

ẢNH HƯỞNG CỦA ION KIM LOẠI ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZIM GLUCOOXYDАЗA TỪ CHỦNG NẤM MỐC *Aspergillus niger* 9.4

NGUYỄN THÚY HƯỜNG, NGÔ TIẾN HIỀN, NGUYỄN MINH THU,
KHUẤT THỊ THỦY, ĐÀM LAM THANH, TRẦN THỊ CHÂU

1. MỞ ĐẦU

Enzim glucooxydaza (GOD) (còn gọi là β -D-glucose:oxygen 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) là enzym xúc tác cho phản ứng oxy hóa β -D-glucoza thành glucono- δ lactone và hydroperoxit khi có mặt oxy.

Trong tự nhiên glucooxydaza được tìm thấy trong các mô động vật, thân, gan trong canh trường của nấm mốc, nhất là các loài *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *P. glaucum*, *P. amagasakiense*, *P. chrysogenum*, *P. vitale* và một số loài khác [6].

Glucooxydaza là một enzym thương phẩm quan trọng được sử dụng ngày càng rộng rãi trong chế biến thực phẩm, để sản xuất axit gluconic, định lượng glucoza trong quá trình lên men và trong chuẩn đoán y học [5, 7, 8].

Glucooxydaza có thể được tổng hợp từ chủng nấm mốc *Aspergillus* bằng phương pháp lên men chìm từ nguồn cacbon là glucoza và một số chất dinh dưỡng với sự có mặt của oxy. Quá trình sinh tổng hợp enzym glucooxydaza chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố trong đó các ion kim loại đóng vai trò quan trọng quyết định năng suất của quá trình sinh tổng hợp. Trong bài báo này, ảnh hưởng của năm ion kim loại là Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} và Co^{2+} đến sinh tổng hợp GOD của chủng *Aspergillus niger* kí hiệu 9,4 đã được nghiên cứu.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

- *Chủng vi sinh vật*: Chủng *A. niger* kí hiệu 9.4 trong bộ sưu tập giống Vi sinh vật công nghiệp thực phẩm của Viện Công nghệ Thực phẩm có khả năng sinh tổng hợp GOD.

- *Môi trường giữ giống*: Giống được giữ trên môi trường thạch khoai tây ở 4°C, cấy chuyển định kỳ 2 tháng 1 lần.

- *Môi trường nhân giống*: Giống được cấy vào bình tam giác 100 ml chứa 20 ml môi trường, lắc 150 v/p/ 24 giờ, ở 30°C. Môi trường nhân giống (g/l): Glucoza 100; $NaNO_3$ 3; Cao nấm men 2; KH_2PO_4 1; KCl 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01; Nước cất 1 lít; pH 6,2 (Liu *et al.*, 2001) [4]. Thanh trùng 121°C trong 20 phút, làm nguội xuống 30°C trước khi tiếp 2 ml dịch huyền phù bào tử (7×10^5 bào tử/ml).

- *Môi trường sinh tổng hợp glucooxydaza* (Liu *et al.*, 1999) [3] (môi trường MT1) có thành phần (g/l): Glucoza 100; KH_2PO_4 0,35; ure 0,55; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15; $CaCO_3$ 3; Nước cất

1lít; pH 6,2. Bình lên men dung tích 100 ml có chứa 20ml môi trường MT1, được tiếp 10% (v/v) giống đã nuôi cấy lác 150 v/p ở 30°C trong 40 giờ.

- **Môi trường nghiên cứu ảnh hưởng của ion kim loại:** Môi trường của Liu *et al*, 1999 [3] được xử lí loại bỏ các ion kim loại bằng cách bổ sung 1,2 g/l $K_4Fe(CN)_6 \cdot 4H_2O$ + 20 ml H_2SO_4 1N để lạnh 10°C/2 ngày, li tâm 5000 v/p loại bỏ kết tủa. Thanh trùng 115°C/20 phút.

2.2. Phương pháp

- **Nghiên cứu ảnh hưởng của ion kim loại:** Thử nghiệm khảo sát ảnh hưởng của từng ion kim loại ở 5 nồng độ. Chọn khoảng nồng độ thử nghiệm từ các kết quả nghiên cứu đã công bố. Với mỗi ion kim loại thử nghiệm được tiến hành 3 lần, mỗi lần 2 mẫu lặp cho mỗi nồng độ.

