

KHẢO SÁT CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT LOVASTATIN TỪ NẤM *Asperillus terreus* EV8 BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN BÁN RẮN

Nguyễn Phạm Tuấn^{1*}, Bằng Hồng Lam², Nguyễn Phạm Tú¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang;

²Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh.

*Tác giả liên hệ: ngphamtuan1983@gmail.com

Nhận bài: 16/04/2020 Hoàn thành phản biện: 20/07/2020 Chấp nhận bài: 14/09/2020

TÓM TẮT

Lovastatin một loại thuốc thuộc nhóm statin và được sử dụng để hạ cholesterol. Lovastatin cũng được sử dụng điều trị bệnh tim mạch vành, bệnh Alzheimer và các bệnh về xương,... Nấm *Asperillus terreus* được xem là một trong những nguồn tổng hợp lovastatin, trong quá trình tổng hợp lovastatin chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố sinh học và phi sinh học. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm bằng phương pháp lên men bán rắn. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men từ nấm *Asperillus terreus* EV8 như cơ chất, pH, nguồn carbon, nguồn nitrogen và thời gian lên men được đánh giá. Hàm lượng lovastatin được xác định bằng phương pháp đo quang ở bước sóng $\lambda=238$ nm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nấm *Asperillus terreus* EV8 sản xuất lovastatin tốt nhất dưới điều kiện như cơ chất (gạo trắng), pH môi trường (pH = 6), nguồn carbon (glucose 5 g/L), nguồn nitrogen (pepton 5 g/L) và thời gian lên men (8 ngày), hàm lượng lovastatin đạt 4,66 mg/g.

Từ khóa: *Asperillus terreus* EV8, Cơ chất, Glucose, Lovastatin, pH, Thời gian

INVESTIGATION OF FACTORS AFFECTING THE PRODUCTION OF LOVASTATIN FROM *Asperillus terreus* EV8 BY SOLID STATE FERMENTATION

Nguyen Pham Tuan^{1*}, Bang Hong Lam², Nguyen Pham Tu¹

¹An Giang Biotechnology Center;

²An Giang University, Viet Nam national University Ho Chi Minh City.

ABSTRACT

Lovastatin is a drug belonging to statin group and is used to reduce cholesterol. Lovastatin is also applied to treat coronary heart disease, Alzheimer's disease, and bone diseases. *Asperillus terreus* is considered as one of the potential sources of lovastatin, but the lovastatin synthesis process affected by various biological and abiotic factors. The study was conducted to evaluate the effect of factors on the production of lovastatin from this type of fungi by solid state fermentation method. The effect of factors on the production of lovastatin from *Asperillus terreus* EV8 as substrates, pH of medium, carbon source, nitrogen and fermentation time were investigated. Lovastatin assay was determined by spectrophotometer at 328 nm. The results showed that *Asperillus terreus* EV8 strains produced lovastatin under conditions as substrates (rice), pH of medium (pH = 6), carbon source (glucose 5 g/L), nitrogen source (peptone 5 g/L) and fermentation time (8 days) and the amount of lovastatin reaches 4.66 mg/g.

Keywords: *Asperillus terreus* EV8, Glucose, Lovastatin, pH, Substrate, Time

1. MỞ ĐẦU

Tăng cholesterol máu, một trong những yếu tố nguy cơ hàng đầu dẫn đến xơ vữa động mạch và các bệnh tim mạch vành và là một vấn đề lớn trên toàn thế giới. Trên Thế giới, statin được sử dụng thường xuyên trong điều trị tăng cholesterol. Lovastatin là một thành viên của nhóm thuốc statin, được sử dụng để hạ cholesterol ở những người có sự gia tăng cholesterol máu và góp phần ngăn ngừa bệnh tim mạch. Lovastatin là một loại thuốc hypercholesterolemia mạnh sử dụng cho việc làm giảm lượng cholesterol trong máu. Lovastatin là một chất ức chế cạnh tranh của 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, các enzyme hạn chế tỷ lệ sinh tổng hợp cholesterol (Seenivasan và cs., 2008). Ngoài ra, lovastatin đã được sử dụng trong các ứng dụng y sinh học như điều trị bệnh tim mạch vành, bệnh Alzheimer và các bệnh về xương (Aravindan và cs., 2008). Lovastatin được tổng hợp từ nhiều nguồn vi sinh vật khác nhau như xạ khuẩn, nấm mốc và nấm ăn và nấm dược liệu (Vijay và cs., 2019). Trong đó, nấm *Asperillus terreus* được xem là một trong những nguồn tổng hợp lovastatin. Nấm tổng hợp bằng hai phương pháp lên men chìm và lên men bán rắn, quá trình lên men bán rắn sản xuất lovastatin chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố sinh học và phi sinh học (Subhan và cs., 2016). Lên men trạng thái rắn đã được sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm cho các mục đích khác nhau như sản xuất enzyme, sản xuất acid hữu cơ, màu sắc,... (Jian và Yang, 2013). Lên men bán rắn là môi trường sống tự nhiên của hầu hết các vi sinh vật (chủ yếu là nấm và nấm mốc); đòi hỏi ít năng lượng để khử trùng (vì hoạt động của nước thấp hơn); ít bị nhiễm vi khuẩn; sản xuất các sản phẩm có năng suất cao hơn; có một số lợi thế về môi trường; dễ sử dụng cơ chất trong quá trình sản xuất (tận dụng phụ phẩm) và dễ quản lý nước thải (Carlos và cs., 2017). Trong quá trình lên men bán rắn để sản xuất hợp chất có hoạt tính sinh học,

