2. Cơ chất thích hợp sinh tổng hợp enzym feruloyl esteraza

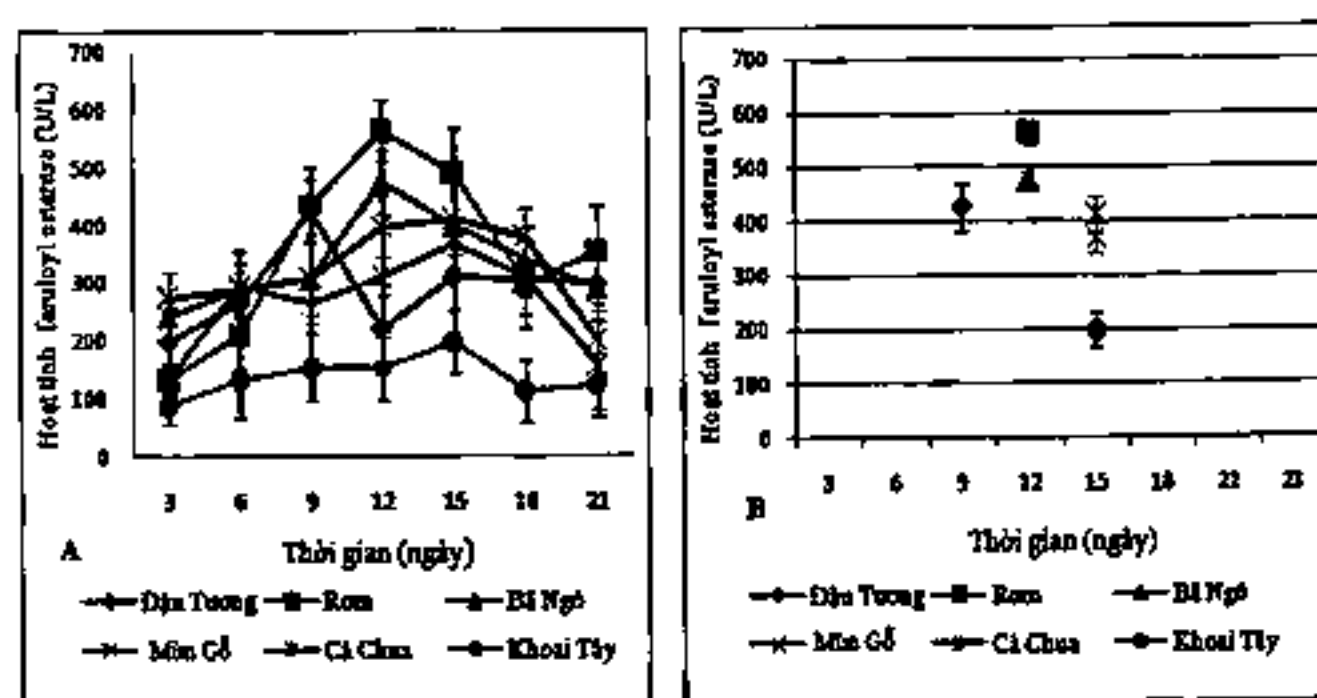
Kết quả được trình bày ở hình 1-A cho thấy *C.spories* SH01 sinh tổng hợp feruloyl esteraza mạnh trên môi trường bổ sung các cơ chất như rom, bã ngô, mùn gỗ, dầu oliu và triaxetin với hoạt tính enzym cao nhất trong thời gian nuôi cấy từ 434,9 UL^{-1} (trên môi trường cơ chất là triaxetin) đến 937,6 UL^{-1} (trên môi trường cơ chất rom). Nguồn các bon từ rom lúa có khả năng làm tăng khả năng sinh tổng hợp feruloyl esteraza của chủng *C.spories* SH01 và cao hơn 4 lần (937,6 UL^{-1}) so với đối chứng không bổ sung thêm nguồn các bon (221,5 UL^{-1}).



Hình 1. Động học sinh tổng hợp feruloyl esteraza (A) và hoạt tính enzym cao nhất (B) trong 21 ngày nuôi cấy *Cladosporium spories* SH01 trên các môi trường có bổ sung cơ chất mùn gỗ, triaxetin, rom, dầu oliu, bã ngô so với đối chứng (Đ/C)

Nhìn chung những môi trường được bổ sung cơ chất có hoạt tính enzym cao hơn so với môi trường không bổ sung cơ chất. Trong các môi trường này sự sinh tổng hợp enzym của nấm bắt đầu ngay sau 3 ngày nuôi cấy, sinh tổng hợp feruloyl esteraza mạnh sau từ ngày thứ 9 và suy giảm ở ngày thứ 21 (hình 1-A). Hoạt tính enzym cao nhất thu được sau ngày nuôi cấy thứ 12 đối với cơ chất rom và bã ngô, trong khi ở môi trường có cơ chất dầu oliu, mùn gỗ ở ngày 15 và triaxetin ở ngày 9 (hình 1-B).

