

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHỦNG ASPERGILLUS PROTUBERUS SINH TỔNG HỢP ENZYME CHITINASE ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ

Nguyễn Thị Hà¹

ABSTRACT

Aspergillus protuberus exposing chitinolytic activity was isolated from Can Gio Mangrove Forest. Conditions affecting the production of chitinases by *Aspergillus protuberus* were optimised under solid substrate fermentation (SSF). The most suitable conditions for chitinase production by *A. protuberus* were 106 spore/g culture medium containing 15% chitin, 0-2% Na. with pH 5.5 and moisture of 80%, the incubation time was 48 hours at 30⁰C. *Aspergillus protuberus* yielded maximum chitinase 1,252U/g fresh biomass. Chitinase preparation from mould fresh biomass in distilled water showed optimum activity at temperature 55⁰C and pH 5.0.

Keywords: *Aspergillus protuberus*, solid substrate conditions, chitinase, Can Gio mangrove forest

Title: Optimisation of the culture conditions for chitinase production by *aspergillus protu-berus* isolated from Can Gio mangrove forest

TÓM TẮT

Chủng *Aspergillus protuberus* thể hiện hoạt tính chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ. Các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự sinh tổng hợp enzyme chitinase đã được tối ưu trong môi trường lên men bán rắn. Mật độ bào tử 106 bào tử/g môi trường nuôi cấy có chứa 15% chitin, 2% NaCl, với pH 5,5 và ẩm độ ban đầu 80%, thời gian nuôi cấy 48 giờ ở nhiệt độ 30⁰C, là thích hợp nhất cho sự sinh tổng hợp chitinase của chủng nấm này. Hoạt tính chitinase cao nhất của chủng này là 1,252U/g chất tươi. Dịch enzyme được tách chiết từ sinh khối nấm mốc bằng nước cất có hoạt tính chitinase cao nhất ở nhiệt độ 55⁰C và pH 5,0.

Từ khóa: *Aspergillus protuberus*, lên men bán rắn, enzyme chitinase, rừng ngập mặn Cần Giờ

1 MỞ ĐẦU

Rừng ngập mặn Cần Giờ có hệ sinh thái đa dạng phong phú, điều kiện khí hậu khắc nghiệt ở đây đã làm cho sinh vật cũng như nấm sợi có tính thích nghi cao và tạo ra sản phẩm trao đổi chất đặc biệt hơn so với điều kiện khác. Một trong những nguồn rác thải dồi dào ở rừng ngập mặn đó là các loại vỏ của động vật chân khớp ở biển như: tôm, cua, ghẹ... có thành phần chủ yếu là chitin. Chitin là chất khó phân hủy, có thể sử dụng nhiều biện pháp hóa lý khác nhau để phân hủy chitin nhưng chi phí rất cao. Hiện nay, người ta đã nghiên cứu chiết tách enzyme chitinase phân giải chitin từ các nguồn khác nhau: động vật, thực vật, vi khuẩn, nấm... nhưng chỉ có enzyme chitinase do vi sinh vật tổng hợp đặc biệt là do nấm sợi tổng hợp mới có hoạt tính cao, ổn định với nhiệt độ và pH.

¹ Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

Ngoài ra, enzyme chitinase còn có rất nhiều ứng dụng trong nông nghiệp, công nghiệp và y học. Khả năng khử chitin làm cho chitinase có giá trị trong phòng trừ dịch bệnh, giảm ô nhiễm môi trường. Chitinase được khai thác sử dụng như là tác nhân phòng trừ sinh học. Chúng cũng có vai trò quan trọng trong sự hình thành thể nguyên sinh nấm, phòng trừ muỗi, sản xuất các chitooligosaccharide hoạt hóa. Những thí nghiệm thử hoạt tính kháng nấm bằng cách sử dụng *Trichoderma harzianum* phân hủy thành tế bào của nấm gây bệnh *Colletotrichum gloeosporioides* đã được áp dụng trên thực nghiệm.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên vật liệu

2.1.1 Bột chitin và chitin huyền phù

Bột chitin: Vỏ tôm rửa sạch, sấy khô. Sau đó xử lý tách protein bằng dung dịch NaOH 4% ở 70-75°C trong 4 giờ, rửa sạch bằng nước cất. Tiếp tục tách khoáng bằng dung dịch HCl 8% ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ, rửa sạch bằng nước cất. Sấy khô, xay nhuyễn thành dạng bột.