nấm chịu tác động của các yếu tố như pH, cơ chất, nguồn nitrogen, carbon, thể tích cấy và thời gian lên men,... Với những ưu điểm của sản phẩm lovastatin và lợi thế của quá trình lên men sản xuất các sản phẩm từ nấm *Asperillus terreus*, từ đó, nghiên cứu “Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* EV8 bằng phương pháp lên bán rắn” được thực hiện nhằm xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Dòng nấm nội sinh *Asperillus terreus* EV8 được lưu giữ phòng thí nghiệm vi sinh của Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang. Chuẩn bị dung dịch lên men: môi trường lên men để tạo sinh khối của nấm *Asperillus terreus* EV8 bao gồm peptone 2 g/L, sucrose 5 g/L, MgSO₄ 0,1 g/L và KH₂PO₄ 0,5 g/L điều chỉnh về pH = 5,6. Chuẩn bị bình tam giác 250 mL có chứa 100 mL môi trường dinh dưỡng đã được thanh trùng và để nguội, cấy 3 tán nấm (đường kính 1 x 1 mm). Các bình tam giác được ủ trong điều kiện nhiệt độ phòng và lắc với tốc độ 140 vòng/phút trong 3-5 ngày và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của cơ chất đến quá trình sản xuất lovastatin

Chuẩn bị môi trường lên men của Mouafi và cs. (2016), bao gồm MgSO₄. 7H₂O (0,15 g/L); (NH₄)₂HPO₄ (0,25 g/L); NaCl (1 g/L), điều chỉnh về pH = 5,5. Chuẩn bị các công thức thí nghiệm gồm 20 g cơ chất khác nhau (gạo trắng, cám gạo, vỏ bắp, lõi bắp, bã mía và vỏ trấu) và bổ sung 30 mL dinh dưỡng để đảm bảo đủ độ ẩm thí nghiệm (70%) (Praveen và cs., 2015). Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ 10⁸ tế bào/mL) vào các công thức thí nghiệm sau khi khử trùng và làm lạnh. Các công thức

nấm được ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng trong thời gian 8-10 ngày. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng lovastatin

2.2.1.2. *Khảo sát ảnh hưởng của pH đến quá trình sản xuất lovastatin*

Chuẩn bị môi trường lên men của Mouafi và cs. (2016), điều chỉnh về pH khác nhau (pH = 5, 6, 7, 8 và 9). Chuẩn bị các công thức thí nghiệm gồm 20 g cơ chất (gạo trắng) và bổ sung 30 mL dinh dưỡng để đảm bảo đủ độ ẩm thí nghiệm (70%). Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ 10^8 tế bào/mL) vào các công thức thí nghiệm sau khi khử trùng và làm lạnh. Các công thức nấm được ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian 7-10 ngày. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng lovastatin.

2.2.1.3. *Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sản xuất lovastatin*

Chuẩn bị môi trường lên men của Mouafi và cs. (2016), bổ sung nguồn carbon khác nhau (glucose, sucrose, lactose, dextrose 5 g/L và đối chứng không bổ sung). Chuẩn bị các công thức thí nghiệm gồm 20 g cơ chất (gạo) và bổ sung 30 mL dinh dưỡng để đảm bảo đủ độ ẩm thí nghiệm (70%) và nguồn carbon bổ sung khác nhau, điều chỉnh về pH = 6. Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ 10^8 tế bào/mL) vào các công thức thí nghiệm sau khi đã được khử trùng và làm lạnh. Các công thức nấm được ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian 7-10 ngày. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng lovastatin.

2.2.1.4. *Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ đến quá trình sản xuất lovastatin*

Chuẩn bị môi trường lên men của Mouafi và cs. (2016), bổ sung nguồn carbon là glucose 5 g/L. Chuẩn bị các công thức thí nghiệm gồm 20 g cơ chất (gạo trắng) và bổ sung 30 mL dinh dưỡng để đảm bảo đủ độ ẩm thí nghiệm (50-70%) và nguồn nitơ bổ sung khác nhau (yeast extract, malt extract, peptone, beef extract, NH_4NO_3 5 g/L và đối chứng không bổ sung), điều chỉnh về pH = 6. Tiến hành cấy

10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ 10^8 tế bào/mL) vào các công thức thí nghiệm sau khi đã được khử trùng và làm lạnh. Các công thức nấm được ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian 8-10 ngày. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng lovastatin.