Chủng *Alternaria* sp. SP66 được nuôi cấy trên môi trường cà chua (CC), khoai tây (KT), đậu tương (ĐT) cũng như môi trường cơ chất giàu licnoxenluloza như bã ngô (BN) rom (RR) và mùn gỗ (MG). Kết quả được trình bày ở hình 2-A cho thấy *Alternaria* sp. SP66 đều sinh tổng hợp feruloyl esteraza mạnh với các môi trường trên. Hoạt tính enzym cao nhất trong thời gian nuôi cấy là từ 198,6 UL^{-1} (trên môi trường khoai tây) đến 564,6 UL^{-1} (trên môi trường cơ chất rom). Trong các môi trường này sự sinh tổng hợp enzym của nấm bắt đầu ngay sau 3 ngày nuôi cấy, sinh tổng hợp feruloyl esteraza mạnh sau từ ngày thứ 9 và suy giảm ở ngày thứ 21 (hình 2-A). Hoạt tính enzym cao nhất thu được sau ngày nuôi cấy thứ 12 đối với cơ chất rom và bã ngô, trong khi ở môi trường có cơ chất khoai tây, mùn gỗ và cà chua ở ngày 15 và môi trường đậu tương ở ngày 9 (hình 2-B). Do vậy rom là nguồn cơ chất thích hợp cho sự sinh tổng hợp feruloyl esteraza ở ngày nuôi cấy thứ 12.



Hình 2. Động học sinh tổng hợp feruloyl esteraza (A) và hoạt tính enzym cao nhất (B) trên môi trường bổ sung cà chua (CC), bã ngô (BN), đậu tương (ĐT), rom (RR), khoai tây (KT) và mùn gỗ (MG) của chủng *Alternaria* sp. SP66

Đa số các nguồn các bon khảo sát đều làm tăng năng suất sinh tổng hợp feruloyl esteraza của chủng nấm. Điều này được giải thích là do trong các nguồn các bon, xenluloza được tổng hợp bởi

các đường đơn liên kết với nhau bằng các glicozit, để có nguồn đường cung cấp cho quá trình trao đổi năng lượng nấm phải sinh tổng hợp enzym feruloyl esteraza cao để thủy phân cơ chất trong môi trường lên men. Do đó, đa số các nguồn các bon có vai trò làm tăng năng suất sinh tổng hợp feruloyl esteraza và rom lúa là nguồn cơ chất thích hợp cho sự sinh tổng hợp feruloyl esteraza của hai chủng nấm trên.

3.3. Khả năng đồng hóa các nguồn nitơ sinh tổng hợp enzym feruloyl esteraza

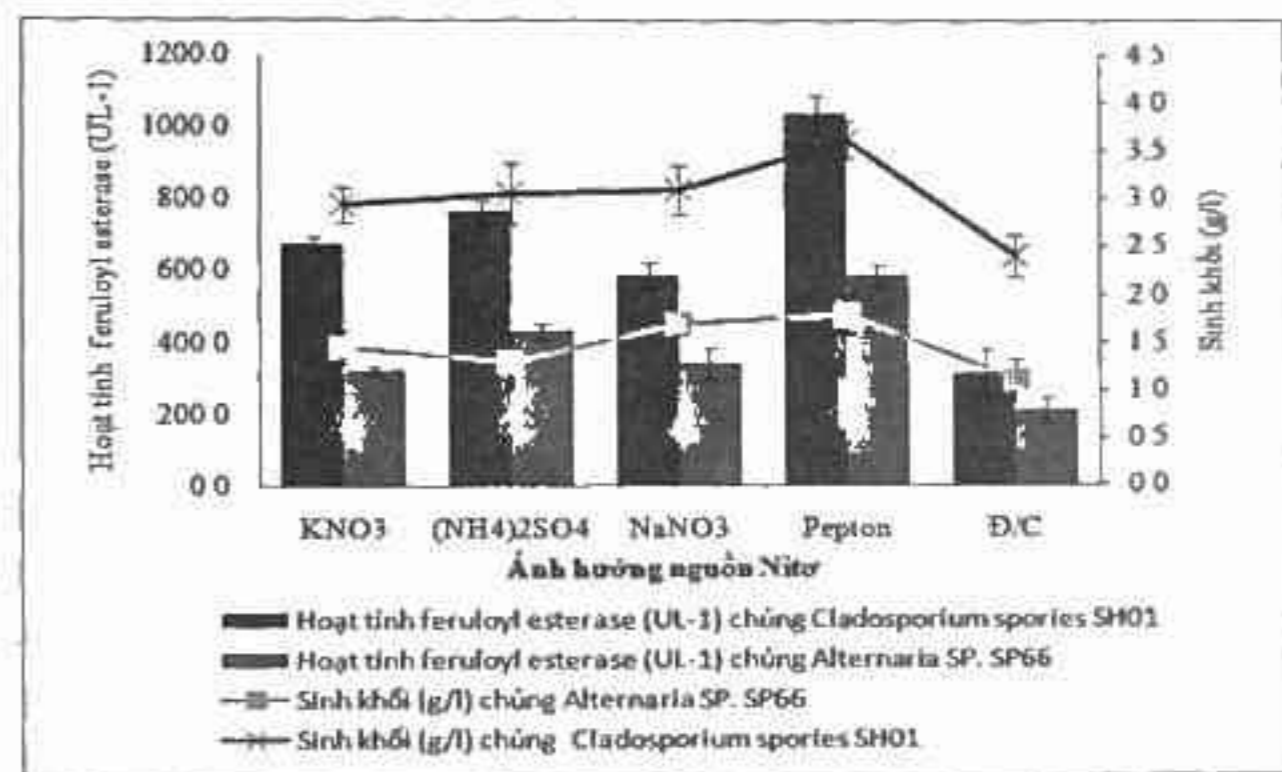
Cùng với nguồn các bon, nitơ là một trong những yếu tố dinh dưỡng ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp enzym feruloyl esteraza của nấm trong điều kiện nuôi cấy dịch lỏng. Do vậy, các nguồn nitơ khác nhau như: KNO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, pepton được bổ sung vào môi trường lên men. Nấm được nuôi cấy ở các điều kiện thích hợp sử dụng cơ chất là rom nghiền nhỏ (nguồn các bon) sau 12 ngày nuôi cấy.