Chitin huyền phù: Theo phương pháp của Dai et al. (2011) dung dịch chitin huyền phù 1% được chuẩn bị như sau: 1g bột chitin được cho dần vào 20ml HCl đậm đặc, để ở 4°C và khuấy đều qua đêm. Thêm vào hỗn hợp 200ml ethanol lạnh (-20°C) khuấy đều thật nhanh và ủ qua đêm. Ly tâm hỗn hợp ở 5000 vòng/phút, trong 20 phút, thu lấy kết tủa và rửa bằng nước cất cho đến khi pH trung tính. Thêm vào tủa nước cất cho đến thể tích 100ml.

2.1.2 Chủng nấm *Aspergillus*

Nấm *Aspergillus protuberans* được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh. Nấm được nuôi trên môi trường thạch nghiêng MEA (Malt Extract Agar) ở nhiệt độ phòng trong 5-7 ngày. Bào tử được thu nhận với dung dịch 0,05% tween 80, đã được khử trùng và được sử dụng để cấy sau khi điều chỉnh đến mật độ mong muốn.

2.1.3 Môi trường nuôi cấy bán rắn

Môi trường bán rắn: Trấu 50g, cám 40g, cao nấm men 1g, (NH₄)₂SO₄ 0,1g, CaCl₂ 0,1g, KCl 0,05g, MgSO₄.H₂O 0,05g, bột chitin 10g, muối 2%, độ ẩm 60%.

Sau khi hấp khử trùng, môi trường được chủng vào 1ml dịch huyền phù bào tử, điều chỉnh sao cho mật độ 10⁶ bào tử/g môi trường và nuôi cấy ở nhiệt độ phòng trong 4 ngày. Độ ẩm môi trường nuôi cấy ban đầu được điều chỉnh bằng cách thay đổi thể tích nước cho vào.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Chọn lọc chủng nấm sợi (NS) có hoạt tính chitinase cao

Nguyên tắc: Khi chitinase có mặt trong môi trường chứa chitin nó sẽ phân giải chitin thành N- acetyl glucosamine và các cấu trúc mạch ngắn hơn không bắt màu với thuốc thử lugol. Khi tác dụng với thuốc thử lugol, độ lớn của phần môi trường trong suốt (vòng phân giải) phản ánh hoạt tính chitinase của chủng NS. Đo đường kính vòng phân giải để xác định hoạt tính chitinase.

Cách tiến hành: Dùng khoan nút chai ($d = 0,9\text{cm}$) vô trùng, khoan các lỗ thạch trên MT nuôi cấy NS ở các đĩa petri. Dùng pipet vô trùng nhỏ $100\mu\text{l}$ dịch enzyme thô vào các lỗ khoan. Giữ các hộp petri ở nhiệt độ phòng trong 1 đến 2 ngày, cho thuốc thử lugol vào. Xác định hoạt tính chitinase bằng thuốc thử lugol rồi đo kích thước vòng phân giải ($D - d$, cm), với D là đường kính vòng phân giải.

$D - d \geq 2,5\text{cm}$: chủng NS có hoạt tính chitinase mạnh

$D - d \geq 2,0\text{cm}$: chủng NS có hoạt tính chitinase khá mạnh

$D - d \geq 1,5\text{cm}$: chủng NS có hoạt tính chitinase trung bình

$D - d < 1,5\text{cm}$: chủng NS có hoạt tính chitinase yếu

2.2.2 Xác định hoạt tính (HT) enzyme chitinase

Nguyên tắc: hoạt tính chitinase được xác định dựa vào lượng đường khử N-acetyl- β -D-Glucosamine sinh ra trong phản ứng thủy phân. Khi cho chitinase tác dụng với cơ chất là chitin huyền phù, N-acetyl- β -D-Glucosamine sinh ra trong phản ứng được định lượng qua phản ứng với thuốc thử DNS (3,5 - dinitrosalicylic acid), cho sản phẩm 3-amino-5 nitrosalicylic acid hấp thụ ánh sáng khả kiến ở bước sóng 535nm .

