

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SONLAZYME TỪ CHỦNG LÊN MEN SỢI *Aspergillus oryzae* VTCC-F0187 TRÊN THIẾT BỊ LÊN MEN XÓP

Lê Thanh Hoàng, Lê Đình Quyền, Đỗ Thị Tuyền, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Nguyễn Trọng Hải, Lê Văn Ty, Quyền Đình Thi*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Hiện nay, việc sử dụng các chế phẩm đa enzyme bổ sung vào thức ăn chăn nuôi đã được ứng dụng rộng rãi. Bổ sung chế phẩm đa enzyme vào khẩu phần ăn giúp gia súc, gia cầm hấp thu đường chất từ thức ăn tốt hơn, tăng khả năng tiêu hóa, giảm hàm lượng tiêu tốn thức ăn và đặc biệt có thể tận dụng được nguồn nguyên liệu rất lớn từ phụ phẩm nông nghiệp, như vậy giảm chi phí thức ăn chăn nuôi, mang lại hiệu quả kinh tế cao. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã tuyển chọn được chủng nấm sợi *A. oryzae* VTCC-F0187 có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme như xylanase, mannanase, glucanase, protease trên nguồn cơ chất chủ yếu là lõi ngô. Tiến hành tối ưu hóa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box-wilson thu được môi trường lên men có thành phần chính là 79% lõi ngô với độ ẩm 59,28%, nhiệt độ 30°C, pH 6,67 là điều kiện lên men sinh tổng hợp enzyme cao nhất. Chế phẩm Sonlzyme thu được sau quá trình lên men có hoạt tính xylanase, glucanase, mannanase và protease tương ứng là 1520, 220, 170 và 55 U/g. Chế phẩm Sonlzyme bền khi bảo quản ở nhiệt độ 4°C, hoạt tính còn lại sau 3, 6 và 9 tháng lần lượt là 80%, 60% và 50%.

Từ khóa: *Aspergillus oryzae*, Sonlzyme, lên men xộp, tối ưu hóa Box-Wilson

MỞ ĐẦU

Việt Nam là nước nông nghiệp nên các phụ phẩm của ngành công nghiệp chế biến nông sản rất lớn, nếu sử dụng được nguồn phụ phẩm này để sản xuất thức ăn chăn nuôi sẽ mang lại hiệu quả kinh tế cao. Nhưng động vật có dạ dày đơn khó tiêu hóa được nguồn thức ăn này do chúng có tỷ lệ xơ cao, chất xơ hòa tan làm tăng độ nhớt và làm giảm khả năng tiêu hóa và hấp thu đường chất của ruột. Vì vậy, các chế phẩm enzyme đã được bổ sung vào trong khẩu phần ăn của vật nuôi với mục đích là cải thiện khả năng tiêu hóa, ngăn cản các tác hại của các chất kháng dinh dưỡng có trong khẩu phần, đồng thời giảm thiểu các chất dinh dưỡng dư thừa bài thải ra môi trường. Từ đó sẽ góp phần cải thiện năng suất vật nuôi, nâng cao hiệu quả kinh tế và giảm ô nhiễm môi trường (Omogbenigun *et al.*, 2004).

Trong các khẩu phần cho động vật dạ dày đơn, ngũ cốc thường chiếm tỷ lệ khá lớn, từ 50-65% mà trong thành phần của chúng chứa các nhóm non-starch polysaccharide (NSP) - là những hợp chất cơ thể động vật không tiêu hóa được (Cowieson, Adeola, 2005). Nhiều tác giả nghiên cứu đã chứng minh khi bổ sung hỗn hợp các enzyme xylanase; cellulose; α -amylase; protease vào trong khẩu phần ngũ cốc có tác dụng đáng kể trong việc cải thiện tăng trọng, giảm chi phí thức ăn, nâng cao tỷ lệ tiêu hóa năng lượng, protein và acid amin trong khẩu phần so với không bổ sung (Meng *et al.*, 2006; Slominski *et al.*, 2006; Olukosi *et al.*, 2007).