2.2.1.5. *Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình sản xuất lovastatin*

Chuẩn bị môi trường lên men của Mouafi và cs. (2016), điều chỉnh về pH = 6, glucose 5 g/L và peptone 5 g/L. Chuẩn bị các công thức thí nghiệm gồm 20 g cơ chất (gạo trắng) và bổ sung 30 mL dinh dưỡng để đảm bảo đủ độ ẩm thí nghiệm (70%). Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ 10^8 tế bào/mL) vào các công thức thí nghiệm sau khi đã được khử trùng và làm lạnh. Các công thức nấm được ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian lên men khác nhau. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng lovastatin.

2.2.2. *Phương pháp phân tích hàm lượng lovastatin*

Sau khi lên men vào ngày thứ 8-10, tiến hành thu sản phẩm và sấy khô ở điều kiện nhiệt độ là 50°C trong 24 giờ và xay nhuyễn thành bột để tiến hành phân tích hàm lượng lovastatin. Cân 2 g mẫu chiết với ethyl acetate (pH = 3) trong bình tam giác 250 mL ủ ở điều kiện nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong 2 giờ. Sau đó, tiến hành ly tâm hỗn hợp với tốc độ 10.000 vòng/phút cho 10 phút và thu phần dịch bỏ phần bã. Phần dịch lọc được lọc qua màng lọc có kích thước $0,45 \mu\text{m}$, dịch lọc được đem phân tích hàm lượng lovastatin dựa vào đường chuẩn (Mouafi và cs., 2016). Hỗn hợp phản ứng bao gồm 1 mL dung dịch qua màng lọc, 1 mL acid trifluoroacetic (1%) phản ứng trong 10 phút (Lacton hóa axit hydroxyl của lovastatin). Lấy 0,5 mL dung dịch bên trên pha loãng 10 lần với methanol và đo độ hấp thụ ở bước sóng 238 nm.

2.3. Phương pháp thống kê

Các số liệu thô của thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Thống kê bằng phần mềm Statgraphics 16.0. Kiểm tra sự khác biệt giữa các giá trị trung bình theo phép thử Duncan và LSD.

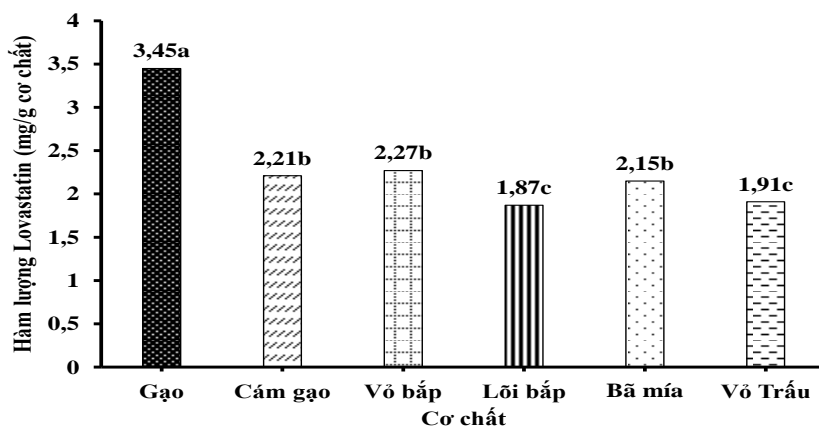
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của cơ chất đến quá trình sản xuất lovastatin

Yếu tố quan trọng trong quá trình lên men bán rắn là sự lựa chọn cơ chất phù hợp cho quá trình lên men. Để giảm chi phí cho quá trình sản xuất lovastatin; lovastatin được sản xuất bằng cách sử dụng các sản phẩm từ nông nghiệp với giá cả thích hợp. Môi trường sản xuất lovastatin thường đơn giản, sử dụng phụ phẩm trong công nghiệp-nông nghiệp như cám lúa mì, cám gạo hoặc rom lúa mì làm cơ chất (Nathiya và cs., 2011). Cơ chất có ảnh hưởng đến quá trình sinh lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* EV8, các nguồn cơ chất khác nhau cho khả năng sinh lovastatin khác nhau (Hình 1). Cụ thể, hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với nguồn cơ chất ban đầu là gạo với hàm lượng là 3,54 mg/g cơ chất; kế đến là nguồn cơ chất cám gạo và vỏ bắp với hàm lượng lovastatin lần lượt là 2,21 mg/g cơ chất;

2,27 mg/g cơ chất và thấp nhất là nguồn cơ chất lõi bắp và vỏ trấu, hàm lượng lovastatin chỉ đạt 1,87 mg/g cơ chất và 1,91 mg/g cơ chất.