Tiến hành: Dịch enzyme được chiết tách bằng nước cất (100ml) trên máy lắc trong 30 phút (200 vòng/phút), thu dịch lọc, li tâm dịch lọc với tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi là dịch enzyme thô. Cho vào các eppendorf hỗn hợp phản ứng gồm: $0,5\text{ml}$ dịch enzyme thô + $0,5\text{ml}$ chitin huyền phù 1%. Ủ lắc ở 40°C trong vòng 60 phút. Ngừng phản ứng bằng $0,5\text{ml}$ NaOH 1N và đun sôi cách thủy trong 5 phút. Ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch thủy phân enzyme, bỏ cạn. Cho vào eppendorf $0,2\text{ml}$ dung dịch thủy phân enzyme + $0,2\text{ml}$ DNS 1%, lắc đều, đun sôi cách thủy trong 5 phút, làm lạnh nhanh trong bồn làm lạnh. Thêm 1ml nước cất, lắc đều và đo OD ở bước sóng 535nm . Lượng glucosamine sinh ra được xác định dựa theo đường chuẩn N-acetyl- β -D-Glucosamine. Một đơn vị hoạt tính chitinase (đvht) là lượng enzyme cần thiết để giải phóng $1\mu\text{mol}$ N-acetyl- β -D-Glucosamine (NAG) từ phản ứng thủy phân cơ chất chitin trong thời gian 1 phút ở nhiệt độ 40°C (Dai *et al.*, 2011).

2.2.3 Xác định pH và nhiệt độ tối ưu của chitinase từ *Aspergillus protuberus*

Nhiệt độ tối ưu được xác định bằng cách xác định hoạt tính enzyme chitinase tại các nhiệt độ khác nhau. Lấy $0,5\text{ml}$ dịch enzyme ủ với $0,5\text{ml}$ 1% chitin huyền phù trong 30 phút ở các nhiệt độ khác nhau: $35, 40, 45, 50, 55, 60^{\circ}\text{C}$. Xác định hoạt tính chitinase và tìm ra được nhiệt độ tối ưu cho phản ứng enzyme.

pH tối ưu được xác định bằng cách thực hiện phản ứng tại nhiệt độ tối ưu và các pH khác nhau sử dụng hệ đệm phù hợp như: (i) $0,05\text{M}$ Sodium citrate pH $3,5; 4; 4,5; 5,0; 5,5$; (ii) $0,05\text{M}$ Sodium phosphate pH $6,0; 6,5; 7,0; 7,5$; (iii) $0,05\text{M}$ Glycine - NaOH pH $8,0; 8,5; 9,0$.

2.2.4 Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy

Xác định mật độ bào tử, độ ẩm môi trường bán rắn, thời gian nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy, hàm lượng chitin, hàm lượng muối NaCl thích hợp cho sự tăng trưởng và sinh tổng hợp enzyme tối ưu của nấm *Aspergillus protuberus*

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Chọn lọc chủng nấm sợi có hoạt tính chitinase cao

Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme chitinase của 60 chủng NS phân lập từ RNM Cần Giờ được trình bày trong bảng 2. Các chủng có đường kính cao nhất được chọn để phân tích thống kê (Bảng 1).

Bảng 1: Kết quả phân tích thống kê (Duncan, p<0,05)

Chủng nấm	Đường kính trung bình (cm)
4	2.34 ±0.02bc
5	2.30 ±0.10bc
8	2.23 ±0.15c
10	2.65 ±0.18a
15	2.40 ±0.10abc
16	2.55 ±0.05ab
31	2.30 ±0.20c
40	2.20 ±0.16c
44	1.90 ±0.16d
55	2.25 ±0.05bc
57	1.40 ±0.00d

Giá trị: Trung bình ± Độ lệch chuẩn.