Trên thế giới, việc nghiên cứu sử dụng enzyme bổ sung vào thức ăn chăn nuôi đã phát triển rất mạnh. Những enzyme sử dụng bổ sung thức ăn chăn nuôi đã được nhiều công ty hàng đầu trên thế giới sản xuất từ hai chục năm nay như Novozymes (Đan Mạch), BASF (Đức), Danisco (Đan Mạch, Anh), Finnfeed (Phần Lan). Các sản phẩm enzyme thường gặp phải kể đến các loại Roncozyme, Natuphos, Avizyme, Porzyme chứa enzyme đơn hoặc các tổ hợp enzyme khác nhau bao gồm xylanase, protease, glucanase, phytase, amylase, cellulose.

Ở Việt Nam nhiều tác giả đã nghiên cứu về các enzyme bổ sung thức ăn gia súc, đặc biệt là enzyme từ các chủng vi sinh vật nhưng các kết quả nghiên cứu này vẫn còn nhiều hạn chế, việc áp dụng các sản phẩm enzyme trong nước trong ngành sản xuất thức ăn chăn nuôi vẫn chưa được cơ sở sản xuất thức ăn quan tâm. Nguyên nhân chủ yếu là do các chế phẩm enzyme bổ sung cho thức ăn chăn nuôi đã được nghiên cứu đều ở dạng đơn enzyme nên hiệu quả chưa cao (Trần Thị Tuyết *et al.*, 2004; Phương Phú Công, 2009).

Trong thời gian gần đây, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tuyển chọn được chủng nấm sợi *A. oryzae* VTCC-F0187 có khả năng sinh tổng hợp cao cùng lúc nhiều loại enzyme như xylanase, mannanase, glucanase, protease trên nguồn cơ chất chủ yếu là lõi ngô. Với mục tiêu tạo được chế phẩm đa enzyme bổ sung thức ăn cho gia súc, chúng tôi đã tiến hành tối ưu các điều kiện nuôi cấy của chủng *A. oryzae* VTCC-F0187 trên quy mô lên men xộp nhằm nâng cao khả năng sinh tổng hợp enzyme; xây dựng quy trình lên men tạo chế phẩm Sonlzyme với giá thành rẻ và hiệu quả cao.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Nguyên vật liệu: chủng *A. oryzae* VTCC-F0187 được cung cấp từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt nam (VTCC). Lõi ngô sau thu hoạch, băm nhỏ, phơi khô (tránh mốc), sau đó đem nghiền nhỏ thu được bột lõi ngô.

Môi trường: môi trường khoáng Czapek dùng để nhân giống và tạo ẩm: 2 g NaNO₃; 1 g K₂HPO₄; 0,5 g KCl; 0,5 g FeSO₄; 20 g sucrose; 1000 ml H₂O và pH 7,0-7,3. Môi trường khoai tây (PDA) dùng để hoạt hóa và nhân giống từ bào tử: dịch chiết thủy phân từ 200 g khoai tây bỏ vỏ; 20 g glucose; 15 g agar; 1000 ml H₂O và pH 7. Môi trường lên men: cơ chất lên men bao gồm 80- 85% lõi ngô; 15-20% bột đậu tương được trộn đều trong các khay có kích thước 30 x 50 cm, bổ sung dung dịch khoáng Czapek tạo độ ẩm 55-65% trước khi lên men.

Dụng cụ và thiết bị: máy lắc ổn nhiệt nuôi cấy vi sinh vật (Sartorius, Đức); hệ thống lên men xộp dung tích 1100 L (Biore; Việt Nam); thiết bị khử trùng ướt (Tommy, Nhật Bản), thiết bị khử trùng khô, hệ thống khay inox, máy hút ẩm, quạt thổi

nhệt. Các hóa chất được sử dụng trong thí nghiệm như cơ chất LBG, casein, CMC, xylan đều ở dạng tinh khiết và do các hãng tin cậy cung cấp như Sigma, Merck, Prolab.

Phương pháp nghiên cứu

Tối ưu hóa sinh tổng hợp xylanase bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm (Box, Wilson, 1951)

Xác định hoạt tính xylanase

Hoạt tính xylanase được xác định bằng phương pháp quang phổ (Miller, 1959), đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nm, với cơ chất 0,5% xylan trong đệm 0,02 N phosphate. 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.

Xác định hoạt tính mannanase

Hoạt tính mannanase được xác định bằng phương pháp quang phổ (Miller, 1959), đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nm, với cơ chất 0,5% LBG trong đệm 0,02 N phosphate. Một đơn vị hoạt tính mannanase được định nghĩa là lượng enzyme xúc tác thủy phân giải phóng 1 μmol mannose trong một phút ở điều kiện thích hợp.