Hai chủng nấm *C.spories* SH01 và *Alternaria* sp. SP66 được lên men trong môi trường có bổ sung các nguồn nitơ khác nhau. Kết quả cho thấy, các nguồn nitơ trên làm tăng năng suất sinh tổng hợp feruloyl esteraza của chủng *C.spories* SH01 ít nhất từ 1,9 lần (nguồn nitơ từ $(NH_4)_2SO_4$) đến 3,3 lần (nguồn nitơ từ pepton) so với đối chứng. Đặc biệt, nguồn nitơ hữu cơ từ pepton cho hoạt độ enzym cao nhất so với các nguồn nitơ khác (Hình 3).

Khả năng sinh tổng hợp feruloyl esteraza của mỗi chủng nấm là khác nhau và phụ thuộc khác nhau vào nguồn nitơ. Với chủng *Alternaria* sp.SP66 các nguồn nitơ trên cũng ảnh hưởng khá lớn lên khả năng sinh tổng hợp enzym này. Thể hiện, nguồn nitơ từ KNO_3 , $(NH_4)_2SO_4$ và $NaNO_3$ hoạt độ enzym tăng tương ứng là 1,52, 2,07 và 1,63 lần so với đối chứng. Riêng nguồn nitơ từ pepton năng suất sinh tổng hợp feruloyl esteraza tăng cao nhất (2,8 lần) (Hình 3).

So sánh khả năng sinh tổng hợp enzym từ các nguồn nitơ khác nhau của hai chủng nấm trên nhận thấy chúng đều thích hợp với nguồn nitơ hữu cơ từ pepton hơn so với các nguồn còn lại. Chủng *C.spories* SH01 hoạt độ enzym tăng mạnh hơn so với chủng *Alternaria* sp.SP66 trong tất cả các nguồn nitơ nghiên cứu. Mặt khác với nguồn nitơ từ pepton hai chủng *C.spories* SH01 và *Alternaria* sp.SP66 thu được sinh khối cao nhất là $3,6 gL^{-1}$ và $1,7 gL^{-1}$.

