

# KHẢO SÁT KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LIPASE TỪ CÁC CHỦNG NẤM MỐC PHÂN LẬP TRONG MÔI TRƯỜNG GIÀU LIPID

Đào Thị Mỹ Linh\*, Trần Thị Mỹ Thảo,  
Lý Thị Diễm Trang, Lê Thị Mỹ Trinh

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

\*Email: linhdmtm@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 03/7/2018; Ngày chấp nhận đăng: 30/8/2018

## TÓM TẮT

Lipase có thể thu nhận từ nấm mốc do điều kiện nuôi cấy dễ kiểm soát và có thể sinh trưởng trong các môi trường bán rắn có chứa phụ phẩm như bã mía, lõi ngô, bánh dầu. Nghiên cứu nhằm tuyển chọn chủng nấm mốc tự nhiên có hoạt tính lipase cao được phân lập từ nguồn mẫu có chứa lipid và khảo sát điều kiện nuôi cấy trên môi trường bán rắn. Quá trình phân lập để thu nhận các chủng nấm mốc được thực hiện trên môi trường PGA (Potato glucose agar). Tuyển chọn cấp 1 được tiến hành trên môi trường M1 có 1% tween 80, qua đó đường kính vòng phân giải được xác định. Tuyển chọn cấp 2 được đánh giá dựa trên hoạt tính enzyme lipase và chủng mốc có khả năng sinh lipase cao nhất được định danh. Các yếu tố ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy tới khả năng sinh tổng hợp lipase được khảo sát bao gồm thành phần phân trăm cơ chất bánh dầu: bã mía (100:0; 75:25; 25:75; 0:100), độ ẩm môi trường (40-70%), thời gian nuôi cấy (1-7 ngày). Kết quả đã thu được 27 chủng nấm mốc từ 6 nguồn mẫu phân lập khác nhau, tuyển chọn cấp 1 xác định được 6 chủng có vòng phân giải với đường kính 4,4-8,2 mm. Chủng mốc có hoạt tính cao nhất sau tuyển chọn cấp 2 được định danh là *Aspergillus niger*. Môi trường nuôi cấy với thành phần cơ chất 75% bánh dầu và 25% bã mía cho hoạt tính lipase cao nhất (1,86 UI/mL) sau thời gian 4 ngày với độ ẩm 60%.

*Từ khóa:* *Aspergillus niger*, bánh dầu, bã mía, lipase, môi trường bán rắn, vòng phân giải.

## 1. MỞ ĐẦU

Lipase (ester triacylglycerol hydrolase, EC 3.1.1.3) là enzyme quan trọng trong việc thủy phân chất béo, giải phóng các acid béo tự do và glycerol. Lipase có ở hầu hết mọi cơ thể sống, tế bào và có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất, hấp thu và chuyển hóa lipid [1, 2].

Enzyme lipase nguồn gốc từ vi sinh vật có tầm quan trọng hơn so với từ thực vật và động vật nhờ tính ổn định và có thể thu nhận được với hàm lượng cao, chi phí thấp do có thể tận dụng các nguồn phụ phẩm như bã mía, bánh dầu, bột lúa mì, bột đậu nành để làm môi trường nuôi cấy [1, 3]. Trong số đó, nấm được công nhận là một trong những nguồn lipase tốt nhất. Lipase nấm được chú ý trong các ngành công nghiệp do đặc tính bền vững và tính ổn định dưới các điều kiện vật lý, hóa học. Trong tự nhiên, đất bị ô nhiễm từ quá trình sản xuất dầu và các nơi sản xuất bơ sữa, các loài nấm có tiềm năng tiết ra lipase để làm giảm mỡ và dầu. Quá trình sinh tổng hợp lipase chỉ xảy ra khi đoạn gen tổng hợp lipase phải được hoạt hóa trước bằng chất cảm ứng (lipid). Chất này giúp giải phóng RNA polymerase thoát khỏi sự kìm hãm của chất ức chế bằng cách kết hợp với chính chất ức chế đó. Bản chất của chất cảm ứng chính là cơ chất chịu sự xúc tác của lipase [4]. Vì vậy, đặc tính lipase ngoại bào của

một số loài nấm như *Mucor spp.*, *Rhizopus spp.*, *Geotrichum candidum*, *Pencillium spp.*, *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa*, *Cunninghamella verticillata* và *Aspergillus spp.* có khả năng phân hủy chất béo đã được tập trung vào nghiên cứu để hướng tới các ứng dụng khác của enzyme [2, 5].

Enzyme lipase đóng vai trò quan trọng trong các ngành công nghiệp. Trong công nghiệp thực phẩm, lipase được dùng thủy phân chất béo của sữa, làm chín, tăng cường mùi thơm trong sản xuất phô mai; trong sản xuất nước giải khát, lipase giúp cải thiện mùi hương của sản phẩm. Các polymer sinh học được tổng hợp nhờ xúc tác của lipase được ứng dụng làm màng bao kỹ nước. Trong công nghiệp tẩy rửa, lipase giúp loại bỏ các vết dầu mỡ trên vải, tăng khả năng tẩy rửa của bột giặt [2]. Trong xử lý nước thải giàu lipid, lipase được sử dụng ở giai đoạn tiền xử lý có tác động thủy phân một phần lipid tạo thành những chất đơn giản, giúp quá trình xử lý ở giai đoạn sau đạt hiệu quả tốt hơn. Ngoài ra, lipase còn được ứng dụng trong y dược, đóng vai trò là chất hỗ trợ trong quá trình tiêu hóa [2, 5]. Do vậy, lipase có nhu cầu thị trường lớn nhưng các chế phẩm lipase đang được sử dụng phần lớn có nguồn gốc từ nhập khẩu. Từ đó, việc nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp, thu nhận lipase có hoạt tính cao và ổn định từ vi sinh vật là cần thiết, giúp Việt Nam có thể sản xuất lipase nội địa có chất lượng và giá thành rẻ. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra nguồn giống sinh vật trong tự nhiên và điều kiện nuôi cấy bán rắn thích hợp để thu nhận enzyme lipase có hoạt tính cao.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

Bánh dầu đậu phộng, bã mía được thu nhận từ các cơ sở sản xuất dầu đậu phộng tại huyện Củ Chi và các cơ sở bán nước mía ở quận Tân Phú, Tp.Hồ Chí Minh. Nguyên liệu được sấy đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 80 °C, nghiền nhỏ và rây để tạo ra các hạt có kích thước 0,21-0,42 mm đối với bánh dầu [6] và 0,8-1,7 mm đối với bã mía [7].