- **Bố trí thí nghiệm:** Mẫu đối chứng (ĐC): Là môi trường MT1. Mẫu trắng (kí hiệu MT) là môi trường MT1 được xử lí 1,2 g/l $K_4Fe(CN)_6 \cdot 4H_2O$ + 20 ml H_2SO_4 1N để lạnh 10°C/2 ngày để loại bỏ các ion kim loại có sẵn. Sau khi xử lí, hàm lượng các ion kim loại được phân tích nhằm hiệu chỉnh nồng độ của các ion kim loại đưa vào thử nghiệm. Bổ sung vào môi trường mẫu trắng hàm lượng các ion kim loại với các nồng độ theo bảng 1.

Bảng 1. Nồng độ của ion kim loại và hợp chất dùng trong nghiên cứu

Nồng độ ion kim loại (g/l)					Nồng độ hợp chất chứa ion kim loại (g/l)				
Fe ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	FeSO ₄	CuSO ₄	ZnSO ₄	MnSO ₄	CoCl ₂
0,004	0,004	0,005	0,010	0,005	0,011	0,010	0,012	0,027	0,011
0,008	0,008	0,007	0,020	0,010	0,022	0,020	0,017	0,055	0,022
0,012	0,012	0,009	0,030	0,015	0,033	0,030	0,022	0,082	0,033
0,016	0,016	0,011	0,040	0,020	0,044	0,040	0,027	0,110	0,044
0,020	0,020	0,013	0,050	0,025	0,054	0,050	0,032	0,137	0,055

- **Thu hồi sinh khối:** Sau lên men sinh khối sợi nấm được thu hồi bằng phương pháp lọc chân không. Rửa 3 lần bằng nước muối vô trùng.

- **Thu nhận dịch enzym thô:** Sinh khối sợi nấm thu được sau lọc được phá vỡ bằng siêu âm (thiết bị sonopuls HD 2200, của hãng Bandelin - Đức) tần số 80 kHz trong 30 giây nhiệt độ 4°C kết hợp với bi thủy tinh [6]. Sau đó thu hồi dịch enzym bằng cách ly tâm ở chế độ 10,000 v/p ở 4°C trong 10 phút. Dịch trong, màu vàng phía trên là enzym thô và được dùng để xác định hoạt tính enzym GOD.

- **Phương pháp phân tích:** Hoạt lực enzym glucooxydaza được xác định theo phương pháp sử dụng bộ KIT xác định hoạt tính GOD của hãng Megazyme (Ireland).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích hàm lượng các ion kim loại của mẫu đối chứng và mẫu trắng

Mẫu đối chứng và mẫu trắng được phân tích hàm lượng các ion kim loại bằng phương pháp của JAS-SOP – 45 và AOAC 986.15. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Thành phần ion kim loại trong mẫu đối chứng và mẫu trắng

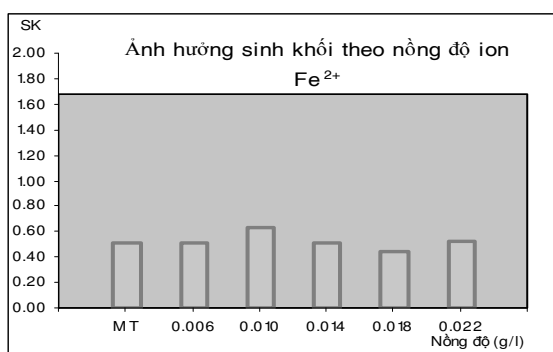
Ion kim loại (ppm)	Mẫu đối chứng (không xử lí)	Mẫu trắng xử lí $K_4Fe(CN)_6.4H_2O$
Fe^{2+}	0,0025	0,002
Cu^{2+}	0,0016	0,001
Zn^{2+}	KPH	KPH
Mn^{2+}	KPH	KPH
Co^{2+}	KPH	KPH

Ghi chú: KPH là không phát hiện.