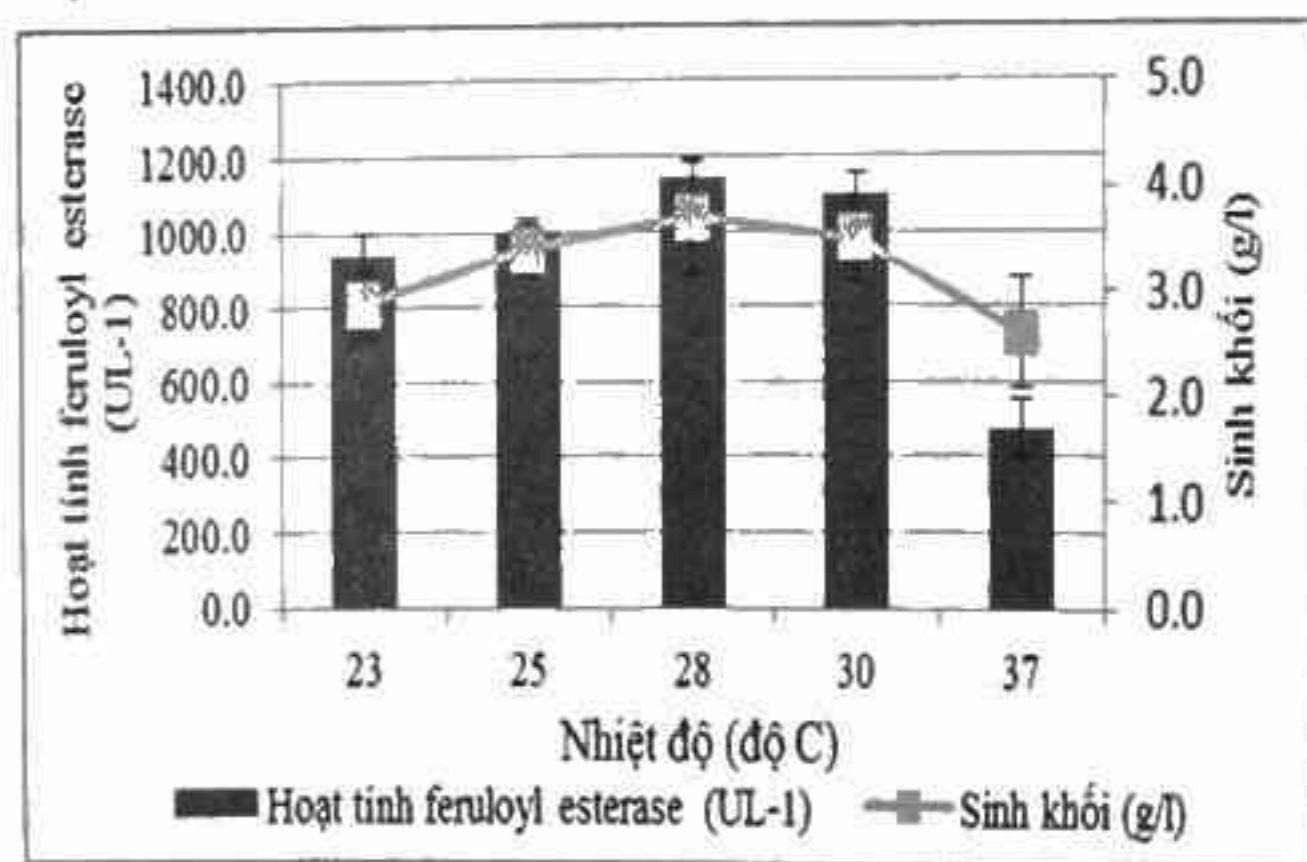
Theo nghiên cứu của Shiyi Ou và cộng sự (2011) khả năng sinh tổng hợp feruloyl esteraza của nấm *Aspergillus niger* phụ thuộc khác nhau vào nguồn nitơ. Theo đó, Chủng nấm *Aspergillus niger* sinh tổng hợp feruloyl esteraza từ nguồn $(NH_4)_2SO_4$ ($6,23 mUg^{-1}$) cao hơn so với KNO_3 ($4,84 mUg^{-1}$) trên môi trường rắn. Do vậy, pepton là nguồn nitơ thích hợp đối với hai chủng nấm trên.



Hình 3. Khả năng đồng hóa các nguồn nitơ khác nhau của hai chủng nấm *Cladosporium spories* SH01 và *Alternaria* sp.SP66

3.4. Nhiệt độ thích hợp cho sinh tổng hợp enzym

Để xác định nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển sinh khối và sinh tổng hợp enzym feruloyl esteraza của hai chủng nấm *C.spories* SH01 và *Alternaria* sp.SP66, thành phần môi trường trên được bổ sung nguồn cơ chất rom, nguồn nitơ pepton, pH được điều chỉnh về 6,5. Nấm được nuôi cấy dưới điều kiện lắc 200 v/ph trong dải nhiệt độ khác nhau: $23^{\circ}C$, $25^{\circ}C$, $28^{\circ}C$, $30^{\circ}C$ và $37^{\circ}C$ sau 12 ngày.

