

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH CHỦNG *ASPERGILLUS BRUNNEOVIOLOACEUS* FEC 156 SINH TỔNG HỢP HỆ ENZYME THỦY PHÂN XYLAN

Đặng Tất Thành¹, Nguyễn Thanh Thủy¹, Vũ Nguyễn Thành¹,
George E. Anasontzis², Lisbeth Olsson²

¹Viện Công nghiệp Thực phẩm, 301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Đại học Công nghệ Chalmers, SE-41296 Gothenburg, Thụy Điển

*Email: thanh@firi.ac.vn

Đến Tòa soạn: 15/8/2016; Chấp nhận đăng: 7/10/2016

TÓM TẮT

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới với hệ vi sinh vật phong phú và hứa hẹn mang lại những ứng dụng vô cùng đa dạng. Nghiên cứu này tập trung tìm kiếm các chủng nấm mốc mới có khả năng sinh hệ enzyme thủy phân xylan một cách hiệu quả nhằm khai thác ứng dụng trong sản xuất thức ăn chăn nuôi và cồn nhiên liệu. Thông qua việc sàng lọc 164 chủng nấm mốc phân lập từ 82 mẫu đất từ các tỉnh, thành phố khác nhau ở Việt Nam, đã lựa chọn được chủng FEC 156 có khả năng sinh tổng hợp hệ enzyme thủy phân xylan đa dạng với hoạt độ cao (endo- β -1,4-xylanase 187,1 IU/ml; α -glucuronidase 48,5 IU/ml; acetyl esterase 353,4 IU/ml) khi sử dụng 2 % cơ chất cám mì trong quá trình lên men ở 30 °C, lắc 150 vòng/phút. FEC 156 được định danh là *Aspergillus brunneoviolaceus* dựa trên đặc điểm hình thái kết hợp với giải trình tự ITS. Động học lên men trên các cơ chất khác nhau cho thấy *A. brunneoviolaceus* FEC 156 có khả năng tổng hợp xylanase tốt nhất trên cơ chất cám mì (46,1 IU/ml), sau đó là gỗ bạch dương (28,2 IU/ml), và cuối cùng là avicel (4,4 IU/ml). Hoạt tính enzyme xylanase đạt cực đại sau 8 ngày lên men đối với cơ chất cám mì, 9 ngày với cơ chất gỗ bạch dương và 3 ngày với cơ chất avicel. Kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy *A. brunneoviolaceus* FEC 156 là chủng có tiềm năng và cần được nghiên cứu sâu hơn.

Từ khóa: phân lập, *Aspergillus brunneoviolaceus*, endo- β -1,4-xylanase, acetyl esterase, α -glucuronidase.

1. MỞ ĐẦU

Xylan là thành phần cấu trúc quan trọng của thành tế bào thực vật và là loại polysaccharide phổ biến thứ 2 trong tự nhiên. Xylan là thành phần chính của hemicellulose (bao gồm xylan, xyloglucan, glucomannan, galactoglucomannan, arabinogalactan). Với bản chất là một polymer phức hợp, phân nhánh, cấu trúc của xylan thay đổi đối với tùy loại thực vật. Mạch chính từ các đơn vị 1,4- β -D-xylopyranosyl có thể được thay thế bằng các nhóm nhánh glucuronopyranosyl, 4-O-methyl-D-glucuronopyranosyl, α -L-arabinofuranosyl, acetyl, feruloyl và/hoặc *p*-coumaroyl.

Do tính chất không đồng nhất và phức tạp của xylan, để phân hủy hoàn toàn xylan cần có sự tương tác của khá nhiều loại enzyme. Endo-1,4- β -D-xylanase phân cắt ngẫu nhiên mạch chính xylan, β -D-xylosidase cắt xylose ra khỏi đầu không khử của xylo-oligosaccharide và xylobiose. Việc phân cắt các nhóm mạch nhánh đảm nhiệm bởi các enzyme α -L-arabinofuranosidase, α -D-glucuronidase, acetylxyylan esterase, ferulic acid esterase và *p*-coumaric acid esterase.

