

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**



NGUYỄN THỊ HỒNG LĨNH

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG
ĐẾN QUÁ TRÌNH SINH TRƯỞNG VÀ SINH
TỔNG HỢP ENZYM GLUCOSE OXYDASE TỪ
CHUNG NẤM MỐC *ASPERGILLUS NIGER***

**Chuyên ngành:
CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM VÀ ĐỒ UỐNG
Mã số: 60.54.02**

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SỸ KỸ THUẬT

Đà Nẵng – Năm 2011

Công trình được hoàn thành tại
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

Người hướng dẫn khoa học: TS. ĐẶNG MINH NHẬT

Phản biện 1: PGS. TS. TRƯƠNG THỊ MINH HẠNH
Phản biện 2: GS.TSKH. LÊ VĂN HOÀNG

Luận văn sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ kỹ thuật họp tại Đại học Đà Nẵng vào ngày 26 tháng 7 năm 2011.

Có thể tìm hiểu luận văn tại:

- Trung tâm Thông tin – Học liệu, Đại học Đà Nẵng.
- Trung tâm học liệu, Đại học Đà Nẵng.

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Ngày nay, cùng với sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ sinh học, các chế phẩm enzym được sản xuất ngày càng nhiều và được sử dụng hầu hết trong tất cả các lĩnh vực kinh tế. Enzym đã dần từng bước làm thay đổi và nâng cao một số các quá trình công nghệ trong chế biến thực phẩm, nông nghiệp chăn nuôi, y tế,... nhằm đáp ứng được nhu cầu của xã hội, trong số đó phải kể đến enzym glucose oxidase.

Glucose oxidase (GOD, β - D - glucose: oxygen - oxidoreductase, EC 1.1.3.4) là enzym xúc tác quá trình oxi hóa β - D - glucose thành acid gluconic với sự tham gia của phân tử oxi như chất nhận điện tử, đồng thời giải phóng ra hydro peroxide (H_2O_2) [8]. Do đó người ta có thể sử dụng chế phẩm glucose oxidase để chống oxy hóa các sản phẩm thực phẩm, làm thuốc thử trong hóa phân tích, sử dụng tính chất kháng sinh của glucose oxidase và ngăn ngừa các sản phẩm khỏi bị biến đổi. Glucose oxidase còn được dùng để liên kết oxy có trong thành phần hoặc trên bề mặt các sản phẩm thực phẩm, tính chất này được ứng dụng trong công nghệ sản xuất rượu vang, phomat, sữa,... Ngoài ra, chế phẩm enzym này còn được sử dụng dưới dạng “Túi khử oxy” nhằm bảo vệ các chi tiết máy tính và các thiết bị khỏi bị han gỉ và ăn mòn,... Từ những ứng dụng quan trọng đó mà enzym glucose oxidase hiện đang nhận được nhiều sự quan tâm chú ý của các nhà nghiên cứu [2].

Việc thu nhận enzym Glucose oxidase có thể được thực hiện bằng nhiều con đường khác nhau như tách từ thực vật, động vật, hay sinh tổng hợp từ vi sinh vật. Tuy nhiên, việc nghiên cứu sử dụng

enzym Glucose oxidase từ vi sinh vật, đặc biệt là nấm mốc *Aspergillus niger* ngày càng được quan tâm bởi những tính chất sinh hóa đa dạng và dễ dàng can thiệp đến cấu trúc gen nhằm cải tạo những tính chất mong muốn. Mặt khác, thu nhận enzym từ nấm mốc lại có nhiều ưu điểm như môi trường nuôi cấy dễ tìm, chu kỳ phát triển ngắn và dễ dàng điều khiển trong quá trình sản xuất, nên rất thuận lợi cho sản xuất enzym ở quy mô công nghiệp. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp enzym Glucose oxidase từ chủng nấm mốc *Aspergillus niger*”.**

2. MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU

- Nghiên cứu sự sinh trưởng và sinh tổng hợp enzym GOD của chủng nấm mốc *Aspergillus niger* theo thời gian.

- Xác định được nồng độ, thành phần dinh dưỡng thích hợp để chủng nấm mốc *Aspergillus niger* có khả năng sinh tổng hợp enzym Glucose oxidase ngoại bào với hoạt độ cao.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

- Nghiên cứu trên đối tượng là chủng nấm mốc *Aspergillus niger* từ ống giống của phòng thí nghiệm vi sinh thuộc khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng.

- Nghiên cứu sự sinh trưởng của chủng nấm mốc *Aspergillus niger*.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ thành phần môi trường dinh dưỡng đến quá trình sinh tổng hợp enzym GOD của chủng nấm mốc *Aspergillus niger*

- Chỉ nghiên cứu trên quy mô phòng thí nghiệm.

4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Phương pháp vật lý: Phương pháp sấy đến khối lượng không đổi.
- Phương pháp hóa lý:
 - + Sử dụng pH kế để đo pH của dịch môi trường nuôi cấy ;
 - + Phương pháp quang phổ hấp thụ UV-VIS .
- Phương pháp vi sinh vật:
 - + Phương pháp cấy truyền;
 - + Phương pháp cấy tăng sinh;
 - + Phương pháp lên men chìm.
- Phương pháp toán học: Phương pháp phân tích phương sai (ANOVA)

5. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

5.1. Ý nghĩa khoa học

- Xác định được sự sinh trưởng của chủng nấm mốc *Aspergillus niger*.
- Xác định được nồng độ thành phần dinh dưỡng thích hợp để chủng nấm mốc *Aspergillus niger* có khả năng sinh tổng hợp enzym glucose oxidase ngoại bào có hoạt độ cao

5.2. Ý nghĩa thực tiễn

Đặt cơ sở cho việc xây dựng qui trình sản xuất enzym Glucose oxidase, góp phần phát triển ngành công nghệ vi sinh ở nước ta.