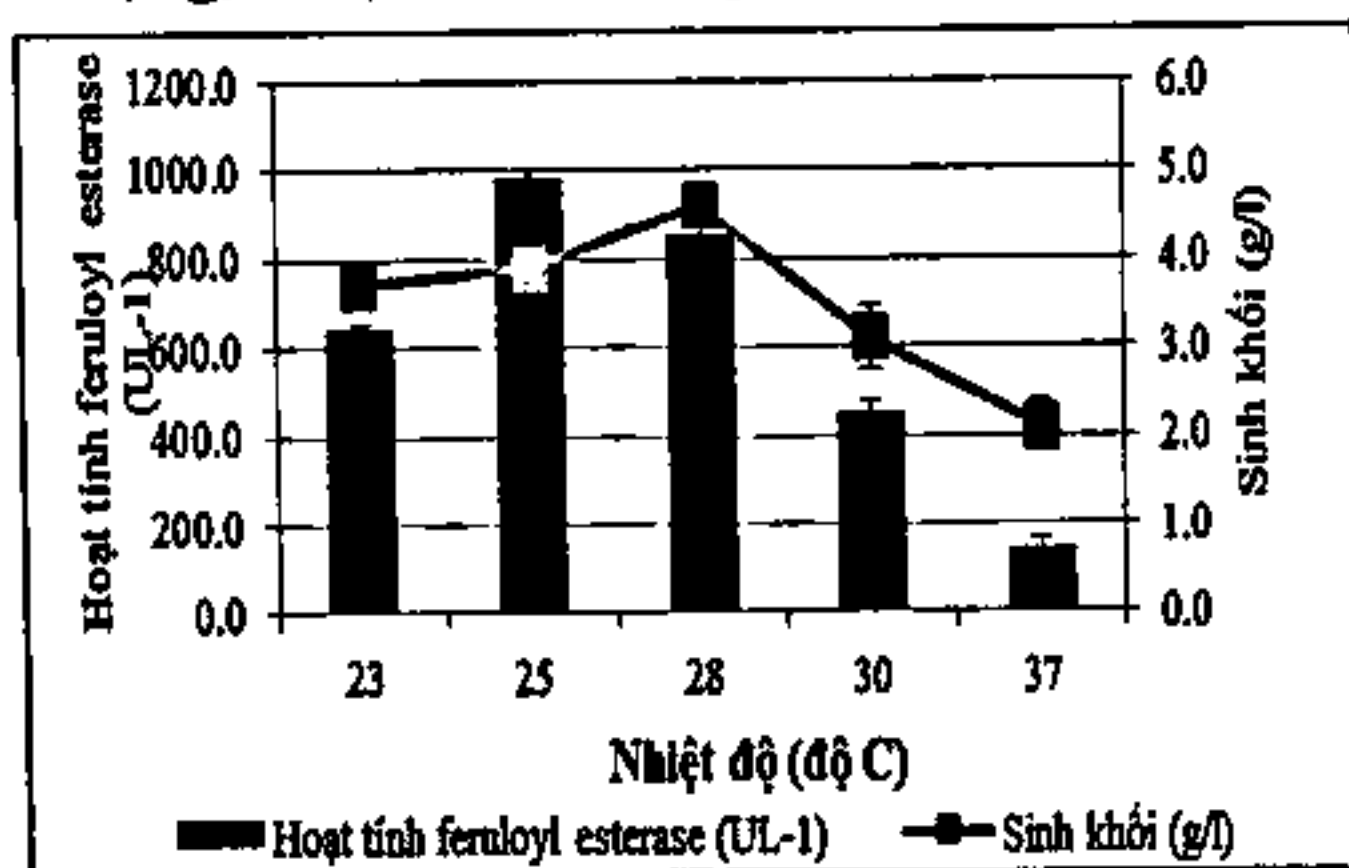


Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh tổng hợp enzym feruloyl esteraza của *Cladosporium spories* SH01 trên môi trường lỏng

Hình 4 cho thấy ở $28^{\circ}C$, sau 12 ngày lên men lỏng thì chủng *C.spories* SH01 sinh feruloyl esteraza cao nhất ($1124,4 UL^{-1}$). Ngoài khoảng nhiệt độ trên hoạt tính enzym giảm rõ rệt trong

khoảng 450 – 900 UL⁻¹. Đặc biệt khi nhiệt độ tăng lên 37°C hoạt tính enzym giảm nhiều nhất còn 432,5 UL⁻¹. Sinh khối thu được cao nhất tại 28°C (3,5 g/l) và bắt đầu giảm dần khi tăng nhiệt độ. Như vậy tại 28°C hiệu suất sinh tổng hợp feruloyl esteraza cao nhất.

Hoạt tính enzym feruloyl esteraza của chủng *Alternaria sp.SP66* trong dải nhiệt độ từ 23°C đến 37°C như sau: Tại 25°C hoạt tính feruloyl esteraza cao nhất đạt 989,5 UL⁻¹ và thấp nhất là 143,2 UL⁻¹ tại 37°C (Hình 5). Tuy nhiên, sinh khối thu được cao nhất 4,6 g/L⁻¹ tại 28°C và thấp nhất 2,1 g/L⁻¹ tại 37°C.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh tổng enzym feruloyl esteraza trên môi trường lên men lỏng của *Alternaria sp.SP66*

Năm 2002 Asther M. và cộng sự đã xác định được hoạt tính feruloyl esteraza từ *Aspergillus niger* I-1472 trong điều kiện lên men lỏng, hoạt độ enzym cao nhất tại 25°C và khi nhiệt độ tăng lên 38°C thì hoạt tính giảm còn 50%, khi tăng nhiệt độ lên 45°C thì hoạt độ còn 15% sau 8 ngày nuôi cấy.