Các giá trị có các chữ a, b, c, d giống nhau trong cùng một cột thì sai khác không có ý nghĩa thống kê (Duncan, p<0.05)

Theo kết quả thống kê chủng nấm số 10 và 16 có đường kính vòng phân giải lớn nhất, lớn hơn 2,5 cm và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các chủng còn lại ở độ tin cậy 95% (Duncan, p<0,05) (Hình 1). Hai chủng này đã được khảo sát về mặt hình thái đồng thời gửi đến công ty Nam Khoa để giải trình tự bằng phương pháp PCR, kết quả cho thấy đó là chủng *Penicillium citrinum* và *Aspergillus protuberus*. Ở đây chủng nấm *Aspergillus protuberus* được chọn để tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy.

Bảng 2: Đường kính vòng phân giải của 60 chủng nấm sợi phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ

STT	HT chitinase (D-d, cm)	STT	HT chitinase (D-d, cm)	STT	HT chitinase (D-d, cm)
1	0,50	21	0,60	41	0,75
2	0,55	22	0,22	42	0,75
3	0,65	23	0,50	43	0,60
4	2,34	24	0,70	44	1,90
5	2,30	25	0,60	45	0,60
6	0,60	26	0,65	46	0,60
7	0,90	27	0,80	47	0,22
8	2,20	28	1,20	48	0,50
9	0,32	29	0,90	49	0,80
10	2,65	30	0,95	50	0,70
11	1,10	31	2,30	41	0,65
12	1,65	32	1,20	52	1,20
13	0,60	33	1,00	53	0,90
14	0,40	34	0,30	54	0,95
15	2,40	35	0,50	55	2,25
16	2,55	36	0,55	56	0,75
17	0,80	37	0,20	57	1,40
18	1,00	38	0,70	58	1,10
19	1,20	39	0,50	59	0,80
20	0,50	40	2,20	60	1,20