6. CẤU TRÚC LUẬN VĂN

Nội dung của luận văn được trình bày theo các phần chính như sau:

Mở đầu

Chương 1: Tổng quan tài liệu

Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Kết luận và kiến nghị

Danh mục tài liệu tham khảo

Phụ lục.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ NẤM MỐC

1.1.1. Đặc điểm chung của nấm mốc

1.1.2. Cấu tạo

1.1.3. Sinh sản của nấm mốc

1.1.3.1. Sinh sản vô tính

1.1.3.2. Sinh sản hữu tính

1.2. SỰ SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA VI SINH VẬT TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY TĨNH

1.2.1. Pha mở đầu (pha tiềm phát)

1.2.2. Pha logarit (pha lũy tiến)

1.2.3. Pha ổn định (pha cân bằng).

1.2.4. Pha tử vong

1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH SỰ SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA VI SINH VẬT

1.3.1. Các phương pháp xác định số lượng tế bào vi sinh vật

1.3.1.1. Phương pháp xác định tế bào tổng cộng

1.3.1.2. Phương pháp xác định tế bào riêng biệt

1.3.2. Các phương pháp xác định sinh khối tế bào vi sinh vật

1.3.2.1. Các phương pháp xác định trực tiếp.

1.3.2.2. Các phương pháp xác định gián tiếp

1.4. KHÁI QUÁT VỀ *ASPERGILLUS NIGER*

1.4.1. Giới thiệu chung về *Aspergillus niger*

1.4.2. Cấu trúc bộ gen**1.4.3. Cấu trúc tế bào và sự chuyển hóa****1.4.3.1. Thuộc tính****1.4.3.2. Trao đổi chất và năng lượng****1.4.4. Ứng dụng của *Aspergillus niger*****1.4.4.1. Sản xuất phân tử****1.4.4.2. Trong Công nghệ sinh học****1.5. TỔNG QUAN VỀ ENZYM GLUCOSE OXIDASE****1.5.1. Định nghĩa enzym .****1.5.2. Giới thiệu enzym glucose oxidase****1.5.2.1. Cơ chế phản ứng của enzym GOD****1.5.2.2. Ứng dụng của enzym GOD****1.5.2.3. Các thông số ảnh hưởng đến quá trình sản xuất enzym GOD****1.6. MỘT SỐ CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU TRONG NƯỚC VÀ NGOÀI NƯỚC****1.6.1. Một số công trình nghiên cứu ngoài nước****1.6.2. Một số công trình nghiên cứu trong nước****CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP
NGHIÊN CỨU****2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU****2.1.1. Chủng *Aspergillus niger*****2.1.2. Hoá chất****2.1.3. Dụng cụ - Thiết bị****2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU****2.2.1. Phương pháp vi sinh****2.2.1.1. Phương pháp cấy truyền**

2.2.1.2. Phương pháp cấy tăng sinh

2.2.1.3. Phương pháp lên men sinh tổng hợp enzym GOD

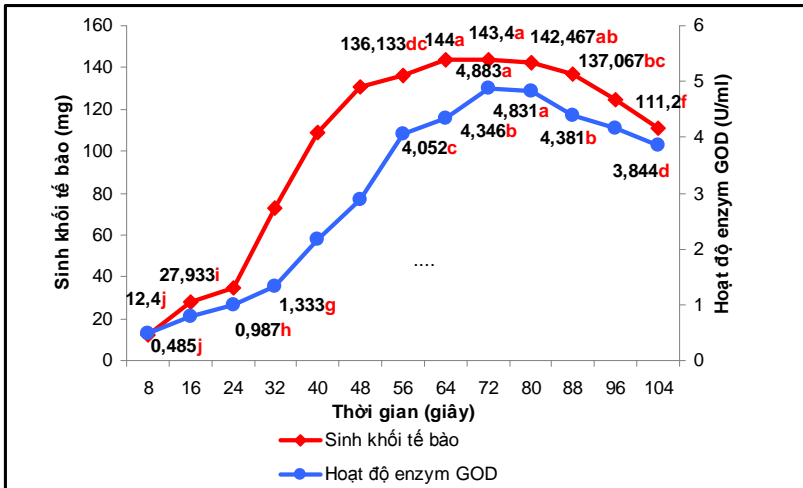
2.2.2. Phương pháp hoá lý

2.2.3. Phương pháp vật lý

2.2.4. Phương pháp toán học

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. NGHIÊN CỨU SỰ SINH TRƯỞNG CỦA *ASPERGILLUS NIGER*



Hình 3.1: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh khối tế bào và hoạt độ enzym GOD của *Aspergillus niger*

(Các chữ a, b, ab, bc, g, i, h, f biểu thị sai khác có nghĩa ở mức $p < 0,05$)

Kết quả cho thấy, thời gian nuôi cấy khác nhau thì hoạt độ enzym GOD và sinh khối tế bào thay đổi khác nhau. Sự khác nhau giữa giá trị của hoạt độ enzym GOD và sinh khối tế bào đều có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $p < 0,05$. Như vậy, thời gian có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh tổng hợp enzym GOD và quá trình sản xuất sinh khối tế bào, thời gian nuôi cấy tăng thì hoạt độ enzym GOD và sinh khối tế bào tăng nhanh và đạt giá trị cực đại, giá trị đó ổn định một thời gian rồi sau đó giảm dần.

Trong khoảng thời gian từ 8 - 24 giờ thì cả hoạt độ enzym GOD và sinh khối tế bào đều tăng nhưng tốc độ tăng chậm. Ở 8 giờ, hoạt độ enzym GOD thu được là 0,485 U/ml và sinh khối tế bào là 12,4 mg, nhưng khi tăng thời gian nuôi cấy lên 24 giờ thì cả hoạt độ enzym và sinh khối tế bào đều tăng lên. Tại 24 giờ, hoạt độ enzym GOD thu được là 0,987 U/ml, còn sinh khối tế bào là 34,8 mg. Sinh khối tế bào và hoạt độ enzym tiếp tục tăng nếu tăng thời gian nuôi cấy lên và sinh khối tế bào đạt giá trị cao nhất với 144 mg tại 64 giờ, còn hoạt độ enzym đạt giá trị cao nhất 4,883 U/ml tại 72 giờ. Điều này có thể giải thích là do trong giai đoạn đầu vi sinh vật chưa quen với môi trường dinh dưỡng, làm cho sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật diễn ra chậm, do đó khả năng tổng hợp enzym GOD ít. Tuy nhiên trong giai đoạn này, do quá trình tổng hợp các chất để xây dựng tế bào mà trước hết là các chất cao phân tử (protein, enzym, acid nucleic...) làm cho thể tích và trọng lượng tế bào tăng lên, khoảng thời gian này đối với mỗi loài khác nhau là khác nhau tùy thuộc vào tuổi ống giống, lượng giống cấy vào và thành phần môi trường. Sau thời gian 24 giờ thì hoạt độ enzym GOD và sinh khối tế bào đều tăng mạnh, sinh khối tế bào đạt giá trị cực đại tại 64 giờ với 144 mg, còn hoạt độ enzym đạt giá trị cực đại tại 72 giờ với 4,883