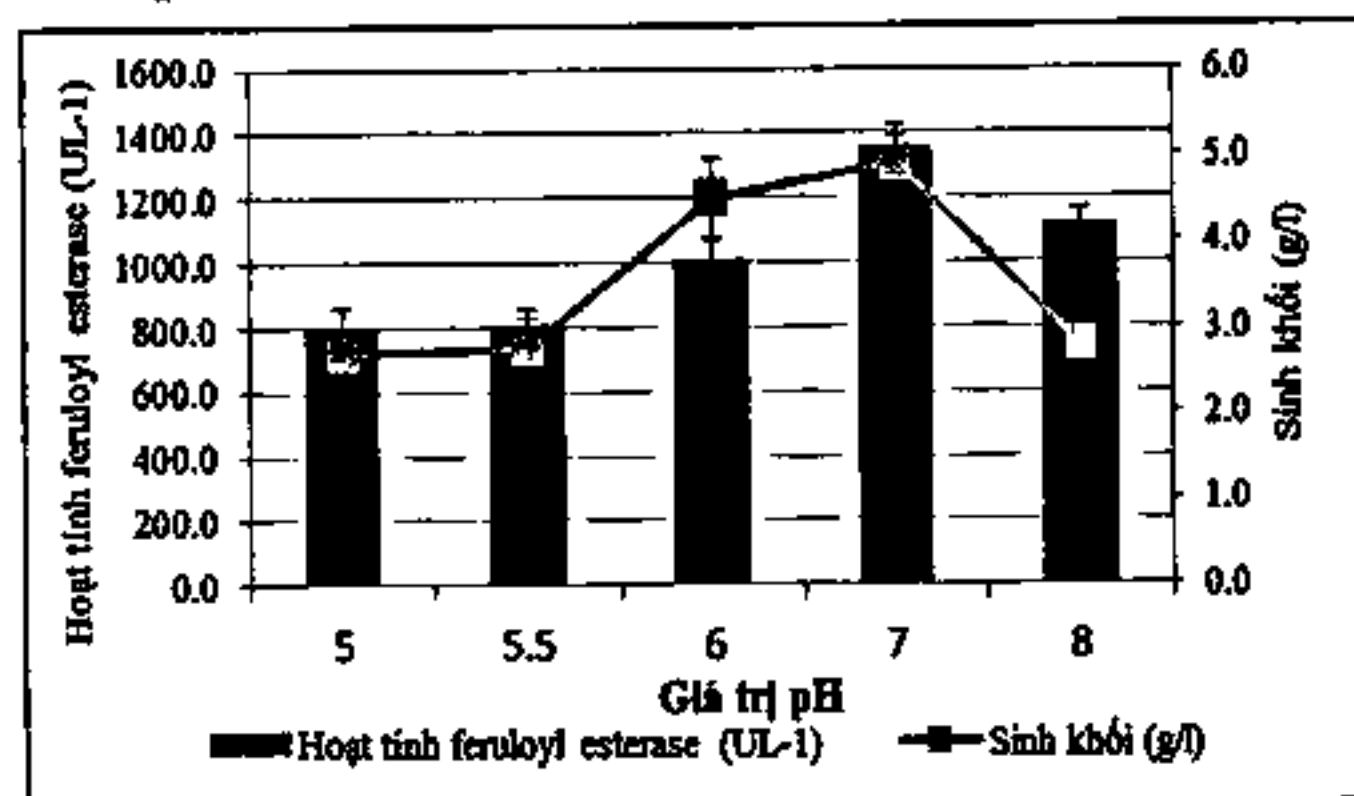
Theo Donaghy J. A. và cộng sự (1995) nghiên cứu trên hai chủng *Penicillium expansum*, *Penicillium brevicompactum* cho thấy nhiệt độ tối ưu để tổng hợp enzym feruloyl esteraza là 25-30°C, với chủng *Aspergillus niger* là 40°C.

Nhiệt độ phản ứng ảnh hưởng mạnh mẽ đến hoạt tính xúc tác của enzym, mỗi enzym có một khoảng nhiệt độ phản ứng thích hợp. Trong giới hạn nhiệt độ chưa làm biến tính enzym. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng quá giới hạn thì hoạt tính enzym lại giảm. Nguyên nhân có thể khi nhiệt độ tăng cao đã làm đứt gãy một số liên kết yếu trong phân tử protein enzym, làm thay đổi cấu trúc của phân tử này, đặc biệt là cấu trúc trung tâm hoạt động của enzym.

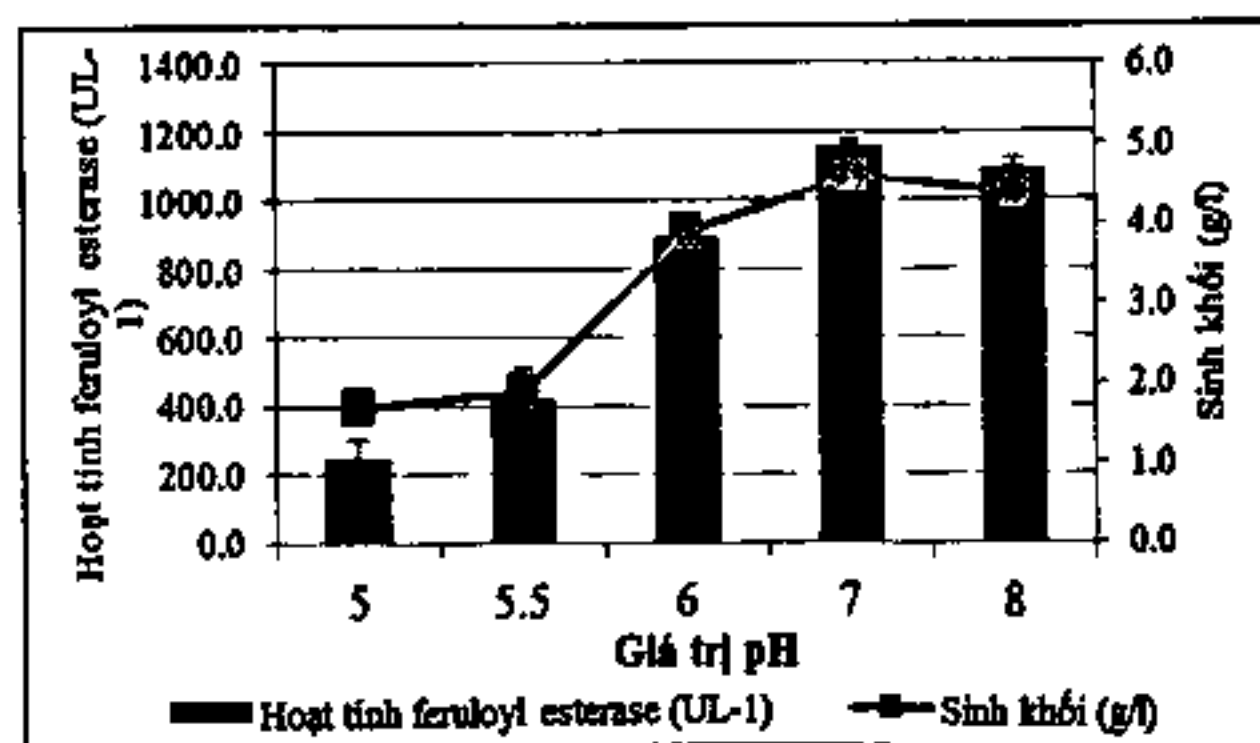
3.5. pH ảnh hưởng tới sinh tổng hợp enzym feruloyl esteraza