Dựa trên nghiên cứu sàng lọc nguồn cơ chất, gạo được chọn là cơ chất thích hợp để tối ưu hóa thêm nghiên cứu theo trình lên men bán rắn. Gạo chứa đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật. gạo trắng chứa các chất dinh dưỡng như carbohydrate, protein, sắt, vitamin B₁ và lipid. Kết quả nghiên cứu tương tự nghiên cứu của Wei và cs. (2007) cho rằng, gạo và cám lúa mì thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* cho hàm lượng lovastatin lần lượt là 2,20 mg/g cơ chất khô và 2,00 mg/g cơ chất khô. Điều này được giải thích là do lovastatin là một sản phẩm nội bào, sự tăng trưởng tốt hơn của sợi nấm có nghĩa là sợi nấm nhiều hơn và năng suất lovastatin cao hơn. Nếu cơ chất có nhiều dinh dưỡng sẽ làm cho nấm sự phát triển của tế bào và sự tích lũy lovastatin cao hơn so với cơ chất có hàm lượng chất dinh dưỡng thấp hơn. Như vậy, nguồn cơ chất thích hợp cho quá trình lên men của nấm *Asperillus terreus* EV8 để sản xuất lovastatin là gạo trắng, hàm lượng lovastatin đạt 3,54 mg/g cơ chất và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

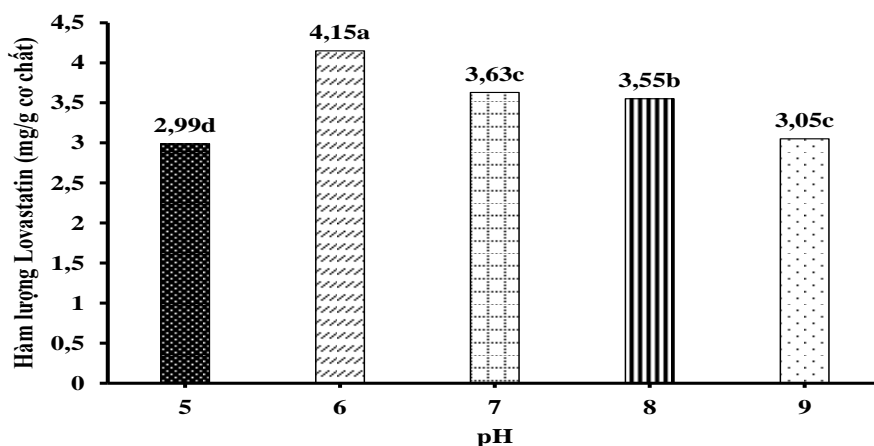


Hình 1. Ảnh hưởng của cơ chất lên men đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* EV8

3.2 Ảnh hưởng của pH đến quá trình sản xuất lovastatin

pH của môi trường lên men ban đầu ảnh hưởng mạnh mẽ đến quá trình sản xuất lovastatin. Để đánh giá ảnh hưởng của giá trị pH trong cơ chất lên quá trình sản xuất lovastatin từ nấm, giá trị pH được điều chỉnh bằng cách thêm HCl hoặc NaOH. pH của môi trường lên men có ảnh hưởng đến quá trình sinh lovastatin của nấm *Asperillus terreus* EV8 (Hình 2). Cụ thể, hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với pH môi trường ban đầu là pH = 6 với hàm lượng là 4,15 mg/g; kế đến là pH môi trường ban đầu là pH = 7 và pH = 8 với hàm lượng lovastatin lần lượt là 3,63 mg/g cơ chất; 3,55 mg/g cơ chất và thấp nhất là pH = 5 và pH = 9, hàm lượng lovastatin chỉ đạt 2,99 mg/g cơ chất và 3,05 mg/g cơ chất. Khi pH tăng thêm dẫn đến giảm dần hàm lượng lovastatin do sự biến tính hoặc bất hoạt của cây vi sinh vật vì pH mạnh ảnh hưởng đến việc vận chuyển các thành phần khác nhau trên màng tế bào cho sự tăng trưởng tế bào và hình thành sản phẩm và hầu hết các loại nấm hoạt động trong khoảng pH = 3,5-7,0 và pH thấp hơn cũng tránh được sự nhiễm bẩn của các vi khuẩn khác (Foukia và cs., 2016a). Kết quả nghiên cứu phù hợp với Attalla và cs. (2008) cho rằng hàm lượng lovastatin tối đa của mevinolin (96,22 mg/L) ở pH = 6,5

bằng cách sử dụng *Aspergillus terreus*. Nghiên cứu của Szakaes và cs. (1998) cho rằng, hàm lượng lovastatin đạt tối đa dưới điều kiện pH = 6,2 trong môi trường nuôi cấy có chứa bột của cây sorghum ngọt khi sản xuất lovastatin từ nấm *Aspergillus terreus*. Một nghiên cứu khác cho rằng, Valera và cs. (2005) hàm lượng lovastatin đạt cao nhất trong môi trường có chứa cám lúa mì ở điều kiện pH = 5 khi sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus flavipes*. Trong khi đó, nghiên cứu của Foukia và cs. (2016a) cho rằng, hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với pH môi trường ban đầu là pH = 6 với hàm lượng 0,228 mg/mL khi sản xuất lovastatin từ nấm *Aspergillus fumigatus*. pH = 6 thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* là do tất cả các hoạt động trao đổi chất thứ cấp thường xảy ra ở một số pH cụ thể và sự thay đổi pH trong quá trình lên men ảnh hưởng mạnh đến nấm (Kysilka, 1993). Có thể là do ở pH = 6, tính thấm của màng tế bào được tăng cường bởi ion kim loại để sản xuất lovastatin tối đa trong quá trình lên men (Madan và Thind, 2000). Tóm lại, pH môi trường lên men thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* EV8 là pH = 6, lượng lovastatin đạt 4,15 mg/g và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