Từ lâu, xylanase đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Trong công nghiệp thực phẩm, xylanase được ứng dụng trong sản xuất bánh mì, nước hoa quả, rượu vang, bia, và trong sản xuất đường xylose. Trong công nghiệp giấy, xylanase hỗ trợ quá trình tẩy trắng bột giấy thay vì sử dụng các hóa chất độc hại. Trong chăn nuôi, xylanase được bổ sung vào thức ăn nhằm giảm độ nhớt và tăng khả năng tiêu hóa và hấp thu dinh dưỡng của vật nuôi. Việc kết hợp các enzyme giúp cải thiện tiêu hóa hiệu quả hơn so với enzyme đơn lẻ. Nsereko *et al.* [1] đã bổ sung kết hợp xylanase và glucanase vào khẩu phần ăn của bò sữa. Tương tự như vậy, Olukosi *et al.* [2] đã thử nghiệm kết hợp xylanase, amylase, protease và phytase trong chăn nuôi gà giò. Một nghiên cứu khác cũng cho thấy sự kết hợp XAP (xylanase, amylase, và protease) và phytase giúp cải thiện hiệu quả chăn nuôi [3].

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới với hệ vi sinh vật phong phú và hứa hẹn mang lại những ứng dụng vô cùng đa dạng. Mục đích của nghiên cứu này là tìm kiếm và phân tích đặc tính nấm mốc có khả năng sinh hệ enzyme thủy phân xylan làm tiền đề cho các nghiên cứu sản xuất các chế phẩm enzyme ứng dụng trong sản xuất thức ăn chăn nuôi và còn nhiên liệu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập nấm mốc

Mẫu phân lập là các mẫu đất có chứa gỗ mục, xác thực vật đã bị phân hủy hoặc rác thải ở các nhà máy giấy, các bãi rác sinh hoạt, các khu vườn tại Hà Nội, Bắc Giang, Bắc Ninh, Hải Phòng, Nghệ An... Các mẫu này được đựng trong túi nilon riêng biệt, sau đó mang về phòng thí nghiệm và bảo quản ở nhiệt độ 4 °C. Mẫu được pha loãng bằng dung dịch muối NaCl 0,9 % và phân lập trên môi trường Czapeck cơ bản ((NH₄)₂SO₄ 2,0 g/l; K₂HPO₄.3H₂O 1,0 g/l; KCl 0,5 g/l; MgSO₄.7H₂O 0,5 g/l; FeSO₄.7H₂O 0,01 g/l; glucose 20 g/l), sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 30 °C trong vòng 2 đến 7 ngày. Chúng nấm mốc thuần được cấy giữ trong ống PDA thạch nghiêng và bảo quản ở 4 °C.

2.2. Xác định hoạt tính xylanase

Hoạt tính xylanase của dịch nuôi cấy được xác định bằng phương pháp DNS, thông qua hàm lượng đường khử được tạo ra từ birchwood xylan (X0502, Sigma-Aldrich) dưới tác dụng của enzyme. Để xác định hoạt tính enzyme, 100 μ l dịch enzyme được nhỏ vào ống Eppendorf chứa 200 μ l cơ chất xylan nồng độ 1 %. Các ống được ủ ở 50 °C trong 60 phút. Tiếp theo, 600 μ l dung dịch DNS (Merk, Đức) được bổ sung và ủ ở 100 °C trong 5 phút. Chuyển 200 μ l hỗn hợp phản ứng vào cuvet có chứa 900 μ l nước cất và đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm (Spectro SC, Labo Med (Mỹ)). Một đơn vị hoạt tính xylanase (IU/ml) là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μ mol D-xylose trong một phút ở điều kiện thí nghiệm.