Để xác định pH phản ứng tối ưu, phản ứng được thực hiện trong đệm kali phốt phát pH 5-8. Hai chủng nấm *C.spories* SH01 và *Alternaria sp.SP66* đều có khả năng sinh trưởng, phát triển trong dải pH từ 5 đến 8, tuy nhiên khả năng sinh enzym feruloyl esteraza và sinh khối của chúng đều giảm khi pH môi trường là axit hay bazơ. Giá trị pH thích hợp nhất của hai chủng là 7.

pH môi trường lên men ảnh hưởng tới sinh tổng hợp enzym. Ở pH 7, hai chủng trên sinh tổng hợp feruloyl esteraza cao nhất, lần lượt đạt 1354,5 UL⁻¹ và 1154,4 UL⁻¹ và thấp nhất là 800,3 UL⁻¹ và 254,3 UL⁻¹ tại pH 5 sau 12 ngày lên men. Đồng thời tại pH 7 hai chủng trên cho sinh khối cao nhất là 4,9 g/L⁻¹ và 4,6 g/L⁻¹ (Hình 6 và 7). Do pH môi trường ảnh hưởng đến độ bền của enzym nên việc lựa chọn đệm pH thích hợp là rất quan trọng. Có những loại enzym bền trong môi trường axit; trung tính và kiềm. Như vậy 2 chủng nấm trên sinh enzym feruloyl esteraza cao nhất ở pH 7.



Hình 6. Ảnh hưởng của pH lên sự sinh tổng enzym feruloyl esteraza trên môi trường lên men lỏng của *Cladosporium spories* SH01



Hình 7. Ảnh hưởng của pH lên sự sinh tổng enzym feruloyl esteraza trên môi trường lên men lỏng của chủng *Alternaria sp.SP66*

4. KẾT LUẬN

- Tuyển chọn được 9 chủng thuộc *Ascomycota* và 7 chủng thuộc *Basidiomycota* có khả năng sinh enzym feruloyl esteraza. Trong đó, chủng *Cladosporium spories* SH01 và *Alternaria* sp.SP66 (thuộc nhóm nấm *Ascomycota*) có hoạt tính cao nhất với đường kính vòng phân giải lần lượt là 24,3 mm và 25,0 mm.

- Điều kiện thích hợp sinh tổng hợp feruloyl esteraza của hai chủng nấm *Cladosporium spories* SH01 và *Alternaria* sp. SP66 như sau:

Đối với chủng *Cladosporium spories* SH01: Môi trường cơ bản có bổ sung nguồn cơ chất/nguồn các bon là rơm, nguồn nitơ là pepton sau 12 ngày lên men dịch thể, nhiệt độ 28°C, pH = 7 trong điều kiện nuôi lắc 200 v/ph, hoạt tính enzym feruloyl esteraza cao nhất đạt 1354,5 U/L⁻¹.

Đối với chủng *Alternaria* sp.SP66: Môi trường cơ bản có bổ sung nguồn cơ chất là rơm, nguồn nitơ là pepton sau 12 ngày lên men, nhiệt độ 25°C, pH = 7 trong điều kiện nuôi lắc 200 v/ph, hoạt tính feruloyl esteraza cao nhất đạt 1154,4 U/L⁻¹.

Thành phần môi trường nuôi cấy 2 chủng như sau: MgSO₄ 0,5 gL⁻¹, KH₂PO₄ 1,5 gL⁻¹, pepton 3,0 gL⁻¹, dịch vi lượng 0,01 L), pH=7 và bổ sung 2% (w/v) cơ chất rơm.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED;106-NN.02-2013.44), đề tài độc lập cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST.DLT.01/14-15).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bauer J. L., Harbaum-Piayda B., Schwarz K. (2012). A review of phenolic compounds from hydrolyzed and extracted fiber-rich by-products. LWT - Food Sci. Technol. 47:246-254.
2. Benoit I., Navarro D., Marnet N., Rakotomanomana N., Lesage-Meessen L., Sigoillot J. C., Asther M., Asther M. (2006). Feruloyl esterase as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. Carbohydr. Res. 341:1820-1827.
3. Dorfelt H., Kiet T. T., Berg A. (2004). Neue Makromyceten-Kollektion von Vietnam und deren systematische und oekogeographische Bedeutung. Feddes Repertorium 115:164-177.