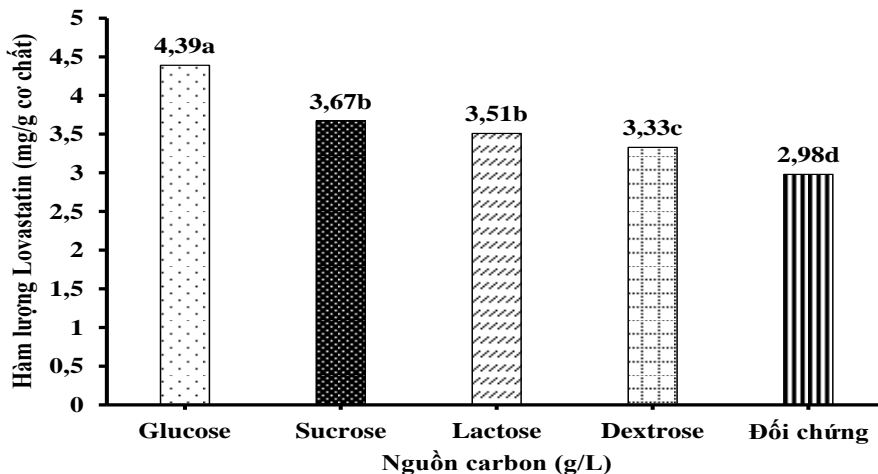
Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* EV8

3.3 Ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sản xuất lovastatin

Trong quá trình sản xuất lovastatin chịu sự ảnh hưởng của các nguồn carbon khác nhau trong quá trình lên men. Để xác định hiệu quả của việc kết hợp các nguồn carbon bổ sung đến hàm lượng lovastatin, các nguồn carbon khác nhau cụ thể là glucose, dextrose, sucrose, lactose và đối chứng (không bổ sung) được thêm vào môi trường lên men của quá trình lên men bán rắn của nấm. Kết quả ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sinh lovastatin

của nấm *Asperillus terreus* EV8 được thể hiện trong Hình 3.

Cụ thể, hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với nguồn carbon bổ sung ban đầu là glucose với hàm lượng là 4,39 mg/g cơ chất; kế đến là nguồn carbon bổ sung là sucrose và lactose với hàm lượng lovastatin lần lượt là 3,67 mg/g cơ chất; 3,51 mg/g cơ chất và thấp nhất là nguồn carbon bổ sung dextrose và không bổ sung, hàm lượng lovastatin chỉ đạt 3,33 mg/g cơ chất và 2,98 mg/g cơ chất.



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn carbon khác nhau đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* EV8

Kết quả nghiên cứu tương tự như nghiên cứu của Wei và cs. (2007) cho rằng, nguồn carbon là glucose thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus*, hàm lượng lovastatin đạt 2,7 mg/g cơ chất khô. Tương tự, nghiên cứu của Foukia và cs. (2016a) cho rằng, nguồn carbon là glucose (3,5 g/L) thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus*, hàm lượng lovastatin đạt 0,209 mg/mL. Nghiên cứu của Arjumand và cs. (2013), nguồn carbon là glucose (9 g/L) thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus*, hàm lượng lovastatin đạt 253,33

mg/L. Glucose được xem như là nguồn carbon tốt nhất khi bổ sung vào môi trường để sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* là do glucose như là nguồn carbon sẵn có và glucose dễ bị oxy hóa rất nhanh trong các tế bào do đó hoạt động như một nguồn năng lượng sẵn có so với các nguồn carbon khác (Arjumand và cs., 2013). Tóm lại, nấm *Asperillus terreus* EV8 sản xuất lovastatin trong điều kiện nguồn carbon bổ sung là glucose (5 g/L) với hàm lượng lovastatin đạt 4,02 mg/g cơ chất. Như vậy, nguồn carbon bổ sung thích hợp cho quá trình lên men của nấm *Asperillus terreus* EV8 để sản xuất lovastatin là glucose (5