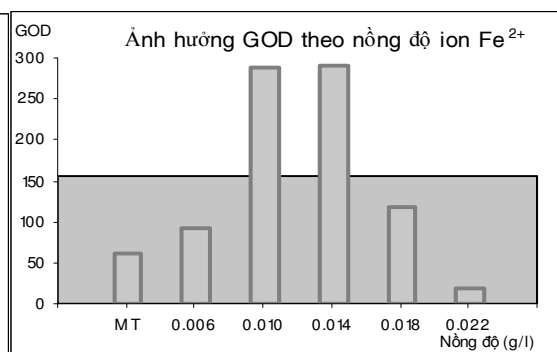
3.2. Ảnh hưởng của ion sắt đến sinh tổng hợp GOD

Bảng 3. Ảnh hưởng của ion Fe^{2+} đến sinh khối và hoạt tính GOD của *A. niger* 9.4

STT	Kí hiệu	Nồng độ thực (g/l)	Sinh khối (g / 20 ml)	GOD nội bào (U/gSK)
1	ĐC (môi trường không xử lí)	0,0025	1,68 ± 0,10	157,07 ± 18,13
2	MT (môi trường sau xử lí)	0,002	0,51 ± 0,04	60,34 ± 2,84
3	C1	0,006	0,51 ± 0,00	152,78 ± 0,25
4	C2	0,010	0,63 ± 0,00	288,05 ± 0,25
5	C3	0,014	0,52 ± 0,00	290,77 ± 0,25
6	C4	0,018	0,45 ± 0,00	118,70 ± 0,25
7	C5	0,022	0,52 ± 0,00	18,56 ± 0,25



Hình 1. Ảnh hưởng của Fe^{2+} đến sự tạo thành sinh khối của *A. niger* 9.4



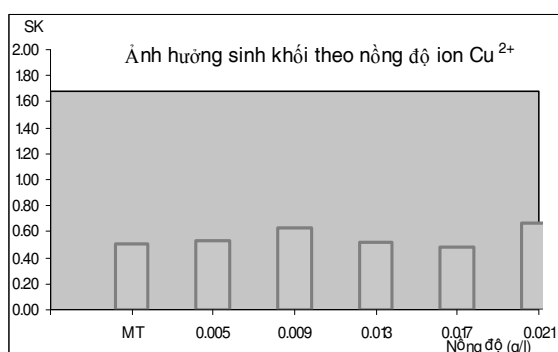
Hình 2. Ảnh hưởng của Fe^{2+} đến sinh tổng hợp GOD của *A. niger* 9.4

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của ion Fe^{2+} với các nồng độ khác nhau cho thấy: Nồng độ ion Fe^{2+} ảnh hưởng không đáng kể đến sự sinh trưởng của chủng nấm 9.4 và sinh khối thu được thấp hơn so với mẫu đối chứng (hình 1, phần nền là mẫu ĐC, các cột là mẫu trắng và mẫu thí nghiệm). Tuy nhiên, nồng độ ion Fe^{2+} ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính enzym GOD của chủng nấm 9.4. Kết quả thử nghiệm cho thấy, khi tăng nồng độ ion Fe^{2+} cao hơn nồng độ có sẵn trong môi trường nghiên cứu (MT không xử lí) hoạt tính enzym GOD của chủng nấm 9.4 tăng, và hoạt tính enzym GOD bắt đầu giảm từ nồng độ thử nghiệm 0,018 g/l. Tiến hành khảo sát mức độ ảnh hưởng ở khoảng nồng độ từ 0,006 - 0,018 g/l để tìm ngưỡng nồng độ ion Fe^{2+} cho kết quả GOD tối ưu cho thấy: ở nồng độ ion Fe^{2+} là 0,015 g/l chủng nấm 9.4 cho hoạt tính GOD cao nhất (kết quả này không trình bày ở đây)

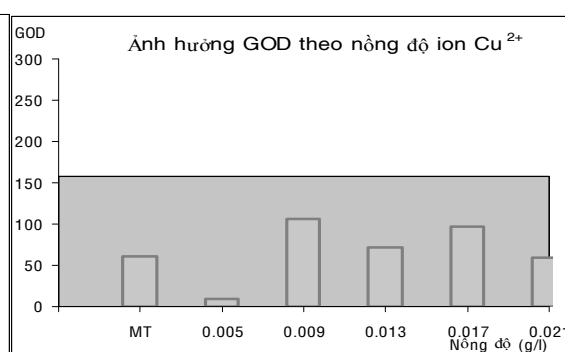
3.3. Ảnh hưởng của ion đồng đến sinh tổng hợp GOD