Xác định hoạt tính glucanase

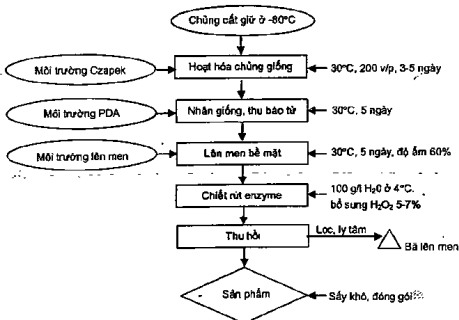
Hoạt tính glucanase được xác định bằng phương pháp quang phổ (Miller, 1959), đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nm, với cơ chất 0,5% CMC trong đệm 0,02 N phosphate. Một đơn vị hoạt tính glucanase được định nghĩa là lượng enzyme xúc tác thủy phân giải phóng 1 μmol glucose trong một phút ở điều kiện thích hợp.

Xác định hoạt tính protease

Hoạt tính protease/sutlisin được xác định theo phương pháp Anson cải tiến với cơ chất đặc hiệu là 1% casein trong đệm 1/15 M phosphate. Một đơn vị hoạt tính được định nghĩa là lượng enzyme phân giải casein tạo thành các sản phẩm hòa tan trong trichloroacetic acid cho phản ứng màu với thuốc thử Folin ciocalteau tương ứng với 1 μmol tyrosine trong một phút ở điều kiện thí nghiệm.

Lên men xộp tạo chế phẩm Sonlazyme

Sau khi tối ưu, chủng *A. oryzae* VTCC-F0187 được cấy lên men trên thiết bị tự động để sản xuất chế phẩm Sonlazyme, quy trình lên men được thực hiện theo các bước ở Hình 1:



Hình 1. Quy trình lên men xộp sản xuất chế phẩm Sonlazyme

Lên men bề mặt

Khử trùng khô các khay inox và khử trùng ướt cơ chất lên men. Bổ sung cơ chất vào các khay lên men và làm ẩm bằng khoảng Czapek đến độ ẩm 60%. Tiếp 100 ml dung dịch 10^6 bào tử/ml vào từng khay lên men và dàn đều trên các khay inox với độ dày 2 cm, bọc kín bằng nilon trắng, nuôi cấy trong thiết bị lên men xộp có điều chỉnh nhiệt độ và phun ẩm tự động. Nhiệt độ trong quá trình lên men ổn định ở 30°C, độ ẩm không khí trong thiết bị duy trì ở mức $\geq 75\%$.

Sản xuất chế phẩm và đánh giá độ bền

Sau 5 ngày, giá thể lên men được thu hồi và xác định hoạt tính, giá thể được chiết bằng nước với tỷ lệ 500 g/lít ở 4°C trong khoảng 2-4 giờ, sau đó lọc cặn, bảo tử và ép lấy dịch. Ly tâm dịch chiết enzyme ở 8000 v/p trong 10 phút ở 4°C thu dịch trong, diệt bào tử sót bằng H₂O₂ 5-7%, thu được dịch enzyme thô. Dịch enzyme thô được trộn với bột gạo với tỷ

lệ 200 g/lít, sấy khô tạo chế phẩm. Kiểm tra hoạt tính enzyme và đánh giá độ bền của chế phẩm Soni-enzyme sau 9 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng (RT) và 4°C.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tối ưu sinh tổng hợp xylanase từ chủng *A. oryzae* VTCC-F0187 theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm

Môi trường lên men xấp xỉ cấy chủng nấm sợi *A. oryzae* VTCC-F0187 được tối ưu theo phương pháp thực nghiệm Box-Wilson nhằm thu được lượng enzyme sinh tổng hợp cao nhất. Ba yếu tố được xác định để nghiên cứu thay đổi là: hiệu suất; hàm lượng bột đậu tương, dao động từ 5 % - 25 %; x_2 : độ ẩm ban đầu giá thể lên men, dao động từ 50 % - 70 %; x_3 : pH của khoáng tạo độ ẩm, dao động từ 4 - 9. Hàm mục tiêu được đánh giá bằng hoạt độ xylanase, bởi đây là enzyme quan trọng và chiếm thành phần cao nhất trong các chế phẩm đa enzyme, kí hiệu là y (U/g giá thể). Phương trình hồi quy của hàm mục tiêu được đưa ra ban đầu có dạng:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

Tiến hành xây dựng ma trận thực nghiệm 2 mức với 3 biến đã lựa chọn. Số thí nghiệm $N = 2^3 = 8$, mỗi thí nghiệm thực hiện qua 3 lần đo, kết quả thực nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thí nghiệm quy hoạch thực nghiệm với ma trận đầy đủ.