2.3. Xác định hoạt tính α -glucuronidase

Hoạt tính α -glucuronidase được xác định bằng kit K-AGLUA của Megazyme. Theo đó, α -D-glucuronidase thủy phân axit Aldouronic và giải phóng D-glucuronic acid. D-glucuronic acid

được oxi hóa bởi enzyme uronate dehydrogenase (UDH) với sự có mặt của NAD^+ và tạo ra NADH. Lượng NADH hình thành tỉ lệ thuận với lượng D-glucuronic acid tự do. Phản ứng được thực hiện trong 10 phút ở 25 °C, pH 6,0. Nồng độ NADH được xác định ở bước sóng 340 nm. Một đơn vị hoạt độ enzyme (IU/ml) là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μmol NADH trong một phút ở điều kiện thí nghiệm.

2.4. Xác định hoạt tính acetyl esterase

Hoạt tính acetyl esterase được xác định bằng cách đo lượng ρ -nitrophenol tạo ra từ ρ -nitrophenyl acetate sau khi ủ với enzyme. Phản ứng được thực hiện ở 40°C trong 1 h. Lượng ρ -nitrophenol sau đó đo ở bước sóng 410 nm. ρ -Nitrophenol được tính toán dựa trên đường chuẩn, trong cùng một loại đệm. Một đơn vị hoạt độ enzyme (IU/ml) là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μmol ρ -nitrophenol trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm.

2.5. Xác định hoạt tính endo-1,4- β -xylanase

Hoạt tính endo-1,4- β -xylanase được xác định bằng kit S-AXBL&S-AXBP của Megazyme. Để thực hiện phản ứng, 50 μl mẫu đã pha loãng bằng đệm phosphate natri 100 mM, pH 6,0 được trộn với 50 μl dung dịch cơ chất 1 % trong ống Eppendorf. Phản ứng được thực hiện ở 40 °C trong 10 phút. Để dừng phản ứng, 250 μl ethanol (95 % v/v) được bổ sung và trộn đều. Các ống được để yên trong 5 phút, sau đó li tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ cặn và đo độ hấp thụ ở bước sóng 590 nm. Một đơn vị hoạt độ enzyme (IU/ml) là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μmol D-xylose trong một phút ở điều kiện thí nghiệm.

2.7. Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định bằng kit Bradford (Bio-Rad), sử dụng albumin huyết thanh bò làm đường chuẩn. Thuốc thử được tạo ra bằng cách pha loãng 1 phần Dye Reagent Concentrate với 4 phần nước cất và lọc qua màng Whatman #1. Sau đó, 10 μl mẫu được tra vào giếng vi đĩa và thêm 200 μl thuốc thử vào từng giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng ít nhất 5 phút, sau đó đo độ hấp thụ ở bước sóng 595 nm.

2.8. Động học lên men trên các cơ chất khác nhau

Chủng FEC 156 được nuôi cấy trong các bình lên men tự động (Bioreactors, INFORS HT) chứa 1,5 lít môi trường Mandel với 2 % cơ chất khác nhau (avicel, cám mì, gỗ bạch dương) ở 30 °C và pH duy trì ở giá trị 6,0. Mẫu được lấy định kỳ 24 giờ một lần để xác định hoạt độ enzyme và hàm lượng protein. Số liệu phân tích là kết quả trung bình của 3 bình lên men.

2.9. Xác định hình thái nấm mốc

Nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch PDA ở 30 °C. Hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học (Eclipse E-600; Nikon) và chụp ảnh bằng CMOS camera DFK 61AUC02 sử dụng phần mềm IC Capture AS của The Imaging Source (Đức) ở chế độ chồng 8 khung nhằm giảm nhiễu.

2.10. Định danh vi sinh vật bằng giải trình tự đoạn ITS

Phân đoạn ITS1-5.8S-ITS2 của nấm mốc FEC 156 được khuếch đại bằng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Phản ứng PCR được thực hiện trên thiết bị C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, USA) sử dụng chương trình nhiệt: 94 °C trong 3 phút; 30 chu kỳ gồm 94 °C trong 40 giây, 52 °C trong 40 giây và 72 °C trong 1 phút; 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được giải trình tự sử dụng dịch vụ của First BASE Laboratories Sdn Bhd (Selangor, Malaysia). Các chuỗi DNA được so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank thông qua giao diện tìm kiếm BLAST nucleotide-nucleotide đặt tại: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> hoặc <http://www.ezbiocloud.net>. Các chuỗi liên quan được tải về và xử lý bằng phần mềm BioEdit.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn nấm mốc