Mẫu phân lập được lấy ở nơi có chứa dầu như: đất gần bãi rác (DV), nước thải sinh hoạt (NT), chất thải thực phẩm mốc (MC - trộn cơm nguội, bánh mì, vỏ cam, vỏ chuối và một ít dầu đậu phộng). Các mẫu này được lưu giữ ở nhiệt độ phòng trong điều kiện hiếu khí trong thời gian 4-5 ngày. Các mẫu đậu phộng (ĐP), dừa (MD), bánh dầu (BD) được thu nhận, giã nhuyễn và ủ trong điều kiện tương tự.

Các hóa chất chính được sử dụng trong nghiên cứu gồm có agar, dầu olive, ethanol (Việt Nam), gum arabic, peptone (Ấn Độ), glucose, aceton, tween 80, phenolphthalein (Trung Quốc).

Môi trường PGA (1 L) có thành phần gồm: nước chiết khoai tây (200 mL), glucose (20 g), agar (20 g) và nước cất, được điều chỉnh pH đến 5,5 [8].

Môi trường M1 (1 L) có thành phần gồm: peptone (10 g), NaCl (5 g), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,1 g), agar (20 g), tween 80 (10 mL) và nước cất, được điều chỉnh pH đến 6,0 [9].

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập các chủng nấm mốc có khả năng sinh lipase từ nguồn mẫu giàu lipid

Các chủng nấm mốc có khả năng sinh lipase từ nguồn mẫu giàu lipid được phân lập theo phương pháp pha loãng trên môi trường PGA [8]. Khuẩn lạc nấm mốc sau 3 ngày nuôi cấy được cấy chuyển giữ giống trên môi trường thạch nghiêng PGA ở nhiệt độ 4 °C [10].

### 2.2.2. Tuyển chọn và định danh chủng nấm mốc có khả năng sinh lipase cao

*Tuyển chọn cấp 1 các chủng nấm mốc có khả năng sinh lipase:*

Chủng nấm mốc làm thuần sau khi phân lập được cấy chấm điểm trên đĩa petri có môi trường M1. Các đĩa đã cấy được ủ ở nhiệt độ phòng sau 72 giờ, xác định đường kính khuẩn lạc (d) và đường kính vòng phân giải (D), những chủng mốc có vòng thủy phân (D-d) trong khoảng 1,4-26,7 mm được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo [11]. Hình thái khuẩn ty, màu sắc bào tử sau 2 ngày cấy được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 40X [8].

*Tuyển chọn cấp 2 các chủng nấm mốc có khả năng sinh lipase cao:*

Hoạt tính lipase được xác định dựa trên phương pháp chuẩn độ của Fleuri *et al.* (2014) [3].

Bào tử giống được chuẩn bị bằng cách sử dụng dung dịch tween 80 (0,1% v/v) đã khử trùng cho vào ống thạch nghiêng PGA có bào tử đã được ủ ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Bào tử được tách khỏi bề mặt thạch chuyển sang ống nghiệm vô trùng và bảo quản ở 4 °C cho đến khi sử dụng. Mật độ bào tử được xác định bằng buồng đếm hồng cầu.

Tất cả các chủng nấm mốc có vòng phân giải từ 1,4-26,7 mm thu được ở tuyển chọn cấp 1 được nuôi cấy bán rắn trong bình tam giác 250 mL với thành phần môi trường gồm có 10 g cơ chất (75% bánh dầu đậu phộng, 25% bã mía), bổ sung 12 mL nước cất để điều chỉnh độ ẩm môi trường 55%. Quá trình nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ phòng, enzyme được thu nhận sau 72 giờ nuôi cấy [12].

Enzyme được trích ly từ quá trình lên men sử dụng dung dịch đệm phosphate 0,01 mmol/L pH 7,0 lắc ở 170 vòng/phút trong 30 phút ở 37 °C. Hoạt tính enzyme được xác định trong dịch nổi thu được sau khi lọc và ly tâm ở 5500 vòng/phút trong 15 phút [13].

*Định danh chủng nấm mốc* có khả năng sinh lipase có hoạt tính cao nhất sau quá trình phân lập và tuyển chọn cấp 1, cấp 2 được thực hiện bằng phương pháp giải trình tự gen 28S tại phòng thí nghiệm Công ty Nam Khoa Tp. Hồ Chí Minh.

### 2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng điều kiện môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp lipase từ nấm mốc

Môi trường nuôi cấy khảo sát được chuẩn bị trong bình tam giác 250 mL với 10 g cơ chất có thành phần phần trăm bánh dầu, bã mía khác nhau (0:100; 25:75; 75:25; 100:0). Nước cất được bổ sung 7, 10, 12, 15, 23, 34 mL tương ứng để tạo độ ẩm môi trường 40%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%. Bào tử giống nấm mốc có mật độ  $\geq 10^7$  (bào tử/mL) được cấy vào môi trường và ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng (27,5-30 °C) với thời gian nuôi cấy được khảo sát từ 1-7 ngày. Các yếu tố ảnh hưởng được đánh giá dựa trên hoạt tính lipase.