D: đường kính vòng phân giải, d: đường kính nút khoan

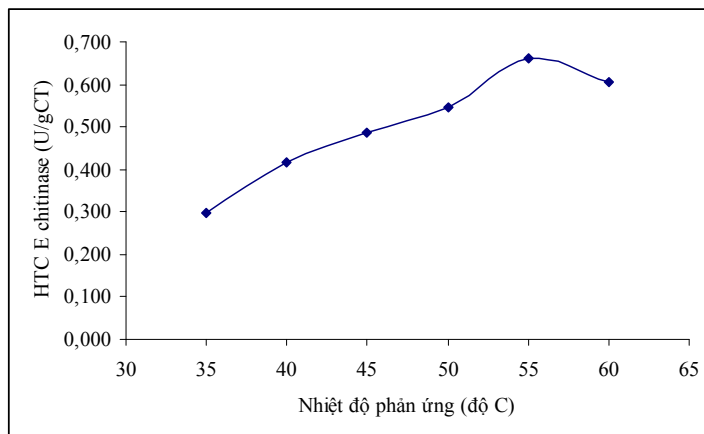


Hình 1: Đường kính vòng phân giải của một số chủng nấm sợi

3.2 pH và nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của chitinase

3.2.1 Nhiệt độ

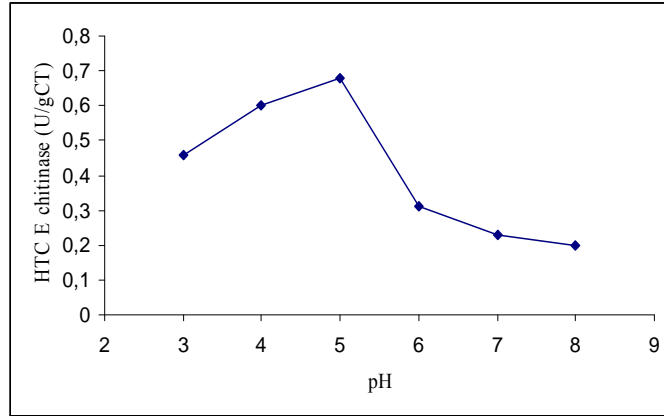
Kết quả trên hình 2 cho thấy enzyme chitinase hoạt động mạnh ở trong khoảng nhiệt độ khá cao ở 55⁰C với hoạt tính là 0.660U/gCT. Hoạt tính của enzyme bắt đầu giảm khi nhiệt độ cao hơn 60⁰C. So sánh với một số enzyme chitinase từ các chủng nấm sợi khác như *Penicillium sp. LYG 0704* (Lee *et al.*, 2009), *Aspergillus carneus* hoạt động tối ưu ở 40⁰C (Sherief, 1991) và *Penicillium aculeatum* ở 50⁰C (Parameswaran Binod *et al.*, 2005). Nhiệt độ tối ưu của enzyme chitinase từ chủng nấm *Aspergillus protuberus* khá cao. Hầu hết các enzyme sẽ bị giảm hoặc mất hoạt tính khi nhiệt độ phản ứng cao trừ các enzyme chịu nhiệt từ các vi sinh vật ở các điều kiện khắc nghiệt như suối nước nóng, các vùng nóng ẩm (Purwani *et al.*, 2004). Do đó, các nhà nghiên cứu đặc biệt quan tâm đến các loại enzyme có khả năng chịu nhiệt cao vì các enzyme này thường có tốc độ phản ứng nhanh nhưng khả năng bị biến tính thấp ở nhiệt độ cao. Như vậy, với khả năng hoạt động ở nhiệt độ cao, enzyme thích hợp để thủy phân các sản phẩm chitin trong điều kiện cần gia nhiệt với tốc độ phản ứng nhanh, đặc biệt dùng phân hủy các chất thải trong lĩnh vực chế biến thủy sản cũng như ứng dụng trong ngăn cản sự xâm nhập gây bệnh của nhóm vi sinh vật chịu nhiệt.



Hình 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *A. protuberus*

3.2.2 pH

Dùng hệ đệm phù hợp để điều chỉnh pH trong khoảng từ 3,5-8,5. Sử dụng dung dịch với các pH này để thu dịch chiết enzyme. Lấy 0,5ml dịch enzyme ủ với 0,5ml 1% chitin huyền phù trong 30 phút ở nhiệt độ tối ưu (55⁰C). Enzyme chitinase do chủng *A. protuberus* sinh ra có hoạt tính chitinase cao nhất ở pH 5,0 với hoạt tính tổng là 0,68U/gchất tươi (gCT) (Hình 3). Hoạt tính chitinase giảm mạnh khi môi trường phản ứng mang tính kiềm. Tương tự với nghiên cứu của Sherief et al. (1991), chitinase của nấm hoạt động tối ưu trong môi trường acid.

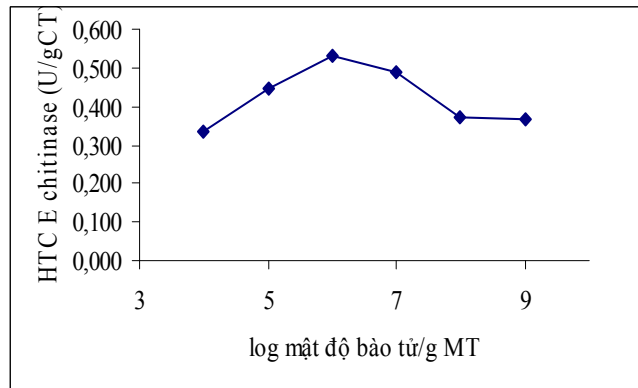


Hình 3: Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *Aspergillus protuberus*