Từ 82 mẫu đất chúng tôi đã phân lập được 164 chủng nấm mốc có hoạt tính xylanase. Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc và hoạt tính enzyme, 36 chủng có hoạt tính cao nhất đại diện cho mỗi nhóm hình thái được lựa chọn. Các chủng được định danh bằng giải trình tự đoạn ITS. Kết quả cho thấy 36 chủng này đại diện cho 13 loài, thuộc 5 chi. Các chi phổ biến bao gồm *Trichoderma* (5 loài), *Aspergillus* (4 loài), *Penicillium* (2 loài), *Curvularia* (1 loài) và *Epicoccum* (1 loài). Trong số 13 loài tìm được, *Trichoderma harzianum* là loài phổ biến nhất với 11 chủng thu nhận được, tiếp theo là *Trichoderma virens* (5 chủng) và *Trichoderma asperellum* (4 chủng). Với các loài còn lại chúng tôi thu nhận được 1 - 3 chủng đại diện (Bảng 1).

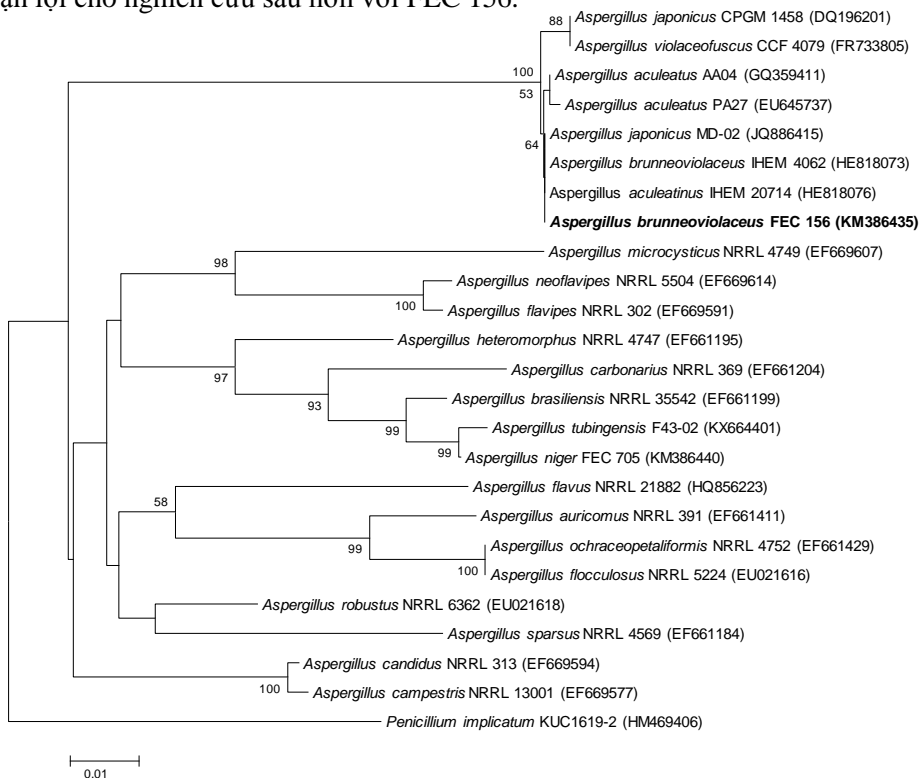
Bảng 1. Danh sách loài nấm mốc có hoạt tính xylanase cao thu nhận được.