## 2.3. Phương pháp phân tích

*Xác định hoạt tính lipase bằng phương pháp chuẩn độ:*

Hoạt tính lipase được xác định bằng cách dùng 5 mL cơ chất gồm 1,25 mL dầu olive và 3,75 mL gum arabic 7% (v/v), 2 mL đệm phosphate 0,01 M (pH 7,0) và 1 mL dịch enzyme thô. Hỗn hợp được ủ ở 37 °C và lắc với tốc độ 130 vòng/phút trong 30 phút. Ngừng phản ứng enzyme được thực hiện bằng cách thêm 15 mL hỗn hợp acetone và ethanol (1:1, v/v). Chuẩn độ bằng NaOH 0,05 M dùng phenolphatalein như chất chỉ thị ở pH 11 được tiến hành để xác định lượng acid béo tự do. Một đơn vị hoạt tính lipase được xác định là lượng enzyme tạo ra 1  $\mu$ mol axit béo trong mỗi phút ở điều kiện pH 7,0 và 40 °C [3].

$$\text{Hoạt tính lipase (UI/mL)} = \frac{\Delta V_{NaOH} \cdot C_{M NaOH} \cdot 1000}{V_{enzyme} \cdot t}$$

Trong đó:  $\Delta V_{NaOH}$ : Hiệu thể tích NaOH mẫu và đối chứng (mL),  $C_{M NaOH}$ : Nồng độ mol của NaOH,  $V_{enzyme}$ : số mL enzyme tham gia phản ứng,  $t$ : thời gian phản ứng (phút), 1000: hệ số quy đổi đơn vị

*Phân tích và xử lý số liệu:* Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, các số liệu được ghi nhận và xử lý bằng Microsoft Excel 2010, Statgraphic XVI và Origin 8.5.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập các chủng nấm mốc

Các chủng nấm mốc được phân lập trên môi trường thạch PGA bằng cách làm thuần sau khi cấy trải và chọn lọc các khuẩn lạc đặc trưng. Kết quả thu được bộ sưu tập giống có 27 chủng nấm mốc được dùng để khảo sát khả năng sinh tổng hợp lipase. Một số đặc điểm của chủng nấm mốc được quan sát mô tả trong Bảng 1.

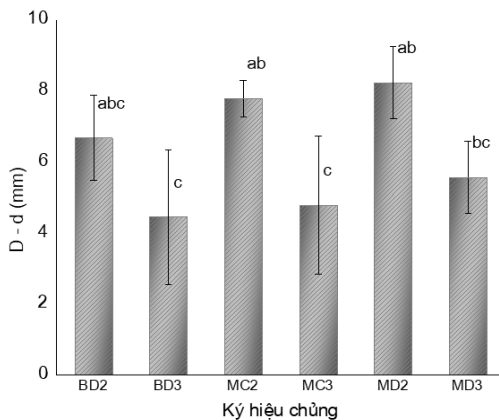
Bảng 1. Một số đặc điểm của các chủng nấm mốc được phân lập

Nguồn phân lập	STT	Ký hiệu	Đặc điểm của chủng nấm mốc		
			Màu khuẩn lạc	Thời gian xuất hiện bào tử (ngày)	Đường kính nấm sau 4 ngày (mm)
Mẫu đất	1	DV <sub>1</sub>	Vàng nâu	2	52
	2	DV <sub>2</sub>	Xanh rêu	2	63
	3	DV <sub>3</sub>	Xám trắng	2	50
	4	DV <sub>4</sub>	Trắng	2	30
	5	DV <sub>5</sub>	Xanh lục	3	60
	6	DV <sub>6</sub>	Vàng nâu	3	58
	7	DV <sub>7</sub>	Trắng	3	85
	8	DV <sub>8</sub>	Xanh rêu	2	55
	9	DV <sub>9</sub>	Xanh lục đậm	2	12
Mẫu chất thải thực phẩm	10	MC <sub>1</sub>	Xanh rêu	2	57
	11	MC <sub>2</sub>	Đen	1	60
	12	MC <sub>3</sub>	Xám đen	1	74
Mẫu dứa mốc	13	MD <sub>1</sub>	Xanh rêu	2	55
	14	MD <sub>2</sub>	Đen	1	57
	15	MD <sub>3</sub>	Đen	1	62
Mẫu bánh dầu đậu phộng mốc	16	BD <sub>1</sub>	Vàng	3	55
	17	BD <sub>2</sub>	Đen	2	60
	18	BD <sub>3</sub>	Vàng	3	13
	19	BD <sub>4</sub>	Xanh	2	58
	20	BD <sub>5</sub>	Xanh trắng	3	10

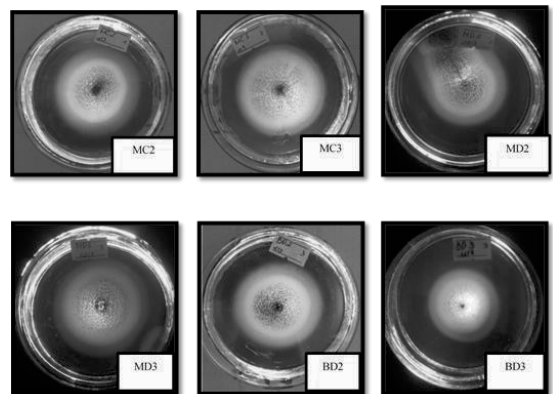
Nguồn phân lập	STT	Ký hiệu	Đặc điểm của chủng nấm mốc		
			Màu khuẩn lạc	Thời gian xuất hiện bào tử (ngày)	Đường kính nấm sau 4 ngày (mm)
Mẫu đậu phộng mốc	21	ĐP <sub>1</sub>	Xanh rêu	2	55
	22	ĐP <sub>2</sub>	Đen nâu	2	80
Mẫu nước thải sinh hoạt	23	NT <sub>1</sub>	Xám	3	41
	24	NT <sub>2</sub>	Đen	3	55
	25	NT <sub>3</sub>	Vàng cam	3	67
	26	NT <sub>4</sub>	Đen	3	53
	27	NT <sub>5</sub>	Đen	2	47