Bảng 4. Ảnh hưởng của ion Cu^{2+} đến sinh khối và hoạt tính GOD của *A. niger* 9.4

STT	Kí hiệu	Nồng độ thực (g/l)	Sinh khối (g / 20 ml)	GOD nội bào (U/g SK)
1	ĐC (môi trường không xử lí)	0,0016	1,68 ± 0,10	157,07 ± 0,00
2	MT (môi trường sau xử lí)	0,001	0,51 ± 0,04	60,34 ± 2,84
3	C1	0,005	0,54 ± 0,03	8,66 ± 0,09
4	C2	0,009	0,63 ± 0,03	105,92 ± 0,09
5	C3	0,013	0,52 ± 0,03	96,34 ± 0,09
6	C4	0,017	0,48 ± 0,03	96,34 ± 0,09
7	C5	0,021	0,67 ± 0,03	58,94 ± 0,09



Hình 3. Ảnh hưởng của ion Cu^{2+} đến sự tạo thành sinh khối chủng *A. niger* 9.4

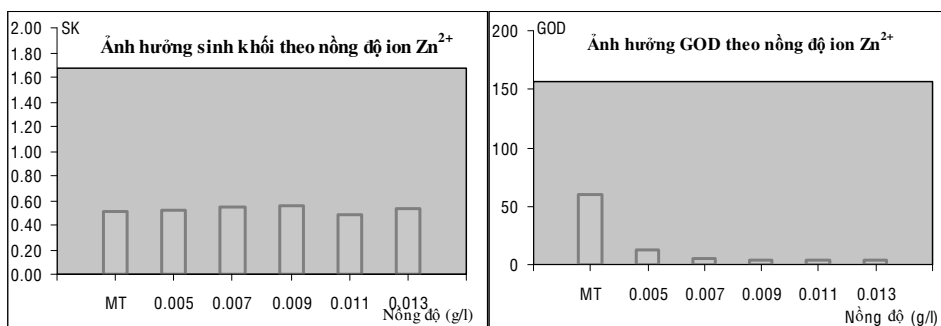


Hình 4. Ảnh hưởng của ion Cu^{2+} đến sinh tổng hợp GOD chủng *A. niger* 9.4

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của ion Cu^{2+} với các nồng độ khác nhau cho thấy: Nồng độ ion Cu^{2+} có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp enzym GOD của chủng 9.4 (hình 3, 4). Sinh khối thu được và hoạt tính enzym thấp hơn so với mẫu đối chứng (môi trường MT1 không xử lí). Vì vậy, cần phải loại đồng khỏi môi trường sinh tổng hợp GOD.

3.4. Ảnh hưởng của ion kẽm đến sinh tổng hợp GOD

Ảnh hưởng của ion Zn^{2+} đến sinh trưởng và sinh tổng hợp GOD của chủng 9.4 được khảo sát. Nồng độ ion Zn^{2+} gần như không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chủng 9.4 và sinh khối thu được thấp hơn so với mẫu đối chứng (MT1- không xử lí) (hình 5). Nồng độ ion Zn^{2+} có ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính enzym GOD của chủng 9.4. Kết quả thử nghiệm ở các nồng độ đều cho hoạt tính GOD thấp hơn rất nhiều so với mẫu đối chứng (MT1- không xử lí) (hình 6). Vì vậy, cần loại ion Zn^{2+} khỏi môi trường tổng hợp GOD.