Tên loài	Số chủng	Tên loài	Số chủng
<i>Aspergillus brunneoviolaceus</i>	1	<i>Penicillium simplicissimum</i>	1
<i>Aspergillus niger</i>	3	<i>Trichoderma asperellum</i>	4
<i>Aspergillus oryzae</i>	1	<i>Trichoderma atroviride</i>	1
<i>Aspergillus tubingensis</i>	3	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	1
<i>Curvularia affinis</i>	1	<i>Trichoderma harzianum</i>	11
<i>Epicoccum sorghi</i>	1	<i>Trichoderma virens</i>	5
<i>Penicillium oxalicum</i>	3		

Trong số các chủng thu nhận được, FEC 156 thể hiện hoạt tính xylanase cao và chứa đủ hoạt tính thủy phân mạch chính và mạch nhánh (Bảng 2), do vậy được lựa chọn để nghiên cứu sâu hơn. Chủng này được phân lập từ mẫu đất thu thập tại làng Kim Liên (xã Kim Liên, huyện Nam Đàn, tỉnh Nghệ An). Hình thái tế bào và khuẩn lạc của FEC 156 được thể hiện ở Hình 2. Trên môi trường PDA, FEC 156 phát triển nhanh, tạo khuẩn ty màu trắng và sau 36 giờ, tạo đỉnh bào tử màu nâu đen, bào tử dạng hình cầu có gai. Sau 3 ngày nuôi cấy, khuẩn lạc có các vòng đồng tâm và các đường hướng tâm. Đặc điểm hình thái và khuẩn lạc của FEC 156 đặc trưng cho chi *Aspergillus*.

Trình tự ITS và một phần gen 28S rRNA của FEC 156 được chúng tôi giải mã và công bố trên GenBank với mã số KM386435. Trong đoạn ITS dài 508 nucleotide, FEC 156 chỉ khác biệt 01 nucleotide so với trình tự AJ280003 của chủng chuẩn *Aspergillus brunneoviolaceus* CBS 621.78. Do vậy FEC 156 có thể kết luận là một đại diện thuộc loài *A. brunneoviolaceus*. Về mặt di truyền, *A. brunneoviolaceus* rất gần với *A. aculeatus* và *A. japonicus*. Gần đây, *Aspergillus*

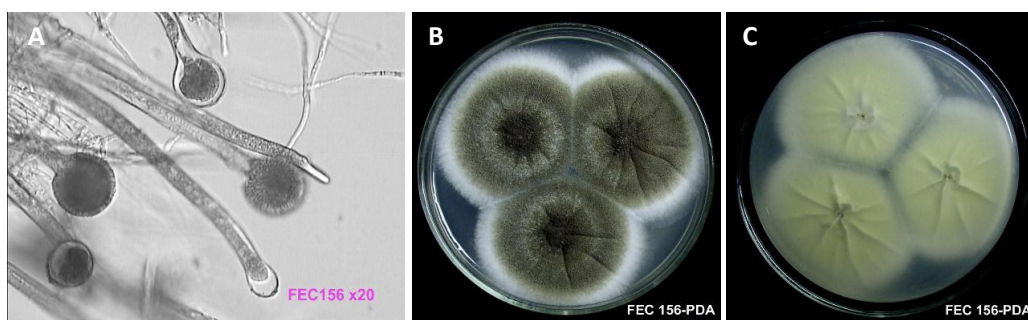
aculeatus ATCC 16872 đã được giải mã trình tự genome (mã GenBank PRJNA82765) và điều này tạo thuận lợi cho nghiên cứu sâu hơn với FEC 156.



Hình 1. Cây phả hệ thể hiện vị trí của *A. brunneoviolaceus* FEC 156 với các loài họ hàng gần.

Bảng 2. Một số đặc tính cơ bản của chủng *Aspergillus brunneoviolaceus* FEC 156.