3.3 Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy

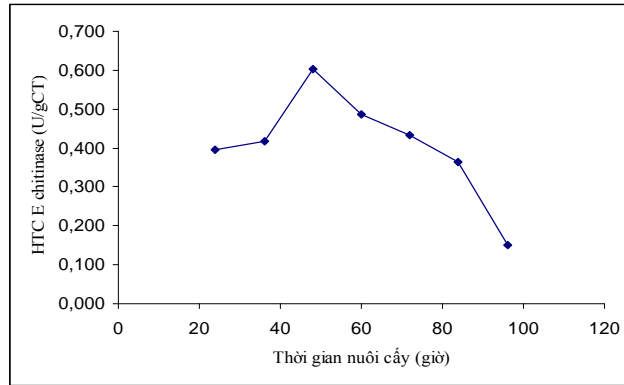
3.3.1 Mật độ bào tử

Dịch huyền phù bào tử được điều chỉnh ở các mật độ khác nhau sao cho mật độ bào tử đạt các mức độ 104, 105, 106, 107, 108 bào tử/g môi trường. Nhận thấy ở mật độ bào tử 106 enzyme chitinase có hoạt tính cao nhất (Hình 4). Mật độ bào tử càng tăng hoạt tính enzyme thể hiện càng giảm. Theo Suresh kích thước khuẩn lạc có ảnh hưởng quan trọng đến sản lượng enzyme chitinase của nấm *Beauveria bassiana* (Suresh et al., 1999).



Hình 4: Ảnh hưởng của mật độ bào tử lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *A. protuberus*

3.3.2 Thời gian nuôi cấy



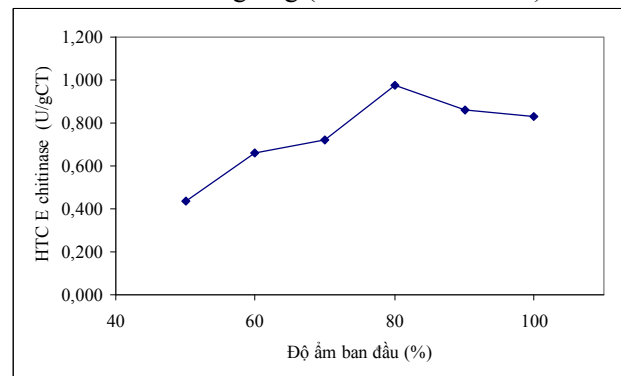
Hình 5: Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *A. protuberus*

Nấm *A. protuberus* sinh enzyme chitinase có hoạt tính tổng cao 0,604U/gCT khi nuôi trong khoảng thời gian 48 giờ. Điều này tương đồng với nghiên cứu của Lê Thị Huệ (2010) về chitinase của chủng *Aspergillus awamori* có hoạt độ cao nhất khi nuôi cấy 36 giờ. Nhưng lại khác với nấm *Aspergillus terreus* có HT chitinase cao khi nuôi trong thời gian dài hơn là 96 giờ (Ghanem, Al-Garni và Al-Makishah, 2010)

Mỗi một loài có một thời gian tăng trưởng tối ưu khác nhau, thường thì HT enzyme mạnh nhất ở thời điểm bào tử mới bắt đầu hình thành (Lượng, 2006). Số liệu trên cho thấy thời gian nuôi cấy càng lâu HT enzyme càng giảm. Chúng tôi thấy chủng *A. protuberus* có thời gian nuôi cấy tương đối ngắn, đây là điểm cần chú ý vì sẽ nâng cao hiệu suất thu nhận enzyme.

3.3.3 Ẩm độ môi trường nuôi cấy

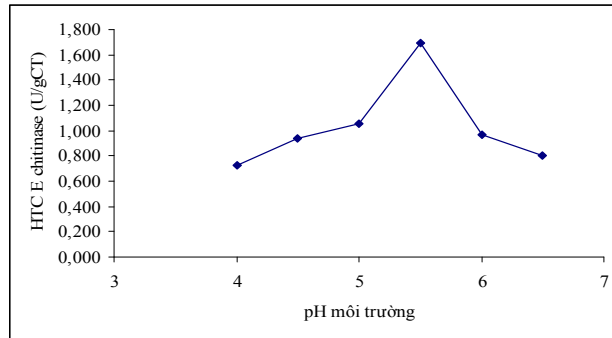
Độ ẩm ban đầu 80% thích hợp cho chủng *Aspergillus protuberus* sinh tổng hợp enzyme chitinase (hình 6). Độ ẩm ban đầu ảnh hưởng đến sự sản sinh các loại enzyme thủy phân khi nuôi ở môi trường bán rắn vì nó ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của cơ thể sinh vật (Nishio *et al.*, 1979) (Ramesh *et al.*, 1990). Chủng *P. Chrysogenum* PPCS1 và PPCS 2 đạt hoạt tính chitinase cao nhất khi nuôi ở độ ẩm ban đầu là 80% và 120% tương ứng (Patidar *et al.*, 2005)