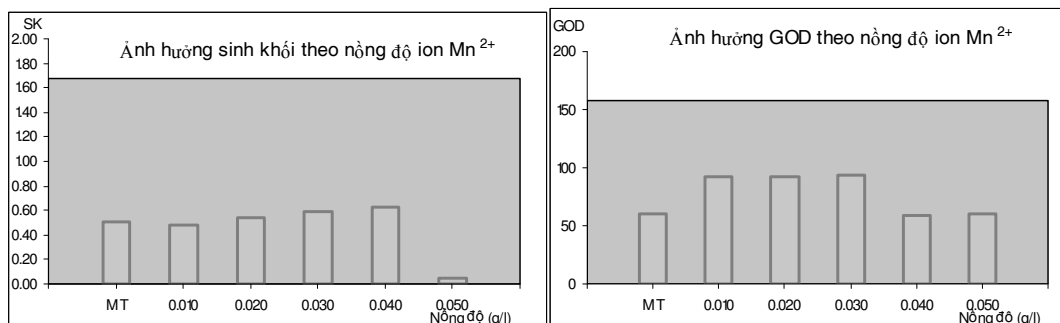


Hình 5. Ảnh hưởng của Zn^{2+} đến sinh khối của chủng 9.4

Hình 6. Ảnh hưởng của Zn^{2+} đến hoạt tính GOD của chủng 9.4

3.5. Ảnh hưởng của ion mangan đến sinh tổng hợp GOD

Khảo sát ảnh hưởng của ion Mn^{2+} với các nồng độ khác nhau cho thấy: Nồng độ ion Mn^{2+} ảnh hưởng không đáng kể đến sự sinh trưởng của chủng 9.4. Trong khoảng nồng độ từ 0,01 - 0,04 g/l sinh khối tăng và tại nồng độ 0,05 g/l sinh khối giảm mạnh. Mẫu xử lí ion kim loại cho kết quả sinh khối thu được thấp hơn so với mẫu đối chứng (MT1- không xử lí) (hình 7). Kết quả thử nghiệm ở các nồng độ đều cho hoạt tính GOD thấp hơn so với mẫu đối chứng (MT1 - không xử lí) (hình 8). Vì vậy, không bổ sung ion Mn^{2+} vào môi trường tổng hợp GOD.

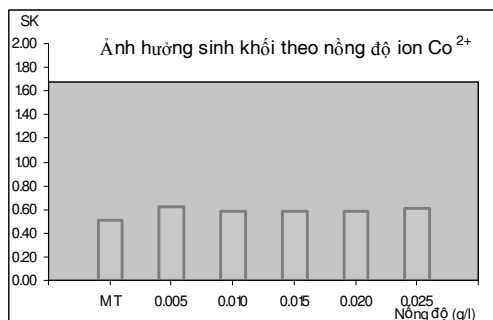


Hình 7. Ảnh hưởng của Mn^{2+} đến sinh khối của chủng 9.4

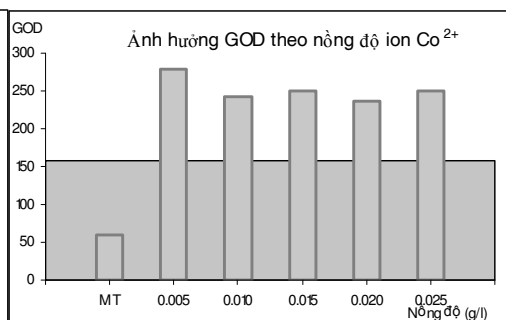
Hình 8. Ảnh hưởng của Mn^{2+} đến hoạt tính GOD của chủng 9.4

3.6. Nghiên cứu ảnh hưởng của ion coban đến sinh tổng hợp GOD

Nghiên cứu ảnh hưởng của ion Co^{2+} tới sinh trưởng và sinh tổng hợp enzym GOD của chủng 9.4 được khảo sát trên khoảng nồng độ từ 0.005 - 0.025 g/l. Kết quả cho thấy: Nồng độ ion Co^{2+} ảnh hưởng không đáng kể đến sự sinh trưởng của chủng 9.4 và sinh khối thu được thấp hơn so với mẫu đối chứng (MT1 - không xử lý). Sự có mặt của ion Co^{2+} làm tăng khả năng sinh enzym GOD của chủng 9.4 và kết quả thử nghiệm ở khoảng nồng độ từ 0,005 - 0,025 g/l đều cho hoạt tính GOD cao hơn so với mẫu đối chứng (MT1 - không xử lý) và cao gấp 3 lần so với mẫu trắng.