### 3.2. Tuyển chọn cấp một các chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp lipase

Phương pháp kiểm tra hoạt tính lipase nhờ vào sự thủy phân tween 80 tạo vòng thủy phân là một phương pháp đơn giản và phổ biến dùng để đánh giá sơ bộ hoạt tính lipase của nấm mốc trong bước đầu phân lập [14]. Các chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp lipase được sàng lọc từ 27 chủng phân lập được bằng cách tiến hành thử định tính khả năng sinh lipase trên môi trường M1. Kết quả thu nhận được 6 chủng nấm mốc có vòng thủy phân sau 3 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ phòng. Các chủng này được phân lập từ các nguồn như bánh dầu đậu phộng, mẫu chất thải thực phẩm mốc, dứa mốc tương ứng với các chủng BD<sub>2</sub>, BD<sub>3</sub>, MC<sub>2</sub>, MC<sub>3</sub>, MD<sub>2</sub>, MD<sub>3</sub>. Kết quả xác định đường kính vòng thủy phân của 6 chủng nấm mốc được trình bày ở Hình 1 và 2. Các chủng nấm mốc có đường kính vòng thủy phân dao động từ 4,4 mm đến 8,2 mm. Trong đó, chủng MD<sub>2</sub> có khả năng tạo vòng thủy phân tốt nhất so với các chủng được phân lập từ các mẫu dứa và các mẫu khác. Vòng thủy phân của chủng MD<sub>2</sub> sau 3 ngày nuôi cấy là 8,2 mm, cho thấy tiềm năng tốt trong việc sản xuất enzyme lipase, tiếp theo là chủng MC<sub>2</sub> có đường kính vòng thủy phân 7,8 mm và chủng BD<sub>3</sub> có đường kính vòng thủy phân thấp nhất là 4,4 mm.



Hình 1. Đường kính vòng thủy phân của các chủng nấm mốc trong môi trường M1  
(<sup>a,b,c</sup>: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

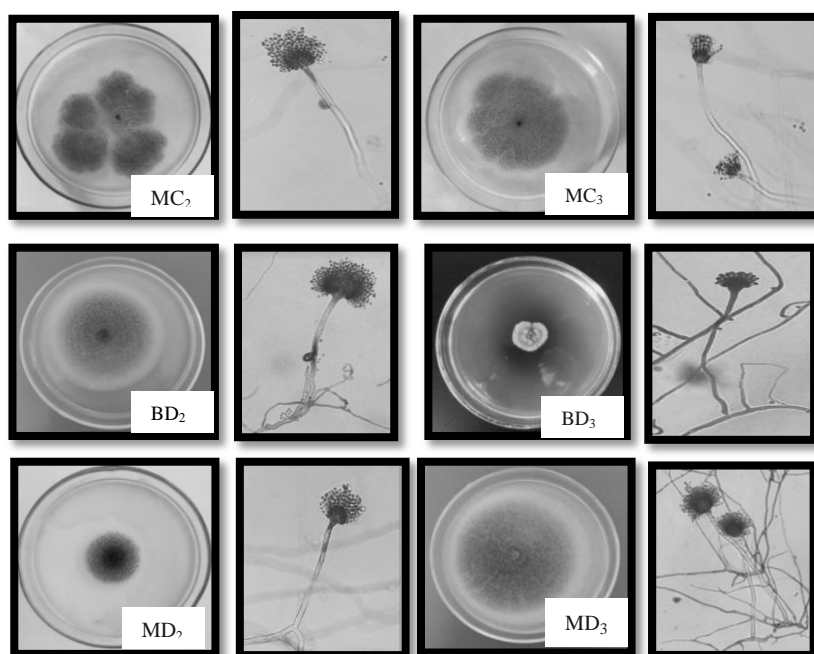


Hình 2. Các chủng nấm mốc có vòng thủy phân trong môi trường M1

Các chủng nấm mốc được cho là có khả năng sinh tổng hợp enzyme lipase vì khi enzyme được sinh ra sẽ thủy phân cơ chất tween 80 - hay còn được gọi polysorbates 80, là

chất lỏng nhờn có nguồn gốc từ polyethoxylated sorbitan (một dẫn xuất của sorbitol) ester hóa với acid oleic. Tween 80 được sử dụng như một chất cảm ứng kích thích cho sự giải phóng enzyme của tế bào [15], làm giải phóng các acid béo tự do. Các acid béo này tác dụng với ion canxi có trong môi trường tạo thành phức hợp không tan có thể thấy như một vòng trắng đục xung quanh vị trí cấy chấm điểm và đó là vòng thủy phân [9]. Nghiên cứu của Aly *et al.* (2017) đã phân lập được 22 chủng vi khuẩn trên môi trường NA, sàng lọc khả năng sinh enzyme lipase trên môi trường có tween 80 và cao nấm men, kết quả thu được các chủng vi khuẩn có đường kính vòng thủy phân 9-28 mm, trong đó chủng *Bacillus coagulans* có khả năng sinh tạo vòng lớn nhất đạt 28 mm sau 2 ngày ủ ở 37 °C [15]. Kết quả có sự khác biệt với nghiên cứu này có thể được giải thích do sự khác biệt về nguồn vi sinh vật sử dụng trong quá trình nuôi cấy thu nhận lipase.

Để định danh sơ bộ các chủng có khả năng sinh enzyme lipase, 6 chủng nấm đã tuyển chọn được nhận diện dựa trên đặc điểm đại thể của khuẩn lạc và đặc điểm vi thể dưới kính hiển vi quang học (Hình 3). Đối với quan sát đại thể, các khuẩn lạc được cấy chấm điểm trên đĩa thạch PGA, ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày. Kết quả cho thấy, các khuẩn lạc có màu trắng và sau 3 ngày phân lập xuất hiện bào tử màu xám đen hoặc đen, trong đó chỉ có bào tử chứa chủng BD<sub>3</sub> có màu vàng.



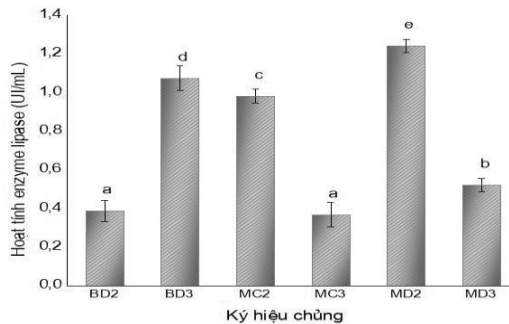
Hình 3. Hình thái khuẩn lạc và vi thể của nấm dưới vật kính 40X