U/ml. Sự tăng mạnh hoạt độ enzym và sinh khối tế bào trong giai đoạn này có thể được giải thích là do vi sinh vật đã thích ứng với môi trường dinh dưỡng, đặc biệt là sự có mặt đầy đủ các chất cần thiết cho quá trình phát triển của vi sinh vật như cacbon, nitơ, chất khoáng, chất kích thích nên làm cho chúng phát triển mạnh và sinh enzym có hoạt độ cao. Tuy nhiên, thời điểm thu được giá trị cực đại của sinh khối tế bào (64 giờ) và hoạt độ enzym (72 giờ) là hoàn toàn khác nhau. Sở dĩ có sự khác nhau này là do khi sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật sau khi đạt tới giá trị cực đại thì một số tế bào bắt đầu bị phân hủy nên tiết ra enzym nội bào, do đó làm tăng lượng enzym GOD tổng số lên và hoạt độ enzym GOD chỉ đạt cực đại vào thời điểm 72 giờ. Sau khi đạt giá trị cực đại, tiếp tục tăng thời gian nuôi cấy lên đến 80 giờ thì cả sinh khối tế bào và hoạt độ enzym GOD đều tăng rất chậm, qua xử lý Anova thì giá trị hoạt độ enzym và sinh khối tế bào trong giai đoạn này khác nhau không có nghĩa ở mức $p < 0,05$, chứng tỏ giá trị này ổn định. Giai đoạn phát triển này của chủng *Aspergillus niger* có thể giải thích là do lúc này chất dinh dưỡng bắt đầu cạn dần, trong môi trường tích lũy các sản phẩm độc của quá trình trao đổi chất như rượu, acid hữu cơ,... làm cho sinh khối tế bào và hoạt độ enzym không tăng nữa.

Trong khoảng thời gian từ 96 - 104 giờ thì hoạt độ enzym GOD giảm mạnh từ 4,156 U/ml xuống 3,844 U/ml, sinh khối tế bào cũng giảm mạnh từ 124,4 mg xuống còn 111,2 mg. Sự giảm hoạt độ enzym GOD và sinh khối tế bào của chủng *Aspergillus niger* có thể do trong môi trường nguồn dinh dưỡng đã bị cạn kiệt làm giảm hoạt tính trao đổi chất, phân hủy dần dần các chất dự trữ và cuối cùng dẫn đến sự chết hàng loạt của tế bào, thêm vào đó là sự tích lũy các sản phẩm trao đổi chất,...

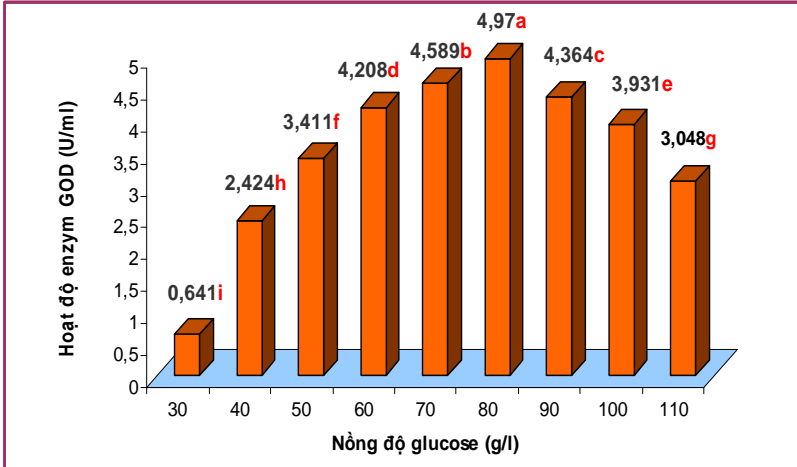
Có nhiều kết luận khác nhau về ảnh hưởng của thời gian đến quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp enzym GOD. Một số tác giả cho rằng thời gian sinh hoạt độ enzym GOD cao nhất là 70 giờ, còn sinh khối tế bào đạt cực đại nằm trong khoảng 50 - 70 giờ. Trong khi đó, Maurizio Petruccioli (1995), khi nghiên cứu việc nâng cao hoạt độ enzym GOD trên chủng *Penicillium variable* (P16) thì kết luận rằng thời gian lên men thu được enzym GOD có hoạt độ cao nhất là nằm giữa 70 - 80 giờ.

Như vậy kết quả mà chúng tôi thu được là ở 64 giờ sinh khối tế bào đạt giá trị cao nhất với 144 mg sinh khối và ở 72 giờ thì enzym GOD đạt giá trị cao nhất với 4,833 U/ml, kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả nói trên.

Kết quả nghiên cứu cũng thể hiện rõ mối quan hệ tuyến tính giữa hoạt độ enzym và sinh khối tế bào thu được. Do đó để thuận lợi cho quá trình nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm ra điều kiện để thu enzym GOD có hoạt độ cao nhất, nên chúng tôi không nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường dinh dưỡng đến sự sinh trưởng và thời gian lên men chúng tôi chọn cố định là 72 giờ, để xác định ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng sinh tổng hợp enzym GOD.

3.2. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ CACBON ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYM GOD CỦA CHỦNG NẤM MỐC *ASPERGILLUS NIGER*.

3.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ glucose



Hình 3.3: Ảnh hưởng của nồng độ glucose đến hoạt độ enzym GOD

(Các chữ *a, b, c, d, e, f, h, g, i* biểu thị sai khác có nghĩa ở mức $p < 0,05$)

Kết quả cho thấy, khi thay đổi nồng độ glucose thì hoạt độ enzym GOD thay đổi.