Hình 9. Ảnh hưởng của Co^{2+} đến sinh khối của chủng 9.4



Hình 10. Ảnh hưởng của Co^{2+} đến hoạt tính GOD của chủng 9.4

3.7. Tối ưu hóa thành phần các ion kim loại

Từ những kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng các ion kim loại đến quá trình sinh trưởng và sinh enzyme GOD của chủng 9.4, ion Fe^{2+} và ion Co^{2+} được bổ sung vào MT1 như là những thành phần vi lượng, làm gia tăng hoạt tính GOD. Theo kết quả tính toán, hoạt tính GOD được cho là tối ưu ở nồng độ ion $\text{Fe}^{2+} = 0,015 \text{ g/l}$ và $\text{Co}^{2+} = 0,013 \text{ g/l}$. Nghiên cứu này nhằm xác định nồng độ tổ hợp ion Fe^{2+} và Co^{2+} trong môi trường lên men MT1 để có GOD cao nhất. Thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp: "Đường leo dốc" (Box Wilson) là phương pháp bố trí thí nghiệm nhiều yếu tố trong đó cho phép phân tích hồi quy bằng biến số mã hóa và thực hiện các loạt thí nghiệm theo phương pháp "tìm kiếm leo dốc" để tìm cực trị của hàm mục tiêu.

Bước 1. Chọn các mức của biến số mã hóa, dựa vào kết quả phân tích ảnh hưởng của Fe^{2+} và Co^{2+}

Bảng 5. Các mức quy hoạch 2^2 và kết quả GOD

MT	Biến số thực		Biến số mã hóa			Y (GOD)			
	Fe^{2+}	Co^{2+}	X0	X1	X2	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Y_{TB}
1	0,012	0,008	1	-1	-1	313,24	314,50	319,72	315,82
2	0,022	0,008	1	1	-1	364,11	378,10	397,36	379,86
3	0,012	0,018	1	-1	1	452,04	453,33	451,08	452,15
4	0,022	0,018	1	1	1	285,35	326,04	312,58	307,99
5	0,015	0,013	1	0	0	436,78	452,28	431,3	440,12
6	0,015	0,013	1	0	0	437,89	423,29	422,37	427,85
7	0,015	0,013	1	0	0	434,82	450,32	419,34	434,83

Hiện tại hoạt tính GOD được cho là tối ưu ở nồng độ ion: $Fe^{2+} = X1 = 0,015$; $\Delta = 0,005$ g/l
 $Co^{2+} = X2 = 0,013$; $\Delta = 0,005$ g/l.

Tại mỗi mức thử nghiệm, tiến hành thí nghiệm 3 lần.

Bước 2. Tính phương trình hồi quy tuyến tính, lập bảng ma trận

	X0	X ₁	X2	Ma trận đảo			Y1	Y2	Y3	YTB
X0	7	0	0	1/7	0	0	2724,2 3	2797,86	2753,75	2758,61
X1	0	4	0	0	1/4	0	-115,82	-63,69	-60,86	-80,12
X2	0	0	4	0	0	1/4	60,04	86,77	46,58	64,46

Ta có phương trình hồi quy: $Y = b_0 + b_1 \cdot X1 + b_2 \cdot X2$ có các hệ số và độ lệch chuẩn như sau

Hệ số	Độ lệch chuẩn
$b_0 = 394,088$	$S_{b_0} = 4,856$
$b_1 = -20,031$	$S_{b_1} = 6,424$
$b_2 = 16,116$	$S_{b_2} = 6,424$

Sử dụng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) một yếu tố để xem xét b_0 ; b_1 ; b_2 có ý nghĩa không. Kết quả cho thấy phương trình bậc nhất đã phù hợp.

Bước 3: Xác định hướng leo dốc

Đường leo dốc là đường thẳng góc với đường đồng mức của phương trình:

$$Y = 394,088 - 20,031 \cdot X1 + 16,116 \cdot X2.$$

Phương trình có nghĩa: Thay đổi -20,03 đơn vị nồng độ ion Fe^{2+} (g/l) đồng thời với thay đổi +16,12 đơn vị nồng độ ion Co^{2+} (g/l). Hoặc thay đổi giảm 1,24 đơn vị nồng độ ion Fe^{2+} (g/l) đồng thời với thay đổi tăng 1,00 đơn vị nồng độ ion Co^{2+} (g/l).

Thí nghiệm leo dốc

Tiếp tục thực hiện các mức thí nghiệm mới. Kết quả thí nghiệm lần 8 cho kết quả GOD cao hơn điểm giữa. Đến lần 9, kết quả GOD giảm. Như vậy, thí nghiệm 8 cho kết quả cao nhất, Y(GOD) nằm đâu đó xung quanh điểm này.