Quan sát vi thể dưới kính hiển vi ở vật kính 40X bằng phương pháp phòng ẩm nhận thấy, các chủng nấm đều có đặc điểm là khuẩn ty có vách ngăn, giá bào tử trần phát triển từ tế bào chân, như là một nhánh của khuẩn ty, gần thẳng góc với trục của tế bào chân. Giá bào tử trần không có nhánh, có phần đỉnh to ra thành bong hình chùy, hình elip, hình nửa cầu hoặc hình cầu. Bong này gọi là bong đỉnh giá mang các thể bình. Các thể bình này hoặc song song và hợp thành cụm ở phần đỉnh bong, hoặc xếp thành tia sát nhau trên bề mặt bong. Thể bình chỉ có 1 hoặc 2 tầng. Các bào tử trần được tạo thành nối tiếp nhau trong miệng thể bình, thành chuỗi hướng góc, không phân nhánh. Khối bào tử trần đỉnh bong có các hình dạng hình cầu, hình tia tỏa tròn. Các đặc điểm hình thái này hoàn toàn phù hợp với khóa định loại của Bùi Xuân Đồng và Nguyễn Văn Huy (2000). Kết quả theo dõi khuẩn lạc và quan sát vi

thể các chủng phân lập được có thể xác định các chủng MC<sub>2</sub>, MC<sub>3</sub>, BD<sub>2</sub>, BD<sub>3</sub>, MD<sub>2</sub>, MD<sub>3</sub> đều thuộc chi *Aspergillus* sp. [16].

### 3.3. Tuyển chọn cấp hai các chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp lipase cao

6 chủng nấm mốc sàng lọc từ tuyển chọn cấp một được nuôi cấy trên môi trường bán rắn (bánh dầu đậu phộng, bã mía). Sau 4 ngày nuôi cấy, dịch enzyme thô được thu nhận và hoạt tính enzyme được xác định bằng phương pháp chuẩn độ. Kết quả được trình bày ở Hình 4. Hoạt tính lipase của các chủng nấm mốc dao động trong khoảng 0,37-1,25 UI/mL. Trong đó, chủng MC<sub>3</sub> có hoạt tính thấp nhất (0,37 UI/mL), chủng BD<sub>3</sub> có hoạt tính khá cao (1,10 UI/mL) và chủng có hoạt tính cao nhất là MD<sub>2</sub> (1,24 UI/mL).



Hình 4. Hoạt tính enzyme lipase của 6 chủng nấm mốc trên môi trường bán rắn (a,b,c...: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

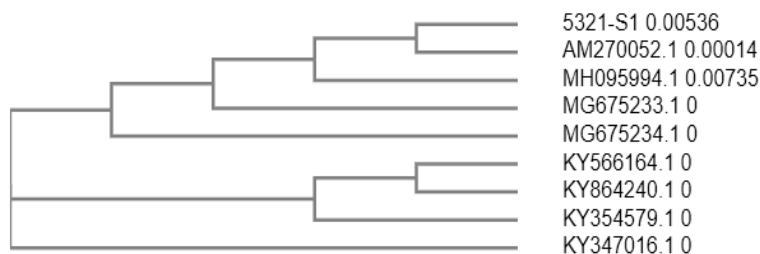
Khi đối chiếu với kết quả tuyển chọn cấp một, cơ chất tween 80 và bánh dầu đậu phộng cho kết quả tương đối tương đồng ở các chủng MC<sub>2</sub>, MC<sub>3</sub>, MD<sub>2</sub>, MD<sub>3</sub>. Tuy nhiên, chủng BD<sub>2</sub>, BD<sub>3</sub> có sự khác biệt khá rõ ràng. Chủng BD<sub>3</sub> có vòng phân giải thấp nhất (4,4 mm) nhưng hoạt tính trong nuôi cấy bán rắn khá cao (1,10 UI/mL) và chủng BD<sub>2</sub> có đường kính vòng phân giải khá cao (6,7 mm) nhưng hoạt tính lại rất thấp (0,37 UI/mL). Sự khác biệt về kết quả thu được giữa tween 80 và lên men bán rắn có thể liên quan đến quá trình thực hiện, phương pháp xác định hoạt tính và cơ chất sử dụng. Một enzyme được sản xuất bởi 2 môi trường khác nhau và độ đặc hiệu khác nhau tức là chủng đó tạo ra enzyme lipase thủy phân ester chuỗi dài và có hoạt tính tốt đối với phương pháp chuẩn độ có chứa dầu olive hơn là trong đĩa thạch có chứa tween 80 và ngược lại [11].

Chủng MD<sub>2</sub> có hoạt tính tốt trên cả 2 bước tuyển chọn. Vì vậy, MD<sub>2</sub> được gửi định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28s tại công ty Nam Khoa. Với các bước thực hiện tách chiết DNA, thực hiện PCR với môi đặc hiệu vùng 28s. Giải trình tự trực tiếp rồi so sánh trình tự với ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information), từ đó xác định mẫu nấm thuộc loài nào. Kết quả giải trình tự gen thu được ở Hình 5.

```
>5321-S1
CCGCCAAGACGGGATTCTCACCCCTCTGTGACGGCCCGTATCCAGGGCACTTAGACGGGG
GCCGCACCCAAAGCATCCTCTGCAAATTACAATGCGGACTCCGAAGGACCCAGCTTTCAA
TTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGTTCTTTCTCC
GCTATTGATATGCTTAAGTTGAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAA
ATGGTTGAAAAACGTCCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCAT
ACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCGCGCCGCTGCCTTTCGGGCCGCTCCCGCCGGAGAGG
GGGACGGCGACCCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCA
TGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTGCGTGGCTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATC
CATTGTTGAAAGTTTAACTGATTGCATTTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGT
TCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGCGGG
CGACAAGCGGGCGGGCCCGCGGAAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGG
CCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACCGAAAACCTTGTTAC
GACTTTTACTTCTCTAAATGACCGGGTTGACCAACTTTCGGGCTCTGGGGGGTTCGTTGC
CAACCCTCTGAGCCAGTCCGAAGGCCTCACCGAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGG
CGG
```

Hình 5. Kết quả giải trình tự chi tiết mẫu MD<sub>2</sub>

Kết quả trình tự gen trên định danh từ mẫu phân lập MD<sub>2</sub> được tra cứu trên BLAST search (NCBI) có độ tương đồng là 99%, nguồn gốc phát sinh gần với loài *Aspergillus niger* có ID AM270052. Cây phát sinh loài (Hình 6) xây dựng bằng Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).