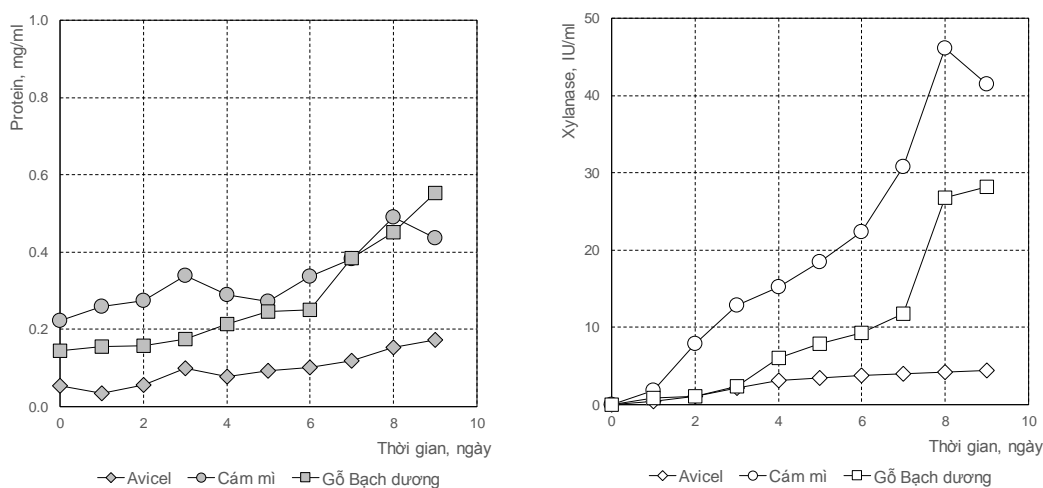
Đặc điểm	Thông số
Tên loài	<i>Aspergillus brunneoviolaceus</i>
Trình tự GenBank (ITS-28S rDNA)	KM386435
Endo- β -1,4-xylanase, IU/ml	187,1
α -glucuronidase, IU/l	48,5
Acetyl esterase, IU/ml	353,4
Protein ngoại bào, mg/ml	0,59



Hình 2. Đặc điểm hình thái tế bào và khuẩn lạc của *Aspergillus brunneoviolaceus* FEC 156 trên môi trường PDA. A - Hình thái tế bào; B - Hình ảnh khuẩn lạc mặt trước; C - Hình ảnh khuẩn lạc mặt sau.

3.2. Ảnh hưởng của cơ chất lên động học sinh xylanase của *A. brunneoviolaceus* FEC 156

Hoạt tính xylanase và hàm lượng protein ngoại bào của *A. brunneoviolaceus* FEC 156 được khảo sát trên các cơ chất avicel, cám mỳ và bột gỗ bạch dương (Hình 3). Kết quả cho thấy, hàm lượng protein được tạo ra trong quá trình lên men của *A. brunneoviolaceus* FEC 156 tăng dần theo thời gian và đạt giá trị cao nhất sau 8 ngày đối với môi trường chứa cơ chất cám mỳ (0,49 mg/ml) và sau 9 ngày đối với cơ chất bột gỗ bạch dương (0,55 mg/ml). Hàm lượng protein ngoại bào trên cơ chất avicel luôn thấp hơn so với môi trường chứa cám mỳ hoặc bột gỗ bạch dương và chỉ đạt cao nhất ở mức 0,17 mg/ml. Động học hoạt độ xylanase của FEC 156 trong quá trình lên men cũng có diễn tượng tương đồng với động học sinh protein ngoại bào. Hoạt độ xylanase trên môi trường cám mỳ và bột gỗ bạch dương đều tăng mạnh theo thời gian và đạt cực đại ở 8 ngày đối với cám mỳ (46,1 IU/ml) và 9 ngày đối với cơ chất bột gỗ bạch dương (28,2 IU/ml). Trên môi trường chứa avicel, hoạt độ của xylanase tăng nhẹ sau 3 ngày và duy trì ở mức thấp. Một số nghiên cứu trước đây cũng cho kết quả tương tự. Theo nghiên cứu của Maria và cộng sự, hoạt độ xylanase của *A. japonicus* khi nuôi cấy ở 25 °C tăng mạnh trong 5 ngày đầu, sau đó giảm rõ rệt vào ngày thứ sáu [4]. Xu hướng này còn được quan sát thấy ở nhiều loài nấm mốc khác. *A. terreus* cho hoạt độ enzyme xylanase lớn nhất (22,03 U/ml) vào ngày thứ tư của quá trình nuôi cấy và sau đó cũng giảm dần [5]. Shah *et al.* (2005) công bố kết quả xylanase đạt cực đại vào ngày thứ tư (80,5 U/ml) và giảm vào ngày thứ sáu đối với *Aspergillus foetidus* [6]. Chủng nấm mốc *A. fumigatus* RP04 [7] và *A. niger* [8] sinh tổng hợp xylanase cực đại sau 96 giờ nuôi cấy.