Với nồng độ glucose thấp thì hoạt độ enzym thấp, ở nồng độ glucose 30 g/l thì hoạt độ enzym GOD chỉ bằng 0,641 U/ml, nhưng khi tăng nồng độ glucose thì hoạt độ enzym GOD tăng lên, cụ thể là khi tăng nồng độ glucose lên 70 g/l thì hoạt độ enzym tăng 4,589 U/ml, tức là tăng 715,91% so với hoạt độ enzym tại nồng độ glucose là 30 g/l. Tiếp tục tăng nồng độ glucose lên 80 g/l thì hoạt độ enzym tăng 4,97 U/ml, tức là hoạt độ enzym gấp 108,3% lần so với hoạt độ

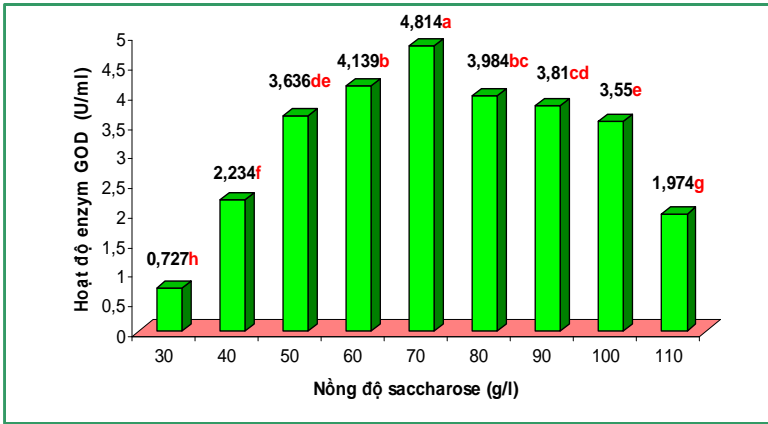
enzym tại nồng độ glucose 70 g/l. Điều này có thể được giải thích là sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật phụ thuộc vào nồng độ cơ chất, khi nồng độ cơ chất tăng thì tốc độ sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật tăng, làm cho quá trình sinh tổng hợp enzym của vi sinh vật tăng theo. Sau đó, tiếp tục tăng nồng độ glucose lên thì hoạt độ enzym GOD giảm. Khi tăng nồng độ glucose lên từ 90 - 100 g/l thì hoạt độ enzym giảm từ 4,364 U/ml xuống 3,931 U/ml. Tại nồng độ glucose là 110 g/l thì hoạt độ enzym GOD là 3,048 U/ml, tức là giảm 38,67% so với hoạt độ enzym tại giá trị cực đại.

Hoạt độ enzym GOD giảm có thể là do sự tồn tại của các tác nhân làm ức chế quá trình sinh tổng hợp enzym GOD như sự tích lũy các sản phẩm của quá trình trao đổi chất của vi sinh vật (rượu, andehyt,...), độ nhớt dung dịch lớn làm tăng áp suất thẩm thấu ảnh hưởng đến màng tế bào của vi sinh vật, đồng thời nồng độ glucose cao sẽ làm pH môi trường thay đổi...

Như vậy, ở nồng độ glucose thích hợp thì hoạt độ enzym GOD đạt giá trị cao nhất, tại mỗi nồng độ glucose khác nhau thì hoạt độ enzym khác nhau, kết quả phân tích ANOVA cũng cho thấy sự sai khác giữa các giá trị hoạt độ là có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $p < 0,05$.

Nồng độ glucose cho hoạt độ enzym GOD cao nhất nằm trong khoảng từ 60 - 90 g/l, tại nồng độ glucose là 80 g/l thì hoạt độ enzym đạt giá trị cực đại với 4,97 U/ml.

3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ saccharose



Hình 3.5: Ảnh hưởng của nồng độ saccharose đến hoạt độ enzym GOD

(Các chữ a, b, bc, cd, de, e, f, h, f biểu thị sai khác có nghĩa ở mức $p < 0,05$)

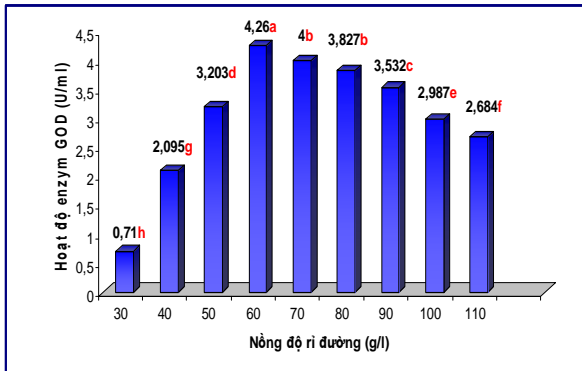
Nhìn vào đồ thị hình 3.5 ta thấy, ở nồng độ saccharose thấp thì hoạt độ enzym thấp, ở nồng độ saccharose là 30 g/l thì hoạt độ enzym là 0,727 U/ml nhưng khi tăng nồng độ saccharose lên từ 40 - 60 g/l thì hoạt độ enzym tăng mạnh từ 2,234 - 4,319 U/ml và đạt cực đại tại nồng độ saccharose tại 70 g/l với 4,814 U/ml, sau đó hoạt độ enzyme giảm dần. Như vậy, khi thay đổi nồng độ saccharose sẽ làm thay đổi hoạt độ enzym GOD, kết quả phân tích ANOVA cho thấy sự khác biệt của hoạt độ enzym GOD tại nồng độ này so với các giá trị còn lại và nó có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$. Tiếp tục tăng nồng độ saccharose thì hoạt độ enzym không tăng nữa, khi tăng nồng độ glucose lên từ 80 - 100 g/l thì hoạt độ enzym giảm từ 3,948 U/ml xuống còn 3,55 U/ml, tại nồng độ saccharose 110g/l thì hoạt độ enzym giảm còn 1,974 U/ml.