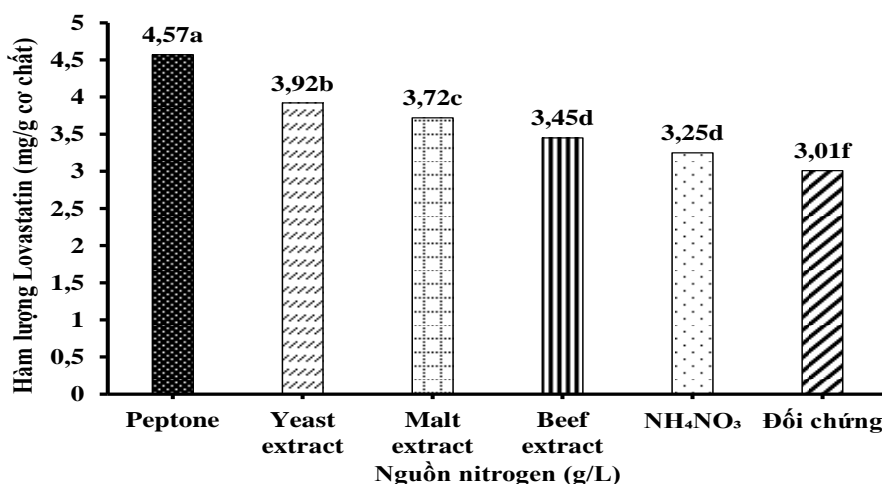
g/L), hàm lượng lovastatin đạt 4,39 mg/g cơ chất và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4 Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung đến quá trình sản xuất lovastatin

Nguồn và loại nguồn carbon và nitơ là một trong những yếu tố quan trọng nhất cho bất kỳ quá trình lên men. Nguồn nitơ là một trong những thành phần chính trong môi trường lên men và nguồn nitơ vô cơ hoặc hữu cơ thường được ưa thích nuôi cấy của nấm *A. terreus* (Casas và cs., 2005). Nguồn nitơ hữu cơ rất giàu protein và nguồn acid amin cho sinh vật. Acid amin rất quan trọng cho quá trình sinh tổng hợp lovastatin (Manzoni và Rollini, 2002). Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm được khảo sát ở các loại nitơ khác nhau như peptone, yeast

extract, malt extract, beef extract, NH_4NO_3 và đối chứng không bổ sung, kết quả ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus* EV8 được trình bày trong Hình 4.

Cụ thể, hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với nguồn nitơ bổ sung ban đầu là peptone với hàm lượng lovastatin là 4,57 mg/g cơ chất; kế đến là nguồn nitơ bổ sung là yeast extract và malt extract, với hàm lượng lovastatin lần lượt là 3,92 mg/g cơ chất; 3,72 mg/g cơ chất và thấp nhất là nguồn nitơ bổ sung NH_4NO_3 và không bổ sung, hàm lượng lovastatin chỉ đạt 3,25 mg/g cơ chất và 3,01 mg/g cơ chất.



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* EV8

Kết quả nghiên cứu tương tự như nghiên cứu của Manzoni và Rollini (2002) cho rằng, peptone và yeast extract là nguồn nitơ tốt nhất cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus*, hàm lượng lovastatin đạt lần lượt là 3,72 mg/g và 3,40 mg/g cơ chất khô lên men. Nghiên cứu của Foukia và cs. (2016a) cho rằng, nguồn nitơ là peptone và yeast extract thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin

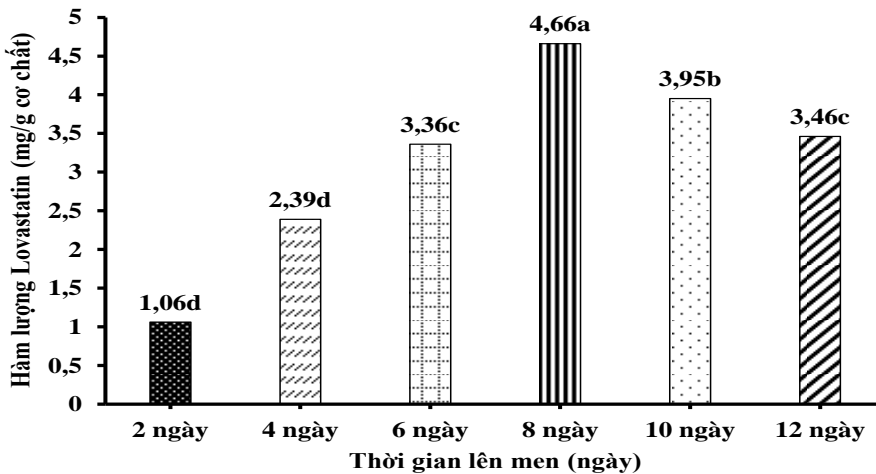
từ nấm *Asperillus fumigatus*, hàm lượng lovastatin đạt 0,318 và 0,302 mg/mL. Hơn nữa nghiên cứu của Chaynika và Shivakumar (2017) cho rằng, peptone là nguồn nitơ tốt nhất cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus*, hàm lượng lovastatin đạt tối đa 3,17 mg/g cơ chất. Trong khi đó, Jabeti và cs. (2016) cho rằng, yeast extract, đậu nành và ngô là nguồn nitơ tốt nhất cho quá trình sản xuất

lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* và được sử dụng rộng rãi hơn so với peptone. Tóm lại, nguồn nitơ bổ sung thích hợp cho quá trình lên men sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* EV8 là peptone (5 g/L), hàm lượng lovastatin đạt 4,57 mg/g cơ chất và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.5 Ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình sản xuất lovastatin