N	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	y_3	$\bar{y}$	δ^2
1	+	+	+	868,12	856,89	881,22	868,74	148,25
2	-	+	+	458,29	464,84	461,10	461,41	10,80
3	+	-	+	1003,79	1010,34	1015,95	1010,03	37,06
4	-	-	+	341,33	356,30	342,27	348,84	70,33
5	+	+	-	869,99	864,37	863,44	865,93	12,55
6	-	+	-	557,47	554,67	554,67	555,60	2,63
7	+	-	-	1071,16	1073,96	1079,58	1074,90	16,39
8	-	-	-	549,99	546,25	550,92	549,05	6,13

$$\delta_j^2 = \frac{1}{k-1} \sum_{j=1}^k (\bar{y}_j - y_{ij})^2 \quad (j=1 \rightarrow k, i=1 \rightarrow N) \quad k \text{ là số lần lặp lại thí nghiệm.}$$

- Kiểm tra sự hội tụ của sai số

$$\text{Chuẩn Cochran theo tính toán: } G_{\alpha} = \frac{\max \delta_j^2}{\sum_{j=1}^k \delta_j^2} = 0,484; \text{ tra bảng chuẩn Cochran với } N=8, k=3 \rightarrow G_{0,95, 2; 8} = 0,515;$$

do $G_{\alpha} = 0,515 > G_{\alpha} = 0,484 \rightarrow$ ma trận đồng nhất, sai số thu được hội tụ nên số liệu chấp nhận được.

- Xác định các hệ số của mô hình

$$+ b_0 = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \bar{y}_j \quad + b_i = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \bar{y}_j \cdot x_i \quad (i = 1, n) \quad + b_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \bar{y}_j \cdot x_i x_j$$

$$b_0 = 716,54 \quad b_1 = 238,36 \quad b_2 = -28,62 \quad b_3 = -44,83 \quad b_{12} = -58,95 \quad b_{23} = 29,32 \quad b_{13} = 21,99$$

Vậy phương trình hàm mục tiêu có dạng:

$$y = 716,54 + 238,36 x_1 - 28,62 x_2 - 44,83 x_3 - 58,95 x_1 x_2 + 29,32 x_1 x_3 + 21,99 x_2 x_3$$

→ Nhìn vào mô hình ta thấy nồng độ bột đậu tương (x_1) trong môi trường nuôi cấy là yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất lên năng suất sinh tổng hợp xylanase. Và yếu tố này có ảnh hưởng dương tính đến hiệu suất sinh tổng hợp xylanase, kể từ mức cơ sở khi tăng yếu tố này lên mức trên thì hoạt tính xylanase sẽ tăng, trong khi đó, 2 yếu tố còn lại là pH (x_3) và độ ẩm ban đầu của khoáng tạo độ ẩm (x_2) có ảnh hưởng âm tính đến hiệu suất sinh tổng hợp.

- Kiểm tra sự có nghĩa của các hệ số theo chuẩn Student:

Hệ số có nghĩa phải thỏa mãn điều kiện $|b_i| \geq |S_b \cdot t|$

+ Tính S_b

$$\text{Phương sai từng thí nghiệm: } \delta_j^2 = \frac{\sum \delta_j^2}{N} = \frac{306,14}{8} = 38,27 \quad \text{Phương sai sau mỗi lần đo: } \delta_y^2 = \frac{\delta_j^2}{k} = \frac{38,27}{3} = 12,76$$

$$\text{Phương sai mà các hệ số xác định: } S_b^2 = \frac{\delta_y^2}{B} = \frac{12,76}{7} = 1,82 \rightarrow S_b = 1,35$$

+ Chuẩn Student t tra theo số bậc tự do: $S_t (f = 8)$ với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ ta được $t = 2,31 \rightarrow S_b \cdot t = 3,12$

Do các hệ số của mô hình đều lớn hơn 3,21 nên tất cả đều có ý nghĩa $\rightarrow B^* = 7$ và phương trình hồi quy cuối cùng có dạng: $y = 716,54 + 238,36 x_1 - 28,62 x_2 - 44,83 x_3 - 58,95 x_1 x_2 + 29,32 x_1 x_3 + 21,99 x_2 x_3$

Kiểm tra sự tương thích của mô hình:

TN	Mô hình	y^e	y^n	$(y^n - y^e)^2$
1	716,54 + 238,36(+) - 28,62(+) - 44,83(+) - 58,95(+)X(+) + 29,32(+)X(+) + 21,99(+)X(+) +	874,17	858,74	29,48
2	716,54 + 238,36(-) - 28,62(+) - 44,83(+) - 58,95(-)X(-) + 29,32(-)X(-) + 21,99(-)X(-) +	455,99	451,41	29,39
3	716,54 + 238,36(+) - 28,62(-) - 44,83(+) - 58,95(+)X(-) + 29,32(-)X(-) + 21,99(-)X(-) +	1004,61	1010,03	29,35
4	716,54 + 238,36(-) - 28,62(-) - 44,83(+) - 58,95(-)X(+) + 29,32(-)X(+) + 21,99(-)X(+) +	352,07	346,64	29,53
5	716,54 + 238,36(+) - 28,62(+) - 44,83(-) - 58,95(+)X(+) + 29,32(+)X(+) + 21,99(+)X(+) +	861,21	855,93	22,31
6	716,54 + 238,36(-) - 28,62(+) - 44,83(-) - 58,95(-)X(+) + 29,32(-)X(+) + 21,99(-)X(+) +	580,31	555,60	22,16
7	716,54 + 238,36(+) - 28,62(-) - 44,83(-) - 58,95(+)X(-) + 29,32(-)X(-) + 21,99(-)X(-) +	1079,61	1074,90	22,18
8	716,54 + 238,36(-) - 28,62(-) - 44,83(-) - 58,95(-)X(-) + 29,32(-)X(-) + 21,99(-)X(-) +	544,35	549,05	22,11

Để đánh giá sai lệch giữa thực nghiệm và mô hình dựa vào chuẩn Fisher, điều kiện để mô hình thích ứng là $F_{\text{thực}} \geq F_{\alpha}$
 $F_{\alpha} = g(f_1, f_2)$ với $f_1 = N-B$ và $f_2 = N^*(k-1)$, B^* là hệ số có ý nghĩa của phương trình hồi quy sau khi kiểm tra bằng chuẩn student $\rightarrow F_{\alpha} = F(1, 16) = 4,49$ với $\alpha = 0,05$

$$S_{TU}^2 = \frac{1}{N-B} \cdot \sum_{i=1}^N (y_i^{TN} - y_i^{TT})^2 = \frac{206,52}{8-7} = 206,52 \quad F_{\alpha} = \frac{\max(S_{TU}^2; S_y^2)}{\min(S_{TU}^2; S_y^2)} = \frac{206,52}{12,76} = 16,18 > F_{\alpha}$$

Vậy mô hình không thích ứng, nhưng do tất cả các hệ số của mô hình đều có ý nghĩa nên vẫn có thể thực hiện bước tiếp theo là tối ưu hóa.

- Tối ưu hóa:

$$\text{Tính } |b_1 \cdot \lambda_1|: \lambda_1 = 10 \quad \lambda_2 = 10 \quad \lambda_3 = 2$$

$$|b_1 \cdot \lambda_1| = 2383,6 \quad |b_2 \cdot \lambda_2| = 286,2 \quad |b_3 \cdot \lambda_3| = 89,66$$

$$\text{Chọn } x_1 \text{ là biến cơ sở, bước nhảy } \Delta_1 = \Delta_{\infty} = 2. \text{ Tính các } \Delta_1: \Delta_2 = \frac{|b_2 \cdot \lambda_2|}{|b_1 \cdot \lambda_1|} \Delta_{\infty} = 0,24; \Delta_3 = \frac{|b_3 \cdot \lambda_3|}{|b_1 \cdot \lambda_1|} \Delta_{\infty} = 0,08.$$

- Lập mô hình thực nghiệm theo phương pháp lên dốc để tìm điểm tối ưu:

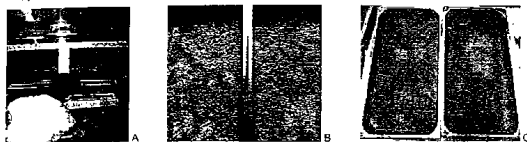
Bảng 2. Kết quả thực nghiệm tối ưu môi trường lên men

TN	$x_1(\%)$	$x_2(\%)$	x_3	y (U/g giá thể)	Tiến hành thực nghiệm lên men xốp nuôi cấy chủng nấm sợi <i>A. oryzae</i> VTCC-F0187 theo thành phần môi trường như bảng ma trận nêu trên (Bảng 2). Kết quả đo hoạt tính ở cột "y" cho thấy môi trường lên men tối ưu cho sinh tổng hợp xylanase có hàm lượng bột đầu tương là 21%, độ ẩm ban đầu của giá thể là 59,28% và pH của khoáng tạo độ ẩm khi bổ sung vào giá thể là 6,76 với hoạt tính xylanase đo được cao nhất là 1128,58 U/g giá thể lên men. Như vậy, sau quá trình tối ưu hóa, các thông
1	15	90,00	7,00	907,91	
2	17	59,76	6,32	919,61	
3	19	59,52	6,34	980,43	
4	21	59,28	6,76	1128,58	
5	23	59,04	6,58	1010,06	
6	25	58,80	6,80	1020,19	

số môi trường nuôi cấy của chủng nấm sợi đã được xác định, điều kiện tối ưu cũng gần giống với một số chủng nấm đã nghiên cứu trước đây, nhưng hàm lượng enzyme sinh ra trong quá trình lên men xốp cao hơn hẳn so với quá trình lên men chìm (Đỗ Thị Tuyên *et al.*, 2008). Kết quả hoạt tính xylanase sau khi tối ưu thấp hơn so với một số công bố trong nước và trên thế giới, nhưng do chủng nấm sợi này có thể sinh tổng hợp nhiều loại enzyme cùng lúc và nguồn cơ chất để lên men chủ yếu là lõi ngô có giá thành rẻ hơn rất nhiều so với các nghiên cứu khác như malt, gạo nên vẫn đem hiệu quả kinh tế cao. Ngoài ra, việc sử dụng chủng tự nhiên để sản xuất cũng đảm bảo tính an toàn cao hơn so với các chủng gây đột biến (Park *et al.*, 2002; Nguyễn Thị Nhiên, 2011).

Lên men sản xuất chế phẩm enzyme theo các điều kiện thành phần môi trường tối ưu

Sau khi lựa chọn được thành phần và điều kiện môi trường tối ưu cho việc sinh tổng hợp enzyme từ chủng *A. oryzae* VTCC-F0187 chúng tôi đã tiến hành lên men sản xuất chế phẩm Sonlzyme trong thiết bị men xốp có điều khiển nhiệt độ với quy mô 5 kg/mẻ chia đều trên các khay inox. Cơ chất lên men với thành phần bao gồm 79% lõi ngô và 21% bột đầu tương được dần đều ra 10 chiếc khay inox với hàm lượng là 500 g/khay, điều chỉnh độ ẩm ban đầu bằng khoáng Czapek để đạt được độ ẩm là 59,3%, pH khoảng 6,76. Sau khi tiếp giống bằng bào tử từ các đĩa thạch chứa chủng nấm đã hoạt hóa trước đó, các khay inox được xếp dần đều trong thiết bị lên men xốp với điều chỉnh nhiệt độ 30°C và độ ẩm không khí duy trì bằng hệ thống phun ẩm tự động trong thiết bị lên men $\geq 75\%$. Sau 5 ngày, giá thể lên men được thu hồi và xác định hoạt tính các enzyme thu được. Kết quả cho thấy ở điều kiện môi trường nuôi cấy tối ưu (bảng 3), năng suất sinh tổng hợp các enzyme đều tăng so với môi trường nuôi cấy ban đầu: hoạt tính xylanase, glucanase, mannanase, protease tăng tương ứng là: 12,5%; 17,4%; 13,1% và 19,3%.



Hình 2. Lên men sản xuất chế phẩm đa enzyme. Thiết bị lên men xốp có điều khiển nhiệt độ và độ ẩm (A); Giá thể lên men sau 2 ngày (B); Giá thể lên men sau 5 ngày (C)

Lời cảm ơn

Công trình có sự hỗ trợ của kinh phí từ đề tài: *Nghiên cứu lên men lồi ngô với nấm mốc Aspergillus, sản xuất chế phẩm đa enzyme bổ sung làm gia tăng mức tiêu hóa hấp thu, giảm tiêu tốn thức ăn trong chăn nuôi gia cầm và gia súc*, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Sơn La, 2012- 2013.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Coweson AJ, Adeola O (2005) Carbohydrases, Protease, and Phytase Have an Additive Beneficial Effect in Nutritionally Marginal Diets for Broiler Chicks. *Poultry Sci*, 84: 1860-1867.
- Đỗ Thị Tuyền, Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Quyền Đình Thi (2008) Tối ưu một số điều kiện nuôi cấy chủng nấm *Aspergillus oryzae* DSM1863 và *Aspergillus niger* DSM 1957 sinh tổng hợp xylanase. *Tạp chí CNSH*, 6: 349- 355.
- Meng X, Slominski BA, Campbell LD, Guenter W, Jones O (2006) The use of enzyme technology for improved energy utilization from full-fat oilseeds. Part I: Canola seed. *Poultry Science*, 85: 1025-1030.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31: 426-428.
- Onkosi OA, Coweson AJ, Adeola O (2007) Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. *Poult Sci*, 86: 77-86.
- Omogbenigun FO, Nyachoti CM, Slominski BA (2004) Dietary supplementation with multienzyme preparations improves nutrient utilization and growth performance in weaned pigs. *J Anim Sci*, 82: 1053-1061.
- Park YS, Kang SW, Lee JS, Hong SI, Kim SW (2002) Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Appl Microbiol Biotechnol* 58(6): 761-766.
- Phương Phú Công (2009) Tuyển chọn và nghiên cứu ứng dụng một số chủng vi sinh vật có khả năng lên men xylan trên phế phụ phẩm nông nghiệp để thu xylanase phục vụ cho chăn nuôi. *Luận án Tiến sỹ sinh học*
- Slominski BA, Meng X, Campbell LD, Guenter W, Jones O (2006) The use of enzyme technology for improved energy utilization from full-fat oilseeds. Part II: Flaxseed. *Poultry Sci*, 85: 1031-1037.
- Trần Thị Tuyết, Nguyễn Duy Long, Hoàng Quốc Khanh (2004) Production of phytase by *Aspergillus niger* NRRL 363. *Vietn J Agr Sci Technol*, 4: 28-32.

PRODUCTION OF SONLAZYME PREPARATIONS BY *Aspergillus oryzae* VTCC-F0187 IN SOLID STATE FERMENTATION

Le Thanh Hoang, Le Dinh Quyen, Do Thi Tuyen, Nguyen Thi Anh Tuyet, Nguyen Trong Hai, Le Van Ty, Quyen Dinh Thi*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Nowadays, the multi-enzyme preparations have been widely used in animal husbandry. Additional multi-enzyme preparations in diets of domestic animal help them absorb nutrients from food better, improve digestion, decrease the amount of the food consumed and take advantage of the enormous material resources from agricultural residues, thereby reducing feed costs, bring high economic efficiency. Recently, we selected strain *A. oryzae* VTCC-F0187 capable of producing enzymes such as xylanase, mannanase, glucanase, and protease. We determined the optimal growth conditions (pH, moisture, soybean, corn cob) for enzymes producing capacity of fungi strain in solid state fermentation by mathematically planned experiments. The optimization of the mathematically planned Box-Wilson showed that the best results for enzymes production were obtained with 21% soybean flour, 79% corn cob, at 30°C, pH 6.67 and moisture 59.28%. Then, we produced Sonlzyme preparations in the 1100 L-scale fermenter. Sonlzyme preparations (including xylanase 1520 U/g, glucanase 220 U/g, mannanase 170 U/g and protease 55 U/g), is durable when stored at 4°C temperature. Residual activity after 6 months is 60-80% at 4°C temperature and 45-75% at room temperature.

Keyword: *A. oryzae*, corn cob, mathematically planned Box-Wilson, Sonlzyme, solid state fermentation.

* Author for correspondence: Tel. 04.7568260; Fax: 04.8363144; E-mail: quyen@ibt.ac.vn