Hình 6. Cây phát sinh loài của MD<sub>2</sub> *Aspergillus niger*

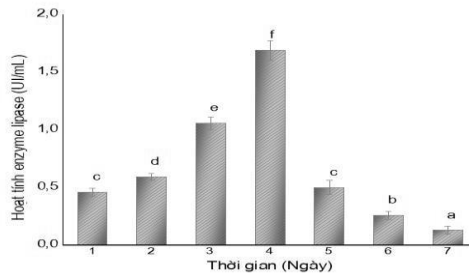
Kết quả định danh cho thấy, mẫu MD<sub>2</sub> phân lập từ mẫu dừa mốc là *Aspergillus niger* chủng có khả năng sinh lipase tốt nhất.

Nghiên cứu của Fleuri *et al.* (2014) đã phân lập được 175 chủng nấm từ các mẫu rau và trái cây mục nát, hoa, chất thải công nghiệp và nông nghiệp, đất, biển và vùng nước nóng và các sản phẩm công nghiệp hóa. Qua thử nghiệm sơ bộ, Fleuri *et al.* đã chọn được 10 chủng nấm mốc có hoạt tính enzyme lipase cao trong đó *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* và *Penicillium sp.*, cho hoạt tính lipase cao nhất [3]. Theo Mahadik *et al.* (2002), 50 chủng các loài *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Penicillium* và *Aspergillus* đã được sàng lọc, kết quả cho thấy *A.niger* là loài sản xuất lipase ngoại bào tốt nhất [17]. Kết quả của nghiên cứu này tương đối tương đồng với các nghiên cứu trước, vì vậy chủng *Aspergillus niger* được dùng để thu nhận lipase trên môi trường bán rắn cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.4. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy tới quá trình thu nhận enzyme lipase

Tiến hành nuôi cấy chủng *Aspergillus niger* trên môi trường bán rắn với thành phần cơ chất gồm 75% bánh dầu, 25% bã mía và độ ẩm môi trường 55%, ủ ở nhiệt độ phòng, thời gian nuôi cấy được theo dõi từ ngày đầu đến ngày thứ 7. Kết quả cho thấy, hoạt tính enzyme lipase có sự khác biệt khi thu nhận ở thời điểm khác nhau (Hình 7). Hoạt tính enzyme tăng dần từ ngày thứ nhất (0,46 UI/mL), cao nhất vào ngày thứ 4 (1,69 UI/mL), bắt đầu giảm mạnh từ ngày thứ 5 (0,50 UI/mL), đến ngày thứ 7 (0,13UI/mL). Điều này có thể được giải thích do nấm mốc sử dụng cơ chất trong môi trường không có bổ sung thêm khoáng để sinh trưởng, theo thời gian lượng enzyme tiết ra ngày càng tăng, khi các nguồn dinh dưỡng từ môi trường bắt đầu giảm mạnh, bào tử bắt đầu hình thành, quá trình tổng hợp enzyme yếu đi. Hoạt tính của enzyme còn phụ thuộc vào cofactor là những ion kim loại được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sự cung cấp không đủ những ion này trong tế bào chất sẽ làm giảm hoạt tính của enzyme. Khi mới tổng hợp dưới dạng tiền enzyme, không đủ cofactor để đảm bảo hoạt tính cũng như sự vận chuyển qua màng thì một lượng enzyme này bị giữ lại trong tế bào chất làm ảnh hưởng đến hiệu suất sinh tổng hợp enzyme. Sau khi được vận chuyển qua màng, enzyme ngoại bào vẫn có thể bị phân hủy bởi enzyme peptidase trong không gian chu chất [4], đó chính là một nguyên nhân giải thích cho quá trình sinh tổng hợp enzyme bị giảm theo thời gian nuôi cấy.





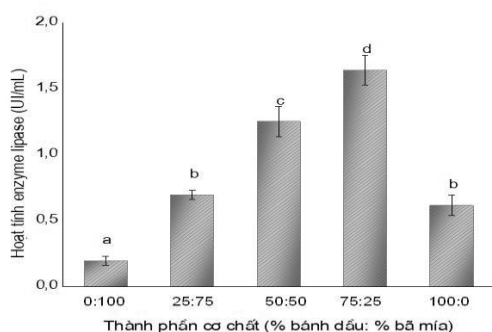
Hình 7. Biểu đồ thể hiện hoạt tính enzyme lipase theo thời gian nuôi cấy (a,b,c...: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Fleuri *et al.* (2014) và Mukhtar *et al.* (2015) nuôi cấy *Aspergillus* sp trong thời gian 4 và 3 ngày cho hoạt tính enzyme lipase tối đa tương ứng là 13 và 4,98 UI/mL [3, 18]. Roveda *et al.* (2010) đánh giá khả năng sản xuất lipase từ 21 chủng nấm thuộc chi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* và *Fusarium* được phân lập từ nước thải sữa sử dụng lên men chìm. Sau sàng lọc, 9 chủng phân lập được lựa chọn dựa trên khả năng phát triển của chúng trong môi trường chứa dầu ô liu làm cơ chất, kết quả cho thấy chủng E<sub>9</sub> (*Aspergillus*), E<sub>21</sub> (*Aspergillus*) và E<sub>20</sub> (*Penicillium*) cho hoạt tính enzyme tương ứng là 1,250, 2,042 và 2,250 UI/mL [19]. Thời gian nuôi cấy 4 ngày hoàn toàn phù hợp với các công bố trước, do vậy được xác định là tốt nhất cho sinh tổng hợp lipase bởi *Aspergillus niger* và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

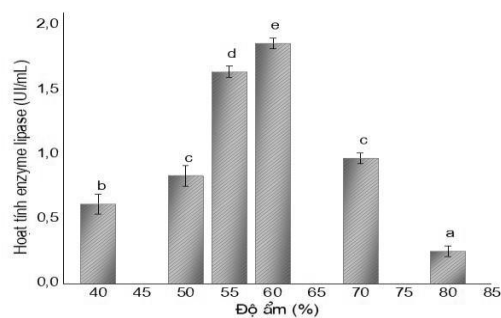
### 3.5. Ảnh hưởng thành phần cơ chất và độ ẩm môi trường đến khả năng sinh enzyme lipase