Hình 6: Ảnh hưởng của độ ẩm lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *A. Protuberus*

3.3.4 pH môi trường nuôi cấy

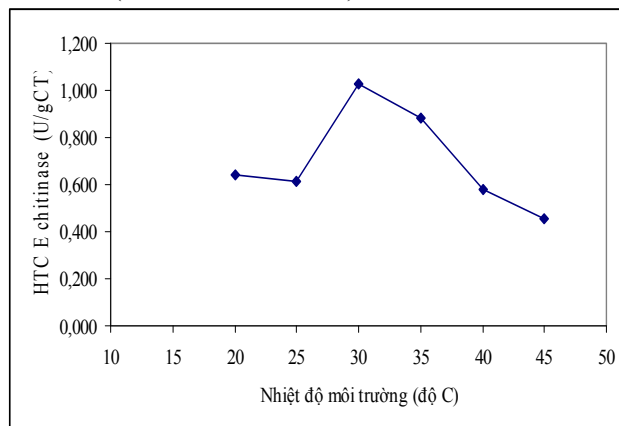
Chủng *A. protuberus* sinh enzyme chitinase có HT tổng cao 1,693U/gCT tại pH 5.5 (Hình 7). Kết quả trên phù hợp với những quan điểm của Ingold (1967), cho rằng pH thích hợp cho NS sinh enzyme tối ưu là từ 4-6.



Hình 7: Ảnh hưởng của pH môi trường lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *A. protuberus*

3.3.5 Nhiệt độ nuôi cấy

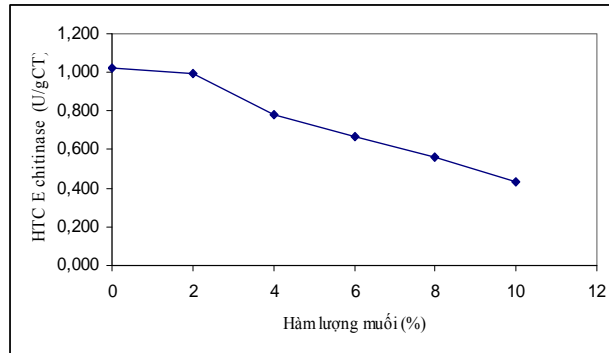
Nhiệt độ nuôi cấy là một đặc trưng của cơ thể sinh vật và có ảnh hưởng sâu sắc đến sản lượng và thời gian của pha tổng hợp enzyme (Ramesh và Lonsane, 1987). Các nghiên cứu về NS cho biết NS thuộc nhóm vi sinh vật ưa ấm. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Lê Thị Huệ (2010) về chủng *A. awamori* đạt hoạt độ chitinase cao nhất tại khoảng nhiệt độ 30-35⁰C, *P. chrysogenum* cho sản lượng chitinase ở 24⁰C (Patidar *et al.*, 2005)



Hình 8: Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *A. protuberus*

3.3.6 Hàm lượng muối NaCl

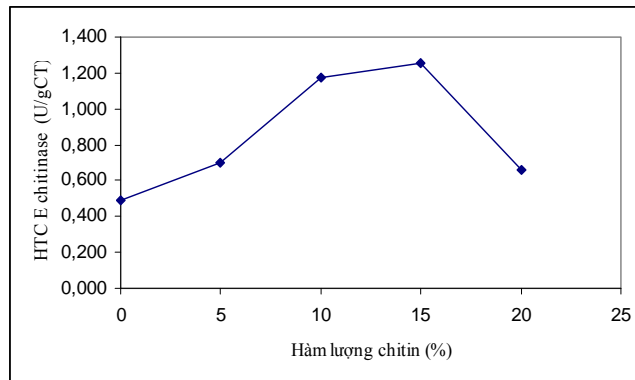
Nồng độ muối cao không ảnh hưởng nhiều đến khả năng sinh trưởng của chủng nấm *A. protuberus*, chủng *A. protuberus* có khả năng sinh enzyme chitinase cao nhất ở nồng độ muối NaCl 0-2% (hình 9), chứng tỏ chủng này là chủng chịu mặn và đây là chủng nấm du nhập từ đất liền vào rừng ngập mặn. Theo (Klich, 2002) *Aspergillus* là một trong những chi nấm điển hình thường gặp ở đất liền.