Lần		Biến mã hóa		Biến thực		Kết quả
		X1	X2	Fe^{2+}	Co^{2+}	Y(GOD)
5, 6, 7	Điểm giữa	0	0	0,015	0,013	434,27
8	Các điểm trên đường leo dốc	-1,24	1,00	0,011	0,018	567,83
9		-2,49	2,00	0,005	0,023	181,14

Thí nghiệm tiếp

MT	Biến số thực		Biến số mã hóa			Y (GOD)
	Fe ²⁺	Co ²⁺	X0	X1	X2	
10	0,010	0,017	1	-1	-1	492,47
11	0,012	0,017	1	1	-1	427,86
12	0,010	0,019	1	-1	1	609,41
13	0,012	0,019	1	1	1	497,44
14	0,011	0,018	1	0	0	546,83
15	0,011	0,018	1	0	0	526,52
16	0,011	0,018	1	0	0	534,81

Quy hoạch thử nghiệm mới, với điểm giữa là điểm 8 ở thí nghiệm trên.

Biến số mã hóa: Fe²⁺ = X1 = 0,011 Delta = 0,001 g/l

Co²⁺ = X2 = 0,018 Delta = 0,001 g/l

Các mức quy hoạch 2² và kết quả GOD. Phân tích hồi quy cho các lần thí nghiệm này:

Lập bảng ma trận

	0	X1	X2	X3	Ma trận đảo			Y
0	X0	7	0	0	1/7	0	0	3635,34
1	X1	0	4	0	0	1/4	0	-176,58
2	X2	0	0	4	0	0	1/4	186,52

Ta có phương trình hồi quy: $Y = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2$ có các hệ số và độ lệch chuẩn như sau :

Hệ số	Độ lệch chuẩn
b ₀ = 519,334	S _{b0} = 8,938
b ₁ = - 44,145	S _{b1} = 11,824
b ₂ = 46,630	S _{b2} = 11,824

Sử dụng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) một yếu tố để xem xét b₀; b₁; b₂ có ý nghĩa không. Kết quả cho thấy phương trình bậc nhất đã phù hợp.

Đường leo dốc là đường thẳng góc với đường đồng mức của phương trình:

$$Y = 519,334 - 44,145 \cdot X_1 + 46,630 \cdot X_2.$$

Từ phương trình trên, có nghĩa thay đổi - 44,15 đơn vị nồng độ ion Fe^{2+} (g/l) đồng thời với thay đổi + 46,63 đơn vị nồng độ ion Co^{2+} (g/l). Hoặc thay đổi giảm 0,95 đơn vị nồng độ ion Fe^{2+} (g/l) đồng thời với thay đổi tăng 1,00 đơn vị nồng độ ion Co^{2+} (g/l).

Như vậy, trong hàng loạt thí nghiệm trên, tại mức nồng độ $\text{Fe}^{2+} = 0,010$ g/l và $\text{Co}^{2+} = 0,019$ g/l có khả năng cho hoạt tính GOD cao nhất.

Dùng leo dốc, thí nghiệm kiểm chứng

Bảng 6. Kết quả kiểm chứng với nồng độ ion Fe và Co tối ưu

TT	Nồng độ Fe^{2+}	Nồng độ Co^{2+}	Hoạt tính GOD (U/g SK)
1	0,010	0,019	597,68
2	0,010	0,019	612,42
3	0,010	0,019	600,73

Thử nghiệm kiểm chứng cho kết quả GOD cao và ổn định. MT1 bổ sung ion Fe^{2+} và Co^{2+} với hàm lượng ion Fe^{2+} 0,010 g/l và Co^{2+} 0,019 g/l, tương ứng $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0,027$ g/l và $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 0,042$ g/l, có môi trường sinh tổng hợp GOD mới (môi trường MT2) như sau (g/l): Glucoza 100; KH_2PO_4 0,35; Ure 0,55; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,15; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,027; CoCl_2 0,042; CaCO_3 3,0; Nước cất 1lít; pH 6,2.