Chủng *Aspergillus niger* được nuôi cấy trên môi trường bán rắn với phần trăm cơ chất bánh dầu và bã mía được khảo sát khác nhau, độ ẩm môi trường 55%, ủ ở nhiệt độ phòng. Sau 4 ngày nuôi cấy, lipase được trích ly và xác định hoạt tính. Kết quả cho thấy, nồng độ cơ chất khác nhau có ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp lipase của *Aspergillus niger* (Hình 8). Hoạt tính tăng dần khi tăng thành phần bánh dầu từ 0 đến 75%, trong đó hoạt tính thu được cao nhất là 1,64 UI/mL. Khi cơ chất có 100% bánh dầu, hoạt tính xác định được thấp hơn (0,615 UI/mL). Trong bánh dầu đậu phộng, lipid chiếm khoảng 7,7% là chất cảm ứng để tế bào sinh tổng hợp enzyme lipase [20]. Vì vậy, khi tăng hàm lượng bánh dầu, khả năng sinh lipase để phân giải lipid càng cao. Việc phối trộn thêm bã mía nhằm mục đích tạo độ tơi xốp môi trường, khuếch tán lượng oxy thích hợp vào trong khối môi trường, giúp nấm mốc phát triển từ đó cho lượng enzyme lipase được tổng hợp nhiều hơn [3]. Với 100% bánh dầu, nấm chỉ phát triển mạnh ở mặt ngoài của khối cơ chất, bên trong khối cơ chất không thấy sự phát triển của nấm do thiếu oxy. Kết quả này giống với kết quả nghiên cứu về thành phần cơ chất tối ưu của Fleuri *et al.* (2014) trên *Aspergillus* sp. là 75% bột lúa mì: 25% bã mía, hoạt tính enzyme thu nhận là 10,82 UI/mL và 75% bột đậu nành: 25% bã mía với hoạt tính enzyme là 11,35 UI/mL [3]. Sự khác biệt về hoạt tính lipase có thể được giải thích do nguồn vi sinh vật để thu nhận lipase có thể khác nhau về đặc điểm sinh hóa. Các chủng vi sinh vật phân lập từ nước thải chứa dầu của các nhà máy có hiệu quả thủy phân nguồn cơ chất là khác nhau. Lipase thu nhận từ *A. strictum*, *Cunninghamella verticillata* có hiệu quả thủy phân (%) trên các cơ chất dầu olive, đậu tương, đậu phộng, hạt bông, hạt hướng dương tương ứng là 20, 60, 40, 90, 90 (%) và 80, 80, 90, 40, 90 (%) [2]. Qua thí nghiệm này, thành phần cơ chất 75% bánh dầu: 25% bã mía được xem là tốt nhất và được chọn để nuôi cấy *Aspergillus niger* sinh tổng hợp lipase cao nhất.

Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường tới khả năng sinh enzyme lipase được khảo sát khi nuôi *Aspergillus niger* trên môi trường bán rắn, thành phần cơ chất là 75% bánh dầu: 25% bã mía, ủ ở nhiệt độ phòng. Sau 4 ngày, hoạt tính enzyme lipase được xác định. Kết quả cho thấy sự khác nhau có ý nghĩa của các giá trị độ ẩm ( $p < 0,05\%$ ) (Hình 9).



Hình 8. Hoạt tính enzyme lipase theo thành phần cơ chất trong môi trường bán rắn  
(<sup>a,b,c...</sup>: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)



Hình 9. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường tới hoạt tính enzyme lipase