Diễn biến trên có thể được giải thích như sau:

Khi tăng nồng độ saccharose thì hoạt độ enzym tăng, điều này có thể được giải thích là do sự sinh trưởng của vi sinh vật tăng theo nồng độ cơ chất, tức là khi nồng độ cơ chất tăng thì tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật tăng. Vì vậy nó làm tăng quá trình sinh tổng hợp enzym GOD của chúng. Nhưng tiếp tục tăng nồng độ saccharose lên thì hoạt độ enzym không tăng nữa. Sự giảm hoạt độ enzym này có thể là do khi nồng độ saccharose cao thì làm cho độ nhớt, áp suất thẩm thấu của môi trường tăng, pH thay đổi,... do đó làm giảm khả năng sinh tổng hợp enzym GOD của vi sinh vật.

Như vậy, nồng độ saccharose cho hoạt độ enzym GOD cao nhất nằm trong khoảng từ 60 - 90 g/l, tại nồng độ saccharose là 70 g/l thì hoạt độ enzym đạt giá trị cực đại với 4,814 U/ml.

3.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ rỉ đường



Hình 3.7: Ảnh hưởng của nồng độ rỉ đường đến hoạt độ enzym GOD

(Các chữ a, b, c, d, e, f, h, g biểu thị sai khác có nghĩa ở mức $p < 0,05$)

Sau khi nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ saccharose đến hoạt độ enzym GOD, chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của nồng

độ rỉ đường đến hoạt tính enzym GOD nhằm tận dụng nguồn phế thải để sản xuất enzym GOD nâng cao hiệu quả kinh tế.

Kết quả ở hình 3.7 cho thấy, khi nồng độ rỉ đường tăng thì hoạt độ enzym GOD tăng mạnh và đạt cực đại, sau đó tiếp tục tăng nồng độ rỉ đường thì hoạt độ enzym không tăng nữa. Như vậy, khi thay đổi nồng độ rỉ đường thì hoạt độ enzym GOD thay đổi.

Kết quả hình 3.7 và 3.8 cho thấy, ban đầu khi nồng độ rỉ đường nằm trong khoảng 30 - 50 g/l thì hoạt độ enzym tăng là 0,71 - 3,203 U/ml, nhưng khi tăng nồng độ rỉ đường lên 60g/l thì hoạt độ enzyme đạt cực đại với 4,26 U/ml, kết quả này thể hiện rõ khi phân tích thống kê ở mức ý nghĩa $p < 0,05$, điều này có thể được giải thích là khi tăng nồng độ cơ chất thì quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật tăng, nên làm tăng khả năng sinh tổng hợp enzym của vi sinh vật. Tiếp tục tăng nồng độ rỉ đường lên, thì hoạt độ enzym GOD giảm dần, ở nồng độ rỉ đường từ 70 - 100 g/l thì hoạt độ enzym giảm từ 4,0 - 2,987 U/ml và ở nồng độ rỉ đường 110 g/l thì hoạt độ enzym GOD thu được là 2,684 U/ml. Có thể sự giảm hoạt độ enzym GOD này là do trong môi trường có nồng độ rỉ đường cao làm cho độ nhớt, áp suất thẩm thấu của môi trường tăng, sự thay đổi pH, sự có mặt của SO_2 , kim loại nặng,... làm hạn chế quá trình sinh tổng hợp enzym GOD.

Sau khi khảo sát ảnh hưởng của 3 nguồn cacbon là saccharose, glucose, rỉ đường, chúng tôi nhận thấy các nguồn cacbon này đều ảnh hưởng lớn đến sự thay đổi hoạt độ enzym ở những nồng độ khác nhau, và ở từng loại khác nhau. Giá trị hoạt độ enzym thu được tại điểm cao nhất cũng khác nhau.

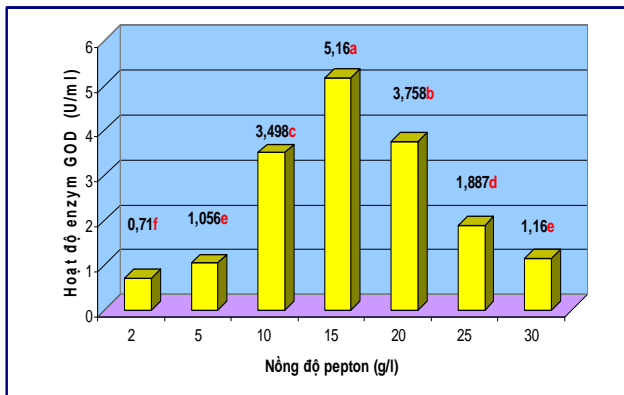
Đối với glucose thì hoạt độ enzym GOD cao nhất là 4,97 U/ml ở nồng độ 80 g/l, với saccharose thì giá trị này thấp hơn, hoạt độ

enzym đạt cao nhất tại nồng độ saccharose 70 g/l ứng với hoạt độ enzym là 4,814 U/ml, còn rỉ đường thì giá trị này là thấp nhất, hoạt độ enzym cao nhất thu được là 4,26 U/ml tại nồng độ rỉ đường 60 g/l. Việc sử dụng rỉ đường sẽ giảm giá thành nguyên liệu và nâng cao được hiệu quả kinh tế của quá trình sản xuất enzym GOD so với sử dụng glucose. Tuy nhiên, với mục đích thu được hoạt độ enzym GOD cao nhất nên chúng tôi chọn nguồn cacbon cho chủng *Aspergillus niger* sinh tổng hợp enzym GOD là glucose và cố định ở nồng độ 80 g/l cho các thí nghiệm tiếp theo.

Để nâng cao hơn nữa hoạt độ của enzym chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt độ enzym GOD.

3.3. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ NITƠ ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYM GOD CỦA CHỦNG NẤM MỐC *ASPERGILLUS NIGER*.