Hình 3. Ảnh hưởng của cơ chất lên hàm lượng protein ngoại bào (hình trái) và hoạt độ xylanase (hình phải) trong môi trường lên men của *A. brunneoviolaceus* FEC 156.

Kết quả thể hiện trên Hình 3 cũng chỉ ra một cách rất rõ ràng là trong tất cả các thời điểm của quá trình lên men, hoạt độ xylanase trong môi trường chứa cơ chất cám mỳ đều cao hơn đáng kể so với hoạt độ xylanase trong môi trường chứa cơ chất bột gỗ bạch dương và môi trường chứa cơ chất avicel. Tại thời điểm hoạt độ xylanase đạt cực đại thì hoạt độ xylanase trong môi trường chứa cơ chất cám mỳ là cao nhất, gấp 1,64 lần so với hoạt độ xylanase trong môi trường chứa cơ chất bột gỗ bạch dương và gấp 10,5 lần so với hoạt độ xylanase trong môi trường chứa cơ chất avicel. Tính phụ thuộc cơ chất ở *A. brunneoviolaceus* FEC 156 cũng phù hợp với một số nghiên cứu công bố trước đây. Guimaraes và cộng sự đã cho thấy đối với *Aspergillus japonicus* var *aculeatus*, khả năng sinh tổng hợp xylanase tốt nhất ở môi trường cám mỳ (11 U/ml), tiếp theo là môi trường cám đậu tương (7 U/ml) và thấp nhất ở môi trường avicel (0,3 U/ml) [9].

Trong nghiên cứu của Leda và cộng sự (2013), chủng *Aspergillus japonicus* cũng sinh tổng hợp xylanase hoạt lực cao với cơ chất cám mì [10]. Còn đối với môi trường nuôi cấy dạng rắn (solid state), chủng *A. japonicus* C03 lại có khả năng sinh xylanase tốt nhất trên môi trường cám đậu tương (224,6 IU/ml), sau đó mới đến cám mì (155,5 IU/ml) [11]. Kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy *A. brunneoviolaceus* FEC 156 là một chủng có tiềm năng và cần được nghiên cứu sâu hơn cho các ứng dụng trong chế biến phế phụ phẩm nông, lâm nghiệp.

4. KẾT LUẬN

Chủng nấm mốc FEC 156 phân lập từ mẫu đất tại làng Kim Liên (xã Kim Liên, huyện Nam Đàn, tỉnh Nghệ An) có khả năng tổng hợp hệ enzyme thủy phân xylan đa dạng và với hoạt độ cao (endo- β -1,4-xylanase 187,1 IU/ml; α -glucuronidase 48,5 IU/ml; acetyl esterase 353,4 IU/ml). FEC 156 được định danh là *Aspergillus brunneoviolaceus* dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự ITS.

Aspergillus brunneoviolaceus FEC156 sinh tổng hợp xylanase mạnh nhất trên cơ chất cám mì (46,1 IU/ml), sau đó là cơ chất gỗ bạch dương (28,2 IU/ml) và cuối cùng là avicel (4,4 IU/ml). Hoạt tính enzyme xylanase đạt cực đại sau 8 ngày lên men đối với cơ chất cám mì, 9 ngày với cơ chất gỗ bạch dương và 3 ngày đối với avicel.