Khi nuôi cấy trên môi trường có độ ẩm 55% và 60%, hoạt tính enzyme lipase tương ứng là 1,64 và 1,86 UI/mL. Các giá trị độ ẩm thấp hơn (40%, 50%) hay cao hơn (70%, 80%) đều làm giảm hoạt tính enzyme. Độ ẩm là một yếu tố trọng đại quan trọng, có ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme lipase trong quá trình nuôi cấy. Khi nước cất được bổ sung vào môi trường, nước sẽ tập trung chủ yếu trên bề mặt hạt cơ chất, tạo điều kiện cho bào tử có thể phát triển tạo thành hệ sợi trên bề mặt canh trường. Mặt khác, lượng ẩm còn có khả năng khuếch tán vào trong hạt cơ chất, làm giảm lượng nhiệt do quá trình trao đổi chất sinh ra [6, 7]. Các môi trường có độ ẩm cao (70%, 80%) làm kết dính các hạt cơ chất trong canh trường, làm giảm sự khuếch tán không khí trong canh trường, dẫn đến lượng oxy không được cung cấp đầy đủ, tốc độ sinh trưởng giảm làm cho hoạt tính của enzyme giảm. Đối với môi trường có độ ẩm thấp (40%, 50%), các hạt cơ chất rời rạc, môi trường nuôi cấy sẽ nhanh khô, sinh trưởng giảm, làm giảm hoạt tính enzyme tạo thành [21, 22]. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Andrade Santos *et al.* (2012) trên *Aspergillus niger* khi nhận định sự tương tác giữa độ ẩm và nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính của enzyme. Theo Andrade Santos *et al.* (2012) giá trị độ ẩm tối ưu là 58-65% khi sử dụng cơ chất là hạt bí ngô [23]; theo Nguyễn Hoàng Lộc (2007), độ ẩm của môi trường 50-60% thích hợp để nấm mốc phát triển [22]; theo Kamini *et al.* (1998), tỷ lệ cơ chất và nước là 1,0:1,5 tạo độ ẩm tối ưu cho *Aspergillus niger* nuôi cấy bán rắn với bánh dầu mè và cám lúa mì [21]. Dựa vào sự phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước, môi trường có độ ẩm 60% được cho là tốt nhất cho chủng *A. niger* sinh tổng hợp lipase với cơ chất bánh dầu và bã mía.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập, tuyển chọn và định danh được chủng *Aspergillus niger* có khả năng sinh enzyme lipase có hoạt tính cao nhất từ 27 chủng nấm mốc trong tự nhiên. Quá trình nuôi cấy *A.niger* có nguồn cơ chất là phụ phẩm rẻ tiền, sử dụng phương pháp nuôi cấy và tách chiết thông dụng, kết quả đã thu được lipase thô có hoạt tính còn thấp. Vì vậy, các nghiên cứu tiếp theo về tinh sạch enzyme cần được tiến hành để tạo chế phẩm lipase thương mại có nguồn gốc nội địa.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số 108/HĐ-DCT/2017. Chân thành cảm ơn Quý thầy cô giảng viên Khoa Công nghệ Sinh học, bạn Hồ Ngọc Yến, Lê Thị Minh Ngọc 05 DSH đã giúp đỡ nhóm tác giả hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vakhlu J. - Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning, *Electronic Journal of Biotechnology* **9** (1) (2006) 69-85.
2. Gopinath S. C., Anbu P., Lakshmipriya T., Hilda A. - Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry, *Biomed Research International* **2013** (2013) 154-549.
3. Fleuri L. F., Oliveira M. C. D., Arcuri M. d. L. C., Capoville B. L., Pereira M. S., Delgado C. H. O., Novelli P. K. - Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation, *Food Science and Biotechnology* **23** (4) (2014) 1199-1205.
4. Wickner S., Maurizi M. R., Gottesman S. - Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins, *Science* **286** (5446) (1999) 1888-1893.
5. Mehta A., Bodh U., Gupta R. - Fungal lipases: a review, *Journal of Biotech Research* **8** (2017) 58-77.
6. Rosa D. R., Cammarota M. C., Freire D. M. G. - Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease, *Environmental Engineering Science* **23** (5) (2006) 814-823.
7. Diaz J. M., Rodríguez J., Roussos S., Cordova J., Abousalham A., Carriere F., Baratti J. - Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures, *Enzyme and Microbial Technology* **39** (5) (2006) 1042-1050.
8. Trần Linh Thuớc - Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, NXB Giáo Dục Việt Nam (2006) 66-69.
9. Kumar D., Kumar L., Nagar S., Raina C., Parshad R., Gupta V. K. - Isolation, production and application of lipase/esterase from *Bacillus sp.* strain DVL43, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* **2** (4) (2012) 521-528.
10. Mai Thị Hằng, Đinh Thị Kim Nhung, Vương Trọng Hào - Thực hành vi sinh vật học, NXB Đại học Sư phạm (2011) 95-97.
11. Griebeler N., Polloni A. E., Remonato D., Arbter F., Vardanega R., Cechet J. L., Luccio M. D., Oliveira D. D., Treichel H., Cansian R. L. - Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity, *Food and Bioprocess Technology* **4** (4) (2011) 578-586.
12. Kempka A. P., Lipke N. L., Pinheiro T. D. L. F., Menoncin S., Treichel H., Freire D. M., Luccio M. D., Oliveira D. D. - Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation, *Bioprocess and Biosystems Engineering* **31** (2) (2008) 119-125.
13. Gombert A. K., Pinto A. L., Castilho L. R., Freire D. M. - Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate, *Process Biochemistry* **35** (1-2) (1999) 85-90.
14. Vermelho A.B. and Couri S. - Methods to determine enzymatic activity, *Bentham Science* (2013) 161-194.
15. Aly M. M., Al-Shareef H. A.-A., Quri H. A., Al-seeni M. N. - Spore forming bacterium from oil contaminated soil as a source of a lipase enzyme with exogenous lipolytic activity, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* **12** (1) (2017) 105-114.

16. Bùi Xuân Đồng và Nguyễn Văn Huy - Vi nấm dùng trong Công nghệ Sinh học, NXB Khoa học và Kỹ thuật (2000) 11-40.
17. Mahadik N. D., Puntambekar U. S., Bastawde K. B., Khire J. M., Gokhale D. V. - Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *Process Biochemistry* **38** (5) (2002) 715-721.
18. Mukhtar H., Hanif M., Rehman A., Nawaz A., Haq I. - Studies on the lipase production by *Aspergillus niger* through solid state fermentation, *Pakistan Journal of Botany* **47** (2015) 351-354.
19. Roveda I M., Hemkemeier I M., Colla L. M. - Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation, *Food Science and Technology* **30** (1) (2010) 126-131.
20. Ghosh K. and Mandal S. - Nutritional evaluation of groundnut oil cake in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings after solid state fermentation with a tannase producing yeast, *Pichia kudriavzevii* (GU939629) isolated from fish gut, *Aquaculture Reports* **2** (2015) 82-90.
21. Kamini N., Mala J., Puvanakrishnan R. - Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake, *process Biochemistry* **33** (5) (1998) 505-511.
22. Nguyễn Hoàng Lộc - Giáo trình nhập môn Công nghệ sinh học, NXB Đại học Huế (2007) 68-76.
23. Andrade Santos R. C., Barreto Araújo K., Faria Soares C. M. and Lins de Aquino L. C. - Evaluation of temperature and moisture response surface on the lipase from pumpkin seeds fermentation using *Aspergillus niger*, *Acta Scientiarum. Technology* **34** (3) (2012) 255-260.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF LIPASE PRODUCTION FROM FUNGI ISOLATED FROM LIPID-RICH MEDIUM

Dao Thi My Linh\*, Tran Thi My Thao,  
Ly Thi Diem Trang, Le Thi My Trinh  
*Ho Chi Minh City University of Food Industry*  
\*Email: [linhdtm@cntp.edu.vn](mailto:linhdtm@cntp.edu.vn)

Lipase can be produced from fungi due to the ease in cultured conditions using semi-solid culture medium in which by-products such as nut oil cake, sugar cane bagasse, corn core can be utilized. This study was carried out to identify the fungus strains possessing the highest lipase activity from a lipid-rich medium. Preliminary screening was conducted on M1 medium to determine the colony diameter. Secondary screening was performed to evaluate the lipase activity and the excellent lipase producer was identified to be *Aspergillus niger*. The effect of moisture, cultivation time, substrate combination of nut oil cake and sugar cane bagasse at different ratio on fermentation conditions was examined. Data revealed that cultured medium with 75: 25 (w/w) nut oil cake: sugarcane bagasse resulted in highest lipase activity (1.86 UI/mL) under moisture content of 60% after 4 days.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, hydrolysis zones, lipase, nut oil cake, sugar cane bagasse, solid state fermentation.