3.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ pepton



Hình 3.9: Ảnh hưởng của nồng độ pepton đến hoạt độ enzym GOD

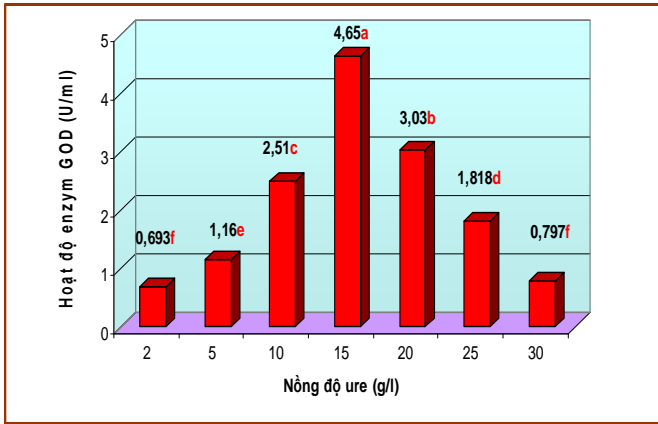
(Các chữ a, b, c, d, e, f biểu thị sai khác có nghĩa ở mức $p < 0,05$)

Nhìn vào đồ thị hình 3.9 ta thấy, ở những nồng độ pepton khác nhau thì hoạt độ enzym khác nhau, sự khác nhau giữa các giá trị hoạt độ enzyme là có ý nghĩa về mặt thống kê ở $p < 0,05$.

Khi nồng độ pepton thấp thì hoạt độ enzym thấp, cụ thể khi thay đổi nồng độ pepton từ 2 - 10g/l thì hoạt độ enzym tăng 0,71-3,498 U/ml, tiếp tục tăng nồng độ pepton lên thì hoạt độ enzym GOD tăng, và ở nồng độ pepton là 15 g/l thì hoạt độ enzyme đạt cực đại với 5,16 U/ml tức là gấp 726,76% so với giá trị enzym tại nồng độ pepton là 2 g/l. Điều này có thể giải thích là khi nồng độ cơ chất tăng thì sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật tăng, do đó làm cho quá trình sinh tổng hợp enzym của vi sinh vật cũng tăng theo. Sau đó, tiếp tục tăng nồng độ pepton lên thì hoạt độ enzym GOD không tăng nữa mà giảm xuống, cụ thể là khi tăng nồng độ pepton lên 20 - 25 g/l thì hoạt độ enzym GOD giảm xuống từ 3,758 U/ml còn 1,887 U/ml. Tại nồng độ glucose là 30 g/l thì hoạt độ enzym giảm còn 1,16U/ml tức là giảm 77,52% so với giá trị hoạt độ enzym cực đại. Như vậy, ở nồng độ pepton thích hợp thì quá trình sinh tổng hợp enzym diễn ra mạnh mẽ, hoạt độ enzym đạt giá trị cực đại. Sự giảm hoạt độ enzym này có thể do nhiều nguyên nhân như khi nồng độ pepton tăng thì làm cho độ nhớt dung dịch tăng, áp suất thẩm thấu tăng.... do đó làm ức chế quá trình sinh tổng hợp enzym GOD.

Như vậy, với nồng độ pepton từ 10 - 20 g/l thì quá trình sinh tổng hợp enzym GOD của chủng nấm mốc *Aspergillus niger* đạt giá trị cao nhất, và hoạt độ enzym GOD đạt cực đại tại nồng độ pepton là 15 g/l ứng với hoạt độ enzym GOD là 5,16 U/ml.

3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ ure



Hình 3.11: Ảnh hưởng của nồng độ ure đến hoạt độ enzym GOD

(các chữ a, b, c, d, e, f biểu thị sai khác có nghĩa ở mức $p < 0,05$)

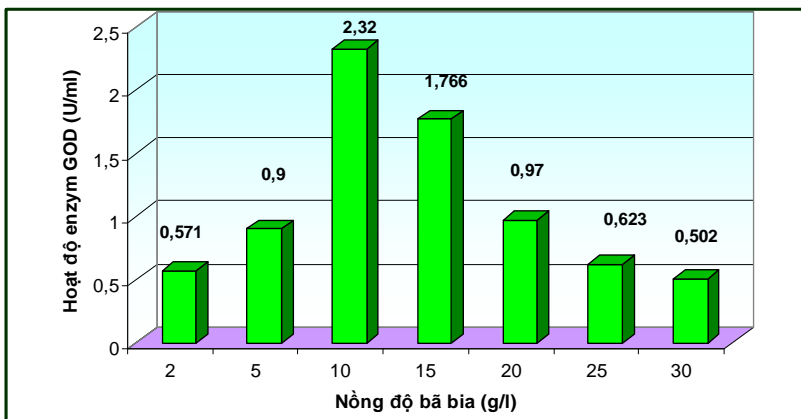
Kết quả thể hiện trên đồ thị hình 3.11 cho thấy, nồng độ ure ảnh hưởng lớn đến hoạt độ enzym GOD. Ở những nồng độ ure khác nhau thì hoạt độ enzym thu được khác nhau. Ban đầu nồng độ ure thấp thì hoạt độ enzym thấp, ở nồng độ ure là 2 g/l thì hoạt độ enzym là 0,693 U/ml, khi tăng nồng độ ure thì hoạt độ enzym GOD tăng, cụ thể là khi tăng nồng độ ure lên 5 g/l thì hoạt độ enzym GOD là 1,16 U/ml, tiếp tục tăng nồng độ ure lên 10 g/l thì hoạt độ enzym tăng mạnh với 2,51 U/ml, và hoạt độ enzym GOD đạt cao nhất tại nồng độ ure là 15 g/l với 4,658 U/ml, tức là gấp 672,15% so với hoạt độ enzyme tại nồng độ ure ban đầu giá trị này cho kết quả tốt nhất khi xử lý thống kê so với các giá trị hoạt độ còn lại ở mức $p < 0,05$. Điều này chứng tỏ khi thay đổi nồng độ ure thì hoạt độ enzym GOD thay đổi, cụ thể là khi tăng nồng độ ure thì hoạt độ enzym GOD tăng theo nghĩa là hoạt độ enzym tăng theo nồng độ cơ chất. Điều này có thể được giải thích là khi nồng độ cơ chất tăng làm cho sự sinh trưởng và

phát triển của vi sinh vật tăng, do đó làm tăng khả năng tổng hợp enzym của vi sinh vật. Sau khi đạt giá trị cực đại nếu tiếp tục tăng nồng độ ure thì hoạt độ enzym không tăng nữa, khi tăng nồng độ ure từ 20 - 25 g/l thì hoạt độ enzym giảm từ 3,03U/ml xuống còn 1,818 U/ml, tại nồng độ glucose là 30 g/l thì hoạt độ enzym giảm còn 0,797 U/ml tức là giảm 83,28% so với hoạt độ enzym cực đại. Sự giảm hoạt độ enzym này có thể do sự tồn tại của các tác nhân gây ức chế như: độ nhớt của dung dịch tăng, áp suất thẩm thấu tăng,... làm hạn chế đến quá trình sinh tổng hợp enzym GOD của chủng nấm mốc *Aspergillus niger*.

Như vậy, ở nồng độ ure từ 10 - 20 g/l thì hoạt độ enzym GOD thu được là cao nhất, tức là từ 2,5 - 3,03 U/ml. Trong đó, hoạt độ enzym đạt cực đại tại nồng độ ure 15 g/l ứng với hoạt độ enzym là 4,65 U/ml. Kết quả lên men thể hiện rõ ở hình 3.12.

Sau khi nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ ure đến hoạt độ enzym GOD, chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của nồng độ bã bia đến hoạt tính enzym GOD nhằm tận dụng nguồn phế thải để sản xuất enzym GOD nâng cao hiệu quả kinh tế.

3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ bã bia



Hình 3.13: Ảnh hưởng của nồng độ bã bia đến hoạt độ enzym GOD

Kết quả ở hình 3.12 cho thấy nồng độ bã bia cũng ảnh hưởng sâu sắc đến hoạt độ enzym GOD. Khi thay đổi nồng độ bã bia, thì hoạt độ enzym GOD thay đổi, sự khác nhau giữa các giá trị hoạt độ enzym này là có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.

Từ kết quả hình 3.13 và 3.14 cho thấy nồng độ bã bia là 2 g/l thì hoạt độ enzym là 0,571 U/ml. Khi tăng nồng độ bã bia lên thì hoạt độ enzym GOD tăng, ở nồng độ bã bia là 5 g/l thì hoạt độ enzym tăng đến 0,9 U/ml, hoạt độ enzym này đạt cực đại tại nồng độ bã bia là 10 g/l ứng với hoạt độ enzym là 2,32 U/ml, tức là gấp 372,392% so với hoạt độ enzym ban đầu. Sự tăng hoạt độ enzym GOD theo nồng độ bã bia có thể giải thích bằng sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật theo nồng độ cơ chất nên làm tăng quá trình sinh tổng hợp enzym của của vi sinh vật. Tiếp tục tăng nồng độ bã bia thì hoạt độ enzym GOD giảm, cụ thể là ở nồng độ bã bia là 15 g/l thì hoạt độ enzym là 1,766 U/ml, khi nồng độ bã bia tăng lên 30 g/l thì hoạt độ

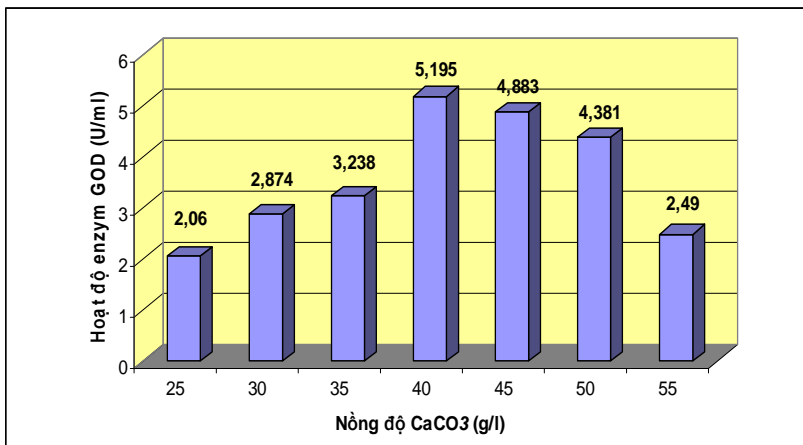
enzym giảm còn 0,502 U/ml, tức là giảm 78,362% so với giá trị hoạt độ enzym cực đại. Sự giảm hoạt độ enzym này là do sự tồn tại của một số tác nhân làm ức chế quá trình sinh tổng hợp enzym GOD như độ nhớt dung dịch tăng, áp suất thẩm thấu tăng, sự có mặt của một số tạp chất lẫn vào trong quá trình sản xuất bia,... làm hạn chế sự sinh tổng hợp enzym của vi sinh vật do đó làm cho hoạt độ enzym giảm.

Như vậy, ở nồng độ bã bia từ 1 - 2% tức 10 - 20 g/l thì hoạt độ enzym đạt giá trị cao nhất, và tại nồng độ bã bia là 10 g/l thì hoạt độ enzym GOD đạt giá trị cực đại với 2,32 U/ml, kết quả lên men thể hiện rõ ở hình 3.14.

Qua khảo sát ảnh hưởng của một số nguồn nitơ đến quá trình sinh tổng hợp enzym GOD của chủng nấm mốc *Aspergillus niger*, chúng tôi nhận thấy nguồn pepton cho hoạt độ enzym cao nhất, nồng độ pepton thích hợp là 15 g/l tương ứng với hoạt độ enzym là 5,16 U/ml. Kết quả này trùng với nghiên cứu của D. G. Hatzikioukoulou và B. J. Macris (1995), khi khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ cao nấm men, pepton, ure, cao ngô, NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, đến sự sinh tổng hợp enzym GOD và cho rằng pepton là nguồn nitơ cho hoạt độ enzym GOD là cao nhất. Vì vậy, chúng tôi cố định nguồn nitơ là pepton ở 15 g/l để bố trí với các thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.

Với mục đích nâng cao hơn nữa hoạt độ của enzym GOD trong quá trình lên men, chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của nồng độ CaCO_3 đến hoạt độ enzym GOD.

3.4. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ CaCO_3 ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYM GOD CỦA CHỦNG NẤM MỐC *ASPERGILLUS NIGER*



Hình 3.15: Ảnh hưởng của nồng độ CaCO₃ đến hoạt độ enzym GOD

Nhìn vào hình 3.15 và hình 3.16 ta thấy, khi thay đổi nồng độ CaCO₃ thì hoạt độ enzym GOD thay đổi, ở nồng độ CaCO₃ là 25 g/l thì hoạt độ enzym là 2,06 U/ml. Khi tăng nồng độ CaCO₃ thì hoạt độ enzym tăng, khi tăng nồng độ CaCO₃ lên 30 - 35 g/l thì hoạt độ enzym tăng từ 2,874 - 3,238 U/ml, hoạt độ enzym GOD đạt cực đại ở nồng độ 40 g/l với 5,195 U/ml. Do CaCO₃ đóng vai trò là tác nhân cảm ứng nên khi tăng hàm lượng chúng lên thì làm tăng hoạt độ của enzym GOD. Sau đó, nếu tiếp tục tăng nồng độ CaCO₃ thì hoạt độ enzym vẫn không tăng nữa, cụ thể là khi tăng nồng độ CaCO₃ từ 45 - 50 g/l thì hoạt độ enzym giảm từ 4,883 - 4,381 U/ml, tại nồng độ CaCO₃ 55 g/l thì hoạt độ enzym GOD giảm còn 2,494 U/ml. Sự giảm hoạt độ enzym này có thể là do sự tồn tại một số tác nhân gây ức chế.

Như vậy, CaCO₃ với vai trò là chất kích thích với nồng độ CaCO₃ nằm trong khoảng 4 - 5% tức là 40 - 50 g/l thì hoạt độ enzym

GOD đạt giá trị cao nhất, tại nồng độ CaCO_3 40 g/l thì hoạt độ enzym GOD đạt giá trị cực đại với 5,195 U/ml.

Sau khi nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sự sinh tổng hợp enzym của chủng nấm mốc *Aspergillus niger* chúng tôi kết luận: Để chủng nấm mốc này sinh tổng hợp enzym GOD có hoạt độ cao thì cần lên men trong môi trường lỏng với nguồn cacbon là glucose có nồng độ 80 g/l, nguồn nitơ là pepton có nồng độ là 15 g/l và CaCO_3 ngoài vai trò cung cấp chất khoáng, điều chỉnh pH thì nó còn là chất cảm ứng quá trình sinh tổng hợp enzym GOD có nồng độ 40 g/l. Quá trình lên men được thực hiện trên máy lắc với tốc độ là 175 vòng/phút. Thời gian lên men là 72 giờ, pH được điều chỉnh là 6,7.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu thực nghiệm, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Xác định được đường cong sinh trưởng của chủng *Aspergillus niger* nuôi cấy gián đoạn trong môi trường lỏng, và mối quan hệ giữa sự phát triển sinh khối tế bào và hoạt độ enzym ngoại bào sinh ra của chủng *Aspergillus niger* trong môi trường lên men lỏng. Theo đó, sinh khối chủng *Aspergillus niger* đạt cực đại tại thời điểm 64 giờ và hoạt độ enzym glucose oxidase ngoại bào đạt cực đại tại 72 giờ.

2. Đã khảo sát ảnh hưởng của 3 nguồn cacbon đến khả năng sinh tổng hợp enzym GOD cho thấy: khi sử dụng nguồn cacbon là

glucose, thì hoạt độ enzym đạt giá trị cao hơn so với việc sử dụng saccharose và ri đường.

- Nồng độ glucose cho hoạt độ enzym cao nằm trong khoảng 60 - 90 g/l, và trong phạm vi nghiên cứu, hoạt độ enzym đạt giá trị cực đại với 4,97 U/ml tại nồng độ glucose 80 g/l.

- Nồng độ saccharose cho hoạt độ enzym cao nằm trong khoảng 60 - 90 g/l, và trong phạm vi nghiên cứu, hoạt độ enzym đạt cực đại với 4,814 U/ml tại nồng độ saccharose 70 g/l.

- Nồng độ ri đường cho hoạt độ enzym cao nằm trong khoảng 50 - 80 g/l, và trong phạm vi nghiên cứu, hoạt độ enzym đạt cực đại là 4,26 U/ml tại nồng độ ri đường 60 g/l.

3. Đã khảo sát ảnh hưởng của 3 nguồn nitơ đến khả năng sinh tổng hợp enzym GOD cho thấy: với nguồn nitơ là pepton, thì hoạt độ enzym thu được có giá trị cao hơn so với việc sử dụng ure và bã bia.

+ Nồng độ pepton cho hoạt độ enzym cao nằm trong khoảng 10 - 20 g/l, và trong phạm vi nghiên cứu, hoạt độ enzym đạt giá trị cực đại với 5,16 U/ml tại nồng độ pepton 15 g/l.

+ Nồng độ ure cho hoạt độ enzym cao nằm trong khoảng 10 - 20 g/l, và trong phạm vi nghiên cứu, hoạt độ enzym đạt giá trị giá trị cực đại với 4,658 U/ml tại nồng độ ure 15 g/l.

+ Nồng độ bã bia cho hoạt độ enzym cao nằm trong khoảng 10 - 20g/l, và trong phạm vi nghiên cứu, hoạt độ enzym đạt giá trị cực đại là 2,32 U/ml tại nồng độ bã bia 10 g/l.

4. Đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ CaCO_3 đến khả năng sinh tổng hợp enzym GOD, nồng độ CaCO_3 cho hoạt độ enzym cao nằm trong khoảng 4 - 5%, và trong phạm vi nghiên cứu, hoạt độ enzym đạt giá trị cực đại với 5,195 U/ml tại nồng độ CaCO_3 40 g/l.

2. KIẾN NGHỊ

- Nghiên cứu ảnh hưởng về sự thay đổi của pH, nhiệt độ, đến quá trình sinh tổng hợp enzym GOD ngoại bào của chủng nấm mốc *Aspergillus niger*.

- Tối ưu hóa các điều kiện môi trường lên men để chủng nấm mốc *Aspergillus niger* sinh enzym GOD ngoại bào có hoạt độ cao nhất.

- Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp enzym GOD nội bào của chủng nấm mốc *Aspergillus niger*.