4. KẾT LUẬN

Các ion kim loại có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh tổng hợp enzym GOD của chủng *A. niger* 9.4. Ion Zn^{2+} mặc dù cho sinh khối cao nhất nhưng hoạt độ GOD lại rất thấp. Các ion Fe^{2+} và Co^{2+} ảnh hưởng tích cực đến sinh tổng hợp GOD. Việc bổ sung đồng thời hai ion Fe^{2+} và Co^{2+} với hàm lượng: FeSO_4 (0,027 g/l), CoCl_2 (0,042 g/l) vào môi trường lên men cho hoạt tính GOD cao hơn hẳn so với các mẫu bổ sung đơn lẻ từng ion (hoạt độ GOD chỉ đạt cao nhất là 290,77 U/g đối với Fe^{2+} và 278,4 U/g đối với Co^{2+}). Bằng phương pháp quy hoạch toán học thực nghiệm Box Wilson đã tìm được thành phần ion kim loại tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp GOD của chủng *A. niger* 9.4 là FeSO_4 0.027 g/l và CoCl_2 0.042 g/l, hoạt tính enzym GOD đạt 612.42 U/g sinh khối.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hatzinikolaou D. G. and Macris B. J. - Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*, *Enzyme and Microbiology Technology* (1995) 530-534
- Lu T., Peng X., Yang H, and Ji L. - The production of glucose oxidase using the waste myceliums of *A. niger* and the effect of metal ion on the activity of glucose oxidase, *Enzyme Microb. Technology* **19** (1996) 339-342.
- Liu J. Z., Yang H. Y., Weng L. P, and Ji L. N. - Synthesis of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus. niger* in resting cell culture system, *Letter in Applied Microbiology* **29** (5) (1999) 337-341.

4. Liu J. Z., Huang Y. Y., Liu J., Weng L. P., and Ji L. N. - Effects of metal ions on simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger*, Letters in Applied Microbiology **32** (2001) 16-19,
5. Pickering G. J. - The production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. PhD. Thesis, Lincoln University, New Zealand, 1997.
6. Kristensen S. R. - Mechanisms of cell damage and enzyme release, Department of Clinical Chemistry, Odense University Hospital. **41** (4) (1994) 423-33.
7. Pickering G. J. - The use of enzymes to stabilise colour and flavour in wine, Australian Grapegrower & Winemaker, 1998, 417 p.
8. Pickering G. J. - The use of glucose oxidase in winemaking. Proceeding of the 1st EILoenology and Viticulture Seminar Series, Eastern. Eastern Institute of technology. New Zealand G. J. Pickering (ed). Campus Press, New Zealand, 2000, pp. 11-21.

SUMMARY

EFFECT OF SOME CATIONS ON THE GLUCOSE OXYDASE BIOSYNTHESIS

OF *Aspergillus niger* 9.4

The **glucose oxydase** enzyme (GOx) (EC 1.1.3.4) binds to beta-D-glucopyranose (a hemiacetal form of the six-carbon sugar glucose) and aids in breaking the sugar down into its metabolites. GOx is a dimeric protein that catalyzes the oxidation of beta-D-glucose into D-glucono – 1,5- lactone (which then hydrolyzes to gluconic acid) using molecular oxygen and releasing hydrogen peroxide. GOx can be used in the removal of either glucose or oxygen from foodstuffs in order to improve their storage capability.

GOx can be biosynthesized by fungi *Aspergillus niger* and *Penicillium*. The effect of various cations, such as Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ and Co²⁺ on the simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger* 9.4 were investigated. Among the five cations, Zn²⁺ caused negative effect on GOx biosynthesis, two ions Fe²⁺ and Co²⁺ had positive influences on GOx biosynthetic process. The mutual influences between Fe²⁺ and Co²⁺ on GOx synthesis were also studied according to applied mathematic plan of Box –Wilson. In the medium, which was added FeSO₄ (0.027 g/l) and CoCl₂ (0.042 g/l) GOD enzyme activity (612.42 U/gr of biomass) was much higher than the sample with individual ion Fe²⁺ or Co²⁺ (maximum of GOD enzyme activity reached 290.77U/gr and 278.4 U/g).

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 12 tháng 6 năm 2009

Viện Công nghệ Thực phẩm, 301 Thanh Xuân, Hà Nội.