Hình 9: Ảnh hưởng của hàm lượng muối NaCl lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *A. protuberus*

3.3.7 Hàm lượng chitin

Chủng *A. protuberus* lại thể hiện nhu cầu chitin cao, HT enzyme mạnh 1,252U/gCT với hàm lượng chitin 10 - 15%. HT enzyme chitinase có xu hướng giảm khi HL chitin vượt qua mức 15%. Điều này tương đồng với chủng *Aspergillus awamori* đạt HT chitinase cao nhất tại hàm lượng chitin 10 – 15% (Hue, 2010).



Hình 10: Ảnh hưởng của hàm lượng chitin lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *A. protuberus*

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng nấm *A. protuberus* được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ có khả năng sinh tổng hợp chitinase cao trên môi trường nuôi cấy bán rắn với hàm lượng chitin 15%, NaCl 0-2%, mật độ bào tử chủng vào môi trường 106 bào tử/g môi trường, độ ẩm ban đầu 80%, pH 5,5, nhiệt độ 30°C trong thời gian nuôi cấy 48 giờ. Hoạt tính chitinase đạt được là 1,252U/g chất tươi cao gấp 2 lần so với trước khi tối ưu (0.660U/g chất tươi). Chitinase trong dịch chiết enzyme thô bằng nước cất từ sinh khối tươi của nấm hoạt động mạnh ở nhiệt độ 55°C và pH 5,0. Chủng nấm này cần được nghiên cứu tiếp tục để nâng cấp sản xuất chitinase trong phạm vi phòng thí nghiệm nhằm có thể đưa vào ứng dụng trong thực tiễn đời sống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- De-hui Dai, Wei-lian Hu, Guang-rong Huang and Wei Li. 2011. Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(13), pp. 2476-2485.
- Ghanem, K. M., Al-Garni, S. M., & Al-Makishah, N. H. 2010. Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology*, 9(32), 5135-5146.
- Klich, M. A. 2002. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, 94(1), 21-27.
- Lê Thị Huệ. 2010. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của một số chủng NS thuộc giống *Aspergillus*, *Trichoderma* và ứng dụng. Luận văn Thạc sĩ. Trường ĐHSP Tp. HCM.
- Lee, YG, Ki Chul Chung, KC, Wi, SG, Lee, JC, Bae, HJ. 2009. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. *Protein Expression and Purification* 65, pp. 244-250.
- Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết. 2006. Thí nghiệm công nghệ sinh học tập 2. NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
- Nishio N, Tai K, Nagai S. 1979. Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *Eur JApplMicrobiol Biotechnol*, 8:263-70.
- Parameswaran Binod, Tunde Puzstahelyi, Viviana Nagy, Chandran Sandhya, George Szakacs, Istvan Pocs, Ashok Pandey. 2005. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 21 under solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 36, pp. 880-887.
- Patidar, P., Agrawal, D., Banerjee, T., & Patil, S. 2005. Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 40(9), 2962-2967.
- Purwani EY, Maggy TS, Yaya R, Jae KH, Yu RP. 2004. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp.13.26. *Enzyme Microbiol. Technol.* 35: 147-153.
- Ramesh MV, Lonsane BK. 1987. Solid State fermentation for production of alpha amylase by *Bacillus megaterium* 16 M. *Biotechnol Lett*;9:323-8.
- Ramesh MV, Lonsane BK. 1990. Critical importance of moisture content of the medium in alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* M 27 in a solid state fermentation system. *Appl Microbiol Biotechnol*;33:501-5.
- Sherief AA, El-Sawah MMA, Abd El-Naby MA. 1991. Some properties of chitinase produced by a potent *Aspergillus carneus* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*;35:228-30.
- Suresh PV, Chandrasekaran M. 1999. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. *Process Biochem*;34:257-67.