Thời gian lên men là một yếu tố quan trọng khác để tối ưu hóa quá trình sản xuất lovastatin trong quá trình lên men bán rắn. Thời gian lên men ngắn có thể góp phần hiệu quả để tăng lợi nhuận khi sản xuất ở quy mô công nghiệp (Sadia và

cs., 2017). Để xác định thời gian lên men tối ưu, các bình lên men được nuôi trong các khoảng thời gian khác nhau (2 - 12 ngày). Hàm lượng lovastatin được phân tích 48 giờ sau khi lên men. Thời gian lên men khác nhau sẽ ảnh hưởng đến quá trình sản xuất lovastatin của *Asperillus terreus* EV8 và hiệu suất sản xuất sẽ khác nhau (Hình 6). Cụ thể, hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với thời gian lên men là 8 ngày với hàm lượng là 4,66 mg/g cơ chất; kế đến là thời gian lên men là 10 ngày với hàm lượng lovastatin lần lượt là 3,95 mg/g cơ chất và thấp nhất với thời gian lên men 2 ngày, hàm lượng lovastatin chỉ đạt 1,06 mg/g cơ chất.



Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* EV8.

Kết quả này tương tự với kết quả của Siamak và cs. (2011) cho rằng nấm *Aspergillus terreus*, sản xuất lovastatin đạt cao nhất 55 mg/lít môi trường trong thời gian lên men là 7 ngày. Hơn nữa, các nghiên cứu trước đây cũng cho rằng, thời gian lên men 6-10 ngày là tối ưu cho quá trình sản xuất lovastatin từ các loài nấm khác nhau. Foukia và cs. (2016a) cho rằng, hàm lượng lovastatin đạt cao nhất vào ngày thứ 9 của quá trình lên men của nấm *Aspergillus terreus* và đạt hàm lượng 0,97 mg/mL khi sản xuất lovastatin từ nấm

Asperillus terreus. Hơn nữa, nghiên cứu của Foukia và cs. (2016b), hàm lượng lovastatin đạt cao nhất vào ngày thứ 12 của quá trình lên men và đạt hàm lượng 3,53 mg/g cơ chất khi sản xuất lovastatin từ nấm *Aspergillus fumigatus*. Thời gian lên men chịu ảnh hưởng của quá trình sinh trưởng của nấm, trong giai đoạn đầu tăng trưởng (trophase), sợi nấm tăng trưởng tăng theo cấp số nhân và ít hoặc không có chất chuyển hóa thứ cấp được tạo ra, khi nấm bước vào giai đoạn thứ hai (idiophase), sinh khối trở nên ổn định và

các chất chuyển hóa thứ cấp được tổng hợp cho đến khi bắt đầu quá trình ly giải (Martin và Demain, 1980). Như vậy, thời gian lên men thích hợp cho quá trình lên men sản xuất lovastatin của nấm *Asperillus terreus* EV8 là 8 ngày, với hàm lượng lovastatin đạt 4,66 mg/g cơ chất và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Nấm *Asperillus terreus* là nguồn tiềm năng và phong phú để sản xuất lovastatin trong tự nhiên, góp phần tạo nguồn nguyên liệu cho quá trình sản xuất các sản phẩm có khả năng hỗ trợ và điều trị bệnh. Điều kiện thích hợp cho quá trình lên men bán rắn để sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus* EV8 là cơ chất (gạo trắng), pH môi trường (pH=6), nguồn carbon bổ sung (glucose 5 g/L), nguồn nitơ (peptone 5 g/L) và thời gian lên men (8 ngày), cho hàm lượng lovastatin đạt cao nhất 4,66 mg/g cơ chất.