4. Donaghy J. A¹., McKay A. M. (1995). Production of feruloyl/rho-coumaroyl esterase activity by *Penicillium expansum*, *Penicillium brevicompactum* and *Aspergillus niger*. J. Appl. Bacteriol. 1995 Dec;79(6):657-62.
5. De Vries, R. P. (1999). Accessory enzyme from *Aspergillus* Involved in xylan and pectin degradation. PhD thesis, Wageningen Agricultural University, Dutch.
6. Faulds C. B., Williamson G. (1995). Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 1082-1087.
7. Faulds, C. B., Mandalari, G., Lo Curto, R. B., Bisignano, G., Christakopoulos, P., Waldron, K. W. (2006). Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71:622-629.
8. Ghasem Najafpour, Habibollah Younesi, Ku Syahidah Ku Ismail (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor. Science Direct, Bioresource Technology 92, pp.251-260.
9. Hofrichter M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme Microb. Technol. 30:454-466.
10. Kiệt T. T. (2011). Danh lục nấm lớn của Việt Nam, Hà Nội.
11. Kirk T. K., Schutz E., Connors W. J., Loenz L. F. & Zeikus J. G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Microbiology 117: 277-285.
12. Liers C., Ullrich R., Steffen K. T., Hatakka A., Hofrichter M. (2006). Mineralization of 14C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69, pp.573-579.
13. Michèle Asther, Mireille Haon, Sevastianos Roussos, Eric Record, Michel Delattre, Laurence Lesage-Meessen, Marc Labat, Marcel Asther (2002). Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* - a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*. Volume 38. Issue 5. Pages 685-691.

14. Nghi D. H., Bittner B., Kellner H., Jehmlich N., Ullrich R., Pecyna M. J., Nousiainen P., Sipilä J., Huong L. M., Hofrichter M., Liers C. (2012). The wood-rot ascomycete *Xylaria polymorpha* produces a novel GH78 glycoside hydrolase that exhibits α -L-rhamnosidase and feruloyl esterase activity and releases hydroxycinnamic acids from lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4893-4901.

15. Shiyi Ou, Jing Zhang, Yong Wang and Ning Zhang (2011). Production of Feruloyl Esterase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation on Different Carbon Sources. *Enzyme Research*. Volume 2011 Article ID 848939, 4 pages.

16. Wong, D. W. (2006). Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 133:87-112.

INVESTIGATING FERULOYL-ESTERASE PRODUCTION BY SOME ISOLATED FUNGI GROWN ON LIQUID CULTURE WITH LIGNOCELLULOSE-RICH SUBSTRATES

Vu Dinh Giap, Do Huu Chi, Le Mai Huong, Do Huu Nghi

Summary

In this study, 29 fungal strains belonging to *Basidiomycota* and *Ascomycota* were evaluated for their capacity to produce feruloyl esterase using ethyl ferulate (EFA) as indicating substrate. As the result, two ascomycetous strains *Cladosporium spories* SH01 and *Alternaria sp.* SP66 were potential producers with highest feruloyl activity against both ethyl ferulate (EFA) and methyl ferulate (MFA). These selected strains were grown on liquid cultures supplemented with lignocellulose-rich substrates and ester such as wood shaves (MG), corn-stalk (BN), and rice straw (RR), triacetin (TR), tomatoes (CC), soybean (ĐT), potatoes (KT), olive oil (OL). During 21 days of growth, *C.spories* SH01 produced a high enzymatic activity on media containing triacetate, wood shaves, corn-stalk, olive oil and rice straw with feruloyl esterase activity in the range from 434.9 UL-1 (on triacetate) to 937.6 UL-1 (on rice straw). *Alternaria sp.* SP66 produced a high activity on media containing tomatoes, soybean, potatoes as well as ester/lignocellulose-rich media corn-stalk, olive oil, rice straw and wood shaves with a esterase activity in the range from 198.6 UL-1 (on potatoes) to 564.6 UL-1 (on rice straw). Optimal conditions for the feruloyl esterase production of strain *C.spories* SH01 were 28°C, pH = 7 which showed the highest enzyme activity of 1354.5 UL-1 and were 25°C, pH = 7 for strain *Alternaria sp.* SP66 which showed the highest enzyme activity of 1154.4 UL-1.

Keywords: *Cladosporium spories* SH01, *Alternaria sp.* SP66, feruloyl esterase, lignocellulose.

Người phản biện: TS. Lê Như Kiều

Ngày nhận bài: 11/01/2016

Ngày thông qua phản biện: 16/02/2016

Ngày duyệt đăng: 23/02/2016