Lời cám ơn. Nghiên cứu này nhận được sự hỗ trợ của đề án “Phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020” thông qua đề tài mã số 03/HĐ-ĐT.03.14/CNSHCB và Dự án hợp tác giữa Viện Công nghiệp Thực phẩm và ĐH Kỹ thuật Chalmers, Thụy Điển (mã số Dnr 348-2014-3523).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nsereko V. L., Beauchemin K. A., Morgavi D. P., Rode L. M., Furtado A. F., McAllister T. A., Iwaasa A. D., Yang W. Z., Wang Y. - Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows, *Can J. Microbiol.* **48** (2002) 14–20.
2. Olukosi O. A., Cowieson A. J., Adeola O. - Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers, *Poultry Science* **86** (1) (2007) 77-86.
3. Pastor F. I. J., Gallardo O., Sanz-Aparicio J., and Díaz P. - Xylanases: molecular properties and applications, In *industrial enzymes: structure, function and applications*, Springer, 2007, pp. 70-73.
4. Maria L. G. S., Samia M. T. T. - Optimization of xylanase biosynthesis by *Aspergillus japonicus* isolated from a “Caatinga” area in the Brazilian state of Bahia, *African Journal of Agricultural Research* **5** (2005) 1135-1141.
5. Ghanem N. B., Yusef H. H., Mahrouse H. K. - Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements, *Bioresource Technol.* **73** (2000) 113-121.
6. Shah A. R., Madamwar D. - Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization, *Process Biochem* **40** (2005) 1763-1771.
7. Peixoto N. S. C., Michelin M., Betini J. H. A., Jorge J. A., Terenzi H. F., Polizeli M. L. T. M. - Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of

- the crude extract on cellulose pulp biobleaching, *J. Ind. Microbiol Biot.* **36** (2009) 149-155.
8. Yuan Q., Wang J., Zhang H., Qian Z. - Effect of temperature shift on production of xylanase by *Aspergillus niger*, *Process. Biochem.* **40** (2005) 3255-3257.
 9. Guimaraes N. C. A., Sorgatto M., Peixoto-Nogueira S. C., Betini J. H. A., Zanoelo F. F., Marques M. R., Polizeli M. L. T. M., Giannesi G. C. - Xylanase production from *Aspergillus japonicus* var *aculeatus*: production using Agroindustrial Residues and Biobleaching Effect on Pulp., *J. of Biocatalysis & Biotransformation* **2** (2013) 1.
 10. Leda M. F. G., Raquel S. P., Ricardo S. S. T., Ayla S. A. S., Elba P. S. B. - Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, β -xylosidase, ferulic acid esterase and β -glucosidase by themutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361U2/1, *Brazilian Journal of Microbiology* **44** (2013) 569-576.
 11. Facchini F. D. A., Vici A. C., Reis V. R. A. - Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* CO3 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed, *Bioprocess and Biosystems Engineering* **34** (2011) 347–355.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *ASPERGILLUS BRUNNEOVIOLACEUS* FEC 156 PRODUCING A COMPLEX OF XYLANOLYTIC ENZYMES

Dang Tat Thanh¹, Nguyen Thanh Thuy¹, Vu Nguyen Thanh¹, George E. Anasontzis²,
Lisbeth Olsson²

¹*Food Industries Research Institute, 301 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam*

²*Chalmers University of Technology, SE-41296 Gothenburg, Sweden*

*Email: thanh@firi.ac.vn

A large number (164) of fungal strains isolated from 82 soil samples was screened for xylanase activity. Strain FEC 156 possessing a complex and active xylanolytic enzyme system (endo- β -1,4-xylanase; 187.1 IU/ml; α -glucuronidase, 48.5 IU/ml; acetyl esterase, 353.4 IU/ml) was selected. FEC 156 was identified as *Aspergillus brunneoviolaceus* based on morphological properties and ITS sequence. Fermentation kinetics of *A. brunneoviolaceus* FEC 156 was studied on different substrates. The highest xylanase activity was obtained on wheat bran (46.1 IU/ml), followed by birch wood powder (28.2 IU/ml), and avicel (4.4 IU/ml). Xylanase activity reached maximum after 192 h of fermentation on wheat bran, 216 h on birchwood, and 72 h on avicel. *A. brunneoviolaceus* FEC 156 is a promising candidate for further study on xylanolytic enzymes.

Keywords: isolation, *Aspergillus brunneoviolaceus*, endo- β -1,4-xylanase, acetyl esterase, α -glucuronidase.