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn các thành viên của Trung tâm Công nghệ sinh học tỉnh An Giang và Sở Khoa học và Công nghệ An Giang đã tạo điều kiện và hỗ trợ để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aravindan, R., Seenivasan, A., Subhagar, S., & Viruthagiri, T. (2008). Microbial Production and Biomedical Applications of Lovastatin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(6), 701 - 709.
- Arjumand, A., Hamid Mukhtar, Gohar, U. F., & Ul-Haq, Ikram. (2013). Production of lovastatin from *Aspergillus terreus* through submerged fermentation. *Pakistan Journal of Botany*, 45(5), 1795 - 1800.
- Atalla, M. M., Hamid, E. R., & El-Shami, A. R. (2008). Optimization of culture medium for increased mevinolin production by *Aspergillus terreus* strain. *Malaysian Journal of Microbiology*, 4(2), 6 - 10.
- Casas López, J. L., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M., Rodríguez Porcel, E. M., & Chisti, Y. (2005). Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *Journal of Biotechnology*, 116(1), 61-77.
- Chaynika, P., & Shivakumar, S. (2017). Lovastatin Production from Agrowastes using *Aspergillus terreus* by Solid state fermentation. *Advances in Bioresearch*, 8(4), 216 - 224.
- Foukia, E. M., Elkomy, M. M., & Abo Elsoud, M. (2016a). Optimization of Lovastatin production under sub-merged fermentation and its effect on cholesterol blood level in rats. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*, 3(4), 33 - 42.
- Foukia, E. M., Ghada, S. Ibrahim., & Mostafa M. Abo Elsoud. (2016b). Optimization of lovastatin production from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(2), 253 - 259.
- Hajjaj, H., Niederberger, P., & Duboc, P. (2001). Lovastatin Biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a Chemically Defined Medium. *Appl Environ Microb*, 67(6), 2596- 2602.
- Kysilka, R. (1993). Determination of lovastatin (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids. *Journal of Chromatography*, 630(1), 415 - 417.
- Latha, P. M., Chanakya, P., Srikanth, M. (2012). Lovastatin production by *Aspergillus fischeri* under solidstate fermentation from coconut oil cake. *Nepal Journal of Biotechnology*, 2, 26-36.
- Madan, M., & Thind, K. S. (2000). *Physiology of fungi*. 1st edition. A. P. H. publishing corporation. New Delhi. 52 - 54.
- Manzoni, M., & Rollini, M. (2002). Biosynthesis and Biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 58, 555 - 564.
- Martin, J. F., & Demain, A. L. (1980). *Microbiol. Rev.*, 44, 230-251. Cited in (P.S. Masurekar. (1992). Therapeutic Metabolites). Chapter 10 (PP. 241-301) in *Biotechnology of Filamentous Fungi, Technology and Products*. Finkelstein, D. B., & Ball, C. (Editors). Butterworth-Heineman, Boston, London, Sydney, Toronto.
- Mouafi, M. M. E., & Mostafa, M. A. E. (2016). Optimization of Lovastatin production

- under sub-merged fermentation and its effect on cholesterol blood level in rats. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences (JIPBS)*, e-ISSN: 2349 - 2759.
- Nathiya, K., Nath, S. S., & Angayarkanni, J. (2011). Screening of a high glutaminolytic producing strain and its extracellular production by solid state fermentation. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(3), 297 - 302.
- Sadia, J., Meraj, M., Mahmood, S., Hameed, A., Naz, F., Hassan, S., & Irfan, R. (2017). Biosynthesis of lovastatin using agro-industrial wastes as carrier substrates. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research February*, 16(2), 263 - 269.
- Jian, C., & Yang, Z. (2013). *Solid State Fermentation for Foods and Beverages*. CRC Press.
- Samiee, S. M., Moazami, N., Haghghi, S., Mohseni, F. A., & Mirdamadi, S. (2003). Screening of Lovastatin Production by Filamentous Fungi. *Iran Biomedical Journal*, 7(1), 1 - 5.
- Siamak, M. S., Nasrin, M., Saeid, H., Farzaneh, A. M., Saeid, M., & Mohammad, R. B. (2003). Screening of lovastatin production by filamentous fungi. *Iran Biomedical Journal*, 7(1), 29-33.
- Szakacs, G., Morovjan, G., & Tengerdy, R. P. (1998). Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology letter*, 6(2), 411 - 415.
- Valera, H. R., Gomes J., Laxmi, S., Gururaj, R., Suryanarayan, S., & Kumar, D. (2005). Lovastatin production by SSF using *Aspergillus flavipes*. *Enzymes and Microbial Techology*, 37(5), 521 - 526.
- Wei, P., Xu, Z., & Cen, P. (2007). Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*, 8(9), 1521-1526.
- Seenivasan, A., Subhagar, S., Aravindan, R., & Viruthagir, T. (2008). Microbial production and biomedical applications of lovastatin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(6), 701 - 709.
- Subhan, M., Faryal, R., & Macreadie, I. (2016). Exploitation of *Aspergillus terreus* for the Production of Natural Statins. *Journal of Fungi*, 2, 13. doi: 10.3390/jof2020013.
- Praveen, V. K., Bhargavi, S. D., & Savitha, A. (2017). Lovastatin production by *Aspergillus terreus* (KM017963) in submerged and solid state fermentation: a comparative study. *American Journal of Pharmacy and Health Research*, 3(7), 116 - 126.
- Carlos, R. S., Eduardo, S., Costa Luiz, Fe., & Junior, A. (2017). Recent developments and innovations in solid statefermentation. *Biotechnology research and Innovation*, 1(1), 52 - 71.
- Pandey, V. V., Varshney, V. K., & Pandey, A. (2019). Lovastatin: A Journey from Ascomycetes to Basidiomycetes Fungi. *Journal of Biologically Active. Products from Nature*, 9(3), 162 - 178.