

# Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp protease của một số chủng nấm mốc thuộc chi *Aspergillus*

Nguyễn Thị Minh Khanh<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Trang<sup>1</sup>,  
Lê Hồng Quang<sup>1</sup>, Phạm Thị Lan Anh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Hoá sinh thực phẩm, Viện Công nghiệp Thực phẩm, Bộ Công Thương

<sup>2</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 15/4/2020; ngày chuyển phản biện 17/4/2020; ngày nhận phản biện 19/5/2020; ngày chấp nhận đăng 12/6/2020

## Tóm tắt:

Nấm mốc *Aspergillus* là một trong những chi nấm được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt trong công nghệ chế biến, công nghệ sản xuất enzyme, bởi nó có khả năng tổng hợp nhiều loại enzyme như: amylase, invertase, protease, pectinase. Nghiên cứu này khảo sát khả năng sinh tổng hợp protease của một số chủng nấm mốc trong sưu tập giống của Trung tâm Vi sinh vật công nghiệp, Viện Công nghiệp Thực phẩm. Từ 10 chủng nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* không sinh aflatoxin, kết quả sàng lọc cho thấy, 5 chủng có khả năng sinh tổng hợp protein thấp, 2 chủng cho khả năng sinh protease trung bình và 3 chủng cho khả năng sinh protease cao. Kết quả khảo sát hoạt tính protease theo thời gian nuôi cấy cho thấy, chủng *A. oryzae* CNTP 5043 cho hoạt tính protease cao nhất ở 72 giờ, đạt 645,6 UI/g; tiếp theo là *A. oryzae* CNTP 5027 sau 96 giờ nuôi cấy đạt 535,5 UI/g và *A. oryzae* CNTP 5082 đạt 408,5 IU/g sau 72 giờ nuôi cấy. Như vậy, 3 chủng nấm mốc thể hiện tiềm năng lớn trong việc tạo chế phẩm enzyme thô ứng dụng trong chế biến thực phẩm. Các chủng này sẽ được lựa chọn để nghiên cứu sâu hơn nữa các điều kiện phù hợp để sản sinh enzyme với hoạt tính cao.

**Từ khóa:** chủng nấm mốc *Aspergillus*, hoạt tính enzyme protease, sinh tổng hợp enzyme protease.

**Chỉ số phân loại:** 1.6

## Mở đầu

Enzyme là chìa khoá quan trọng của rất nhiều phản ứng thủy phân, được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là trong ngành chế biến thực phẩm. Nguồn cung cấp enzyme phổ biến nhất hiện nay là từ vi sinh vật, bởi những ưu điểm nổi trội của chúng như: sản lượng lớn, sinh sản nhanh trên môi trường đơn giản, rẻ tiền, cho hoạt tính thủy phân cao [1]. Một trong những nhóm enzyme được ứng dụng rộng rãi trong thực tiễn là enzyme protease. Protease là enzyme xúc tác quá trình thủy phân liên kết peptit (-CO-NH-)n trong phân tử protein và polypeptit cho sản phẩm cuối cùng là các axit amin. Protease được sử dụng nhiều trong một số ngành sản xuất như: chế biến thực phẩm, y tế, nông nghiệp... Cũng như một số nhóm enzyme khác, protease có nguồn gốc từ vi sinh vật là phong phú nhất. Protease có thể tìm thấy ở vi khuẩn, nấm mốc và xạ khuẩn.

Trong các loài nấm mốc thì chi *Aspergillus* là một trong những chi nấm có ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là ứng dụng trong các ngành công nghệ chế biến, công nghệ lên men, công nghệ sản xuất enzyme, bởi *Aspergillus* có khả năng sinh ra nhiều loại enzyme như: amylase, invertase, protease, pectinase... [2]. Trong hơn 200 loài thuộc chi nấm

mốc *Aspergillus*, một số loài được sử dụng phổ biến trong các sản phẩm truyền thống ở các nước châu Á phải kể đến là *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. niger*... [3, 4]. Các loài nấm mốc này được sử dụng trong quy trình chế biến nhiều sản phẩm truyền thống như: nước tương, nước mắm, các sản phẩm thủy phân từ cá giàu đạm. Chúng thường được sử dụng dưới dạng chế phẩm enzyme thô để thủy phân protein thành axit amin.

Đa dạng hoá các dạng sản phẩm thực phẩm, sử dụng các chủng nấm mốc có lợi như các loài nấm mốc *A. oryzae*, *A. sojae*... là một trong những hướng phát triển của ngành công nghiệp chế biến ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, với mục đích phát triển sản phẩm đủ đủ lên men sử dụng các chủng nấm mốc có lợi thuộc chi *Aspergillus*, chúng tôi đã nghiên cứu tuyển chọn được các chủng có khả năng sinh tổng hợp protease cao để làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

## Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### *Nguyên liệu và địa điểm nghiên cứu*

Thí nghiệm được tiến hành tại Trung tâm Hoá sinh thực phẩm, Viện Công nghiệp Thực phẩm. 10 chủng nấm mốc

\* Tác giả liên hệ: Email: minhkhkhanh@firi.vn

# Investigation of protease biosynthesis of some molds of the genus *Aspergillus*

Thi Minh Khanh Nguyen<sup>1\*</sup>, Thi Trang Nguyen<sup>1</sup>,  
Hong Quang Le<sup>1</sup>, Thi Lan Anh Pham<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Center of Food Biochemistry, Food Industries Research Institute

<sup>2</sup>Faculty of Biology, University of Science,  
Vietnam National University, Hanoi

Received 15 April 2020; accepted 12 June 2020

## Abstract:

*Aspergillus* species is one of the genera widely used in many fields, especially in food processing and enzyme production. Because, *Aspergillus* can produce many enzymes such as amylase, invertase, protease, and pectinase. This study examined the protease biosynthesis capacity of some mold strains from the collection of the Center for Industrial Microbiology, Food Industry Institute. From 10 selected strains of *Aspergillus* genus, unable to produce aflatoxin after the preliminary selection process, the result exhibited 3 separate groups: 05 strains with low protein biosynthesis, 02 strains for average protease fertility, and 03 strains for high protease production. The results of the protease activity survey indicated that *A. oryzae* CNTP 5043 strain showed the highest protease activity at 72 hours and reached 645.6 UI/g, followed by *A. oryzae* CNTP 5027 with 96 hours of culture reached 535.5 UI/g, and *A. oryzae* CNTP 5082 reached 408.5 UI/g after 72 hours of culture. Thus, 3 strains demonstrated great potential in creating crude enzyme preparations for food processing. These strains will be selected for further study of suitable conditions for enzyme production with high activity.

**Keywords:** activities of protease enzyme, biosynthesis of protease enzyme, strain of *A. oryzae*.

**Classification number:** 1.6

được phân lập và lưu trữ tại Trung tâm Vi sinh vật công nghiệp, Viện Công nghiệp Thực phẩm. Các chủng nấm mốc được lựa chọn là những chủng không có khả năng sinh aflatoxin và an toàn cho sử dụng trong thực phẩm được ký hiệu là: *A. niger* CNTP 5014, *A. sojae* CNTP 5026, *A. sojae* Sakaguchi Yamada CNTP 5048, *A. sojae* f. *Sp. flavoviridis* Ohmasa CNTP 5048, *A. sojae* CNTP 5027, *A. oryzae* CNTP 5039, *A. oryzae* CNTP 5042, *A. oryzae* CNTP 5043, *A. oryzae* CNTP 5081, *A. oryzae* CNTP 5082.

## Hóa chất và môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Các hoá chất chính được sử dụng trong nghiên cứu gồm: agar, ethanol (Việt Nam), peptone (Merck), glucose, casein, NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Trung Quốc), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck), dung dịch tricloacetic acid (TCA, HIMEDIA), thuốc thử Folin, tyrosin (HIMEDIA).

Môi trường PDA (11) có thành phần gồm: 200 ml dịch chiết khoai tây (4°Bx), 20 g glucose, 20 g agar và nước cất.

Môi trường bán rắn nuôi cấy nấm mốc: 70% bột ngô mảnh, 30% bột mỳ (ngô mảnh được mua tại chợ khu vực Thanh Xuân, Hà Nội với độ ẩm 16%; bột mỳ hiệu Meizan).

## Phương pháp nghiên cứu

### Phương pháp vi sinh vật:

Khảo sát một số đặc điểm sinh trưởng của các chủng nấm mốc được lựa chọn: các chủng nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường PDA. Khuẩn lạc nấm mốc sau 3 ngày nuôi cấy được cấy chuyển, giữ giống trên môi trường PDA và bảo quản trong tủ lạnh thường (4-6°C). Quan sát sự phát triển của khuẩn lạc và vi sợi nấm bằng kính hiển vi quang học (Lieca DM2700M) với vật kính 40X.

Tuyển chọn sơ bộ các chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp protease cao: khả năng sinh tổng hợp protease được đánh giá dựa trên sự thủy phân casein trong môi trường casein-aga. Thí nghiệm sử dụng chất chỉ thị Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250). Đánh giá khả năng sinh tổng hợp protease bằng cách so sánh đường kính vòng phân giải casein trên môi trường casein-agar. Các chủng có đường kính đường thủy phân càng lớn thì khả năng sinh tổng hợp protease càng cao và ngược lại. Các chủng nấm mốc sau khi kích hoạt được nuôi cấy trên đĩa petri, bằng môi trường PDA trong 2-3 ngày, ở nhiệt độ 30±1°C. Sau đó, bổ sung nước cất và lắc đều đĩa petri để thu dịch huyền phù bào tử nấm với mật độ 10<sup>5</sup> CFU/ml [5]. Môi trường casein-agar được chuẩn bị với các thành phần sau: glycerol 0,5%, cao nấm men 0,3%, NaCl 0,5%, agar 2% và casein 1%. Các thành phần môi trường trừ casein được pha với nước cất, casein được pha bằng cách đun sôi cách thủy trong

đệm Sorensen đến tan hoàn toàn, bổ sung vào dung dịch các thành phần còn lại và định mức cho đủ lượng môi trường cần dùng, chỉnh pH môi trường về 5 [6]. Môi trường được hấp khử trùng và đổ ra đĩa petri, dùng dụng cụ đục lỗ trên đĩa thạch (đường kính 4 mm). Bổ sung 0,3 ml dịch huyền phù có chứa bào tử các chủng nấm mốc đã được chuẩn bị ở trên, nuôi ở nhiệt độ  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  trong 24 giờ. Sau đó nhỏ dung dịch Coomassie Brilliant Blue R-250 lên bề mặt thạch, để trong 2 giờ. Đo đường kính vòng thủy phân và vòng phát triển nấm mốc (mm). Đường kính thủy phân = Đường kính vòng Halo - Đường kính khuẩn lạc [7].

#### Phương pháp hóa sinh:

Xác định hoạt tính protease của các chủng nấm mốc: hoạt độ enzyme được xác định dựa trên khả năng thủy phân casein bởi enzyme có trong chế phẩm nghiên cứu. Hoạt độ protease được xác định dựa theo phương pháp Anson (1938) và Folin cùng cộng sự (1929) với cơ chất là casein [8, 9].

Sinh khối nấm mốc sau khi nuôi cấy trên môi trường bán rắn (70% ngô mảnh, 30% bột mỳ) được sấy ở  $40^\circ\text{C}$  trong 6 giờ, làm nguội trong bình hút ẩm, bao gói và bảo quản lạnh [10].

Cân 1 g mẫu, nghiền mịn và thêm vào 50 ml nước cất. Lắc hỗn hợp để trích ly enzyme (tốc độ 180 vòng/phút, trích ly trong 30 phút). Lọc hỗn hợp để thu dịch trích ly, bảo quản ở  $4^\circ\text{C}$  để phân tích. Chuẩn bị phản ứng thủy phân bằng cách lấy 1 ml dung dịch enzyme, bổ sung vào 2 ml dung dịch casein 2% (casein pha giống như trình bày trên, thay đổi theo nồng độ yêu cầu), ủ ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$  trong 10 phút để phản ứng thủy phân xảy ra. Phản ứng kết thúc bằng cách bổ sung 5 ml dung dịch tricloacetic acid (TCA) 5% (để bất hoạt enzyme và kết tủa chất không được thủy phân), lắc đều, để ở nhiệt độ phòng trong thời gian 10 phút, lọc kết tủa, thu dịch. Dung dịch thu được dùng để làm phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin 0,2 N có mặt  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6%. Cho 1 ml dịch lọc enzyme và 4 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6% lắc đều. Sau đó, cho thêm 1 ml thuốc thử Folin 0,2 N lắc đều, giữ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 750 nm để xác định hoạt độ protease [10].

Đơn vị hoạt độ protease là lượng enzyme chuyển hoá được một lượng casein natri thành dạng không bị kết tủa bởi acid tricloacetic tương đương với 1 mmol tyrosin ở  $30^\circ\text{C}$  trong thời gian 1 phút [11].

Hoạt độ protease được tính dựa vào đường chuẩn tyrosin  $y = 0,0086x + 0,55$  với  $R^2 = 0,978$ , trong đó y là mật độ quang của dịch enzyme thủy phân đo ở bước sóng 750 nm; x là nồng độ tyrosin (mmol/ml). Tính hoạt độ protease của 1 mg mẫu theo công thức:

$$Hđ_{\text{protease}} \text{ (UI/g)} = \frac{\mu\text{mol tyrosin} \times 8 \times 50}{t \times m}$$

Trong đó:  $\mu\text{mol tyrosin}$  được tính ra từ đường chuẩn; 8: tổng thể tích toàn bộ hỗn hợp phản ứng (1 ml enzyme + 2 ml casein + 5 ml TCA); 50: độ pha loãng chế phẩm ( $L=50$  ml); t: thời gian để enzyme tác dụng với cơ chất (10 phút); m: khối lượng mẫu chế phẩm đem đi xác định hoạt tính ( $m=1$  g). Các thí nghiệm lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

## Kết quả và thảo luận

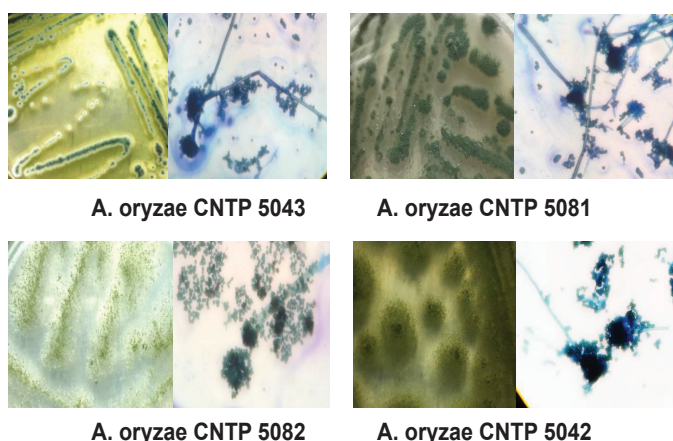
### Nghiên cứu một số đặc điểm của các chủng nấm mốc được chọn lọc

10 chủng nấm mốc được tuyển chọn trong bộ sưu tập giống của Trung tâm Vi sinh vật công nghiệp, Viện Công nghiệp Thực phẩm. Các chủng nấm mốc được lựa chọn là những chủng không sinh aflatoxin. Các chủng được khảo sát sơ bộ về một số đặc điểm hình thái và đặc điểm phát triển trên môi trường thạch PDA. Các chủng được lựa chọn đa số là các chủng thuộc loài *A. oryzae*, số còn lại thuộc loài *A. sojae* và *A. niger*. Mục đích của nghiên cứu là sàng lọc các chủng nấm mốc phù hợp để sử dụng cho quá trình nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất sản phẩm du đủ lên men giàu hoạt chất chống oxy hoá. Một số đặc điểm phát triển và màu sắc khuẩn lạc được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1. Một số đặc điểm của các chủng nấm mốc.**

| STT | Tên loài                                                | Tên chủng | Địa điểm phân lập | Màu khuẩn lạc | Thời gian xuất hiện bào tử (ngày) |
|-----|---------------------------------------------------------|-----------|-------------------|---------------|-----------------------------------|
| 1   | <i>A. niger</i>                                         | CNTP 5014 | Nga               | Xám trắng     | 3                                 |
| 2   | <i>A. sojae</i>                                         | CNTP 5026 | Việt Nam          | Vàng nâu      | 2                                 |
| 3   | <i>A. sojae</i>                                         | CNTP 5027 | Hungari           | Xanh đen      | 1                                 |
| 4   | <i>A. oryzae</i>                                        | CNTP 5039 | Nga               | Xanh rêu đậm  | 3                                 |
| 5   | <i>A. oryzae</i>                                        | CNTP 5042 | Việt Nam          | Vàng nâu      | 2                                 |
| 6   | <i>A. oryzae</i>                                        | CNTP 5043 | Nhật Bản          | Xanh rêu      | 3                                 |
| 7   | <i>A. sojae</i><br>Sakaguchi<br>Yamada                  | CNTP 5048 | Nhật Bản          | Vàng nâu      | 2                                 |
| 8   | <i>A. sojae f. sp.</i><br><i>Flavoviridis</i><br>Ohmasa | CNTP 5049 | Việt Nam          | Xanh đen      | 1                                 |
| 9   | <i>A. oryzae</i>                                        | CNTP 5081 | Nhật Bản          | Xanh rêu      | 2                                 |
| 10  | <i>A. oryzae</i>                                        | CNTP 5082 | Trung Quốc        | Vàng nâu      | 2                                 |

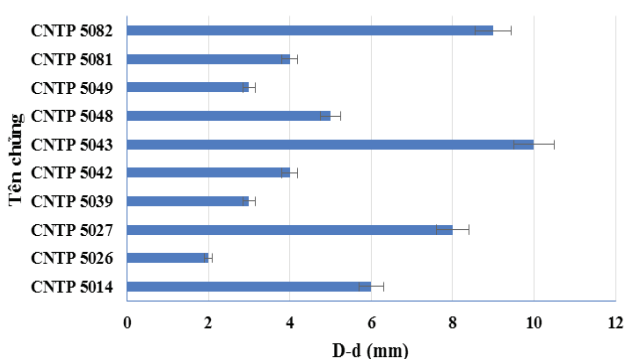
Trong tổng số 10 chủng nấm mốc nghiên cứu đa số các chủng đều có màu sắc khuẩn lạc là vàng nâu hoặc xanh rêu. Đây là những màu sắc đặc trưng cho những khuẩn lạc của các chủng nấm mốc thuộc các loài như *A. oryzae*, loài *A. sojae* và *A. niger*. Hình ảnh đại diện của một số chủng nấm mốc được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc và vi sợi của một số chủng nấm mốc trên môi trường PDA, thời gian 3 ngày.

### Tuyển chọn sơ bộ các chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp protease cao

Hoạt tính của enzyme protease có thể được đánh giá bằng sự xuất hiện của vòng thủy phân xung quanh vòng phát triển của nấm mốc như trình bày ở phần phương pháp [12]. Kết quả thu được về đường kính thủy phân của 10 chủng nấm mốc trên môi trường bổ sung 1% casein được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Đường kính thủy phân của 10 chủng nấm mốc trên môi trường bổ sung 1% casein.

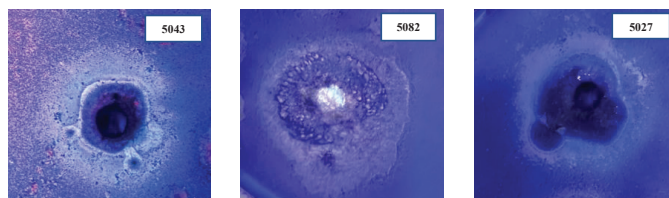
Kết quả ở hình 2 cho thấy, các chủng nấm mốc được phân chia thành các nhóm khác nhau dựa vào hiệu số D-d (D - đường kính vòng phân giải bên ngoài; d - đường kính vòng phát triển của nấm men). D-d:  $\leq 5$  mm - khả năng phân giải protease yếu; D-d: 5-7 mm - khả năng phân giải protease trung bình; D-d:  $\geq 8$  mm - khả năng phân giải protease mạnh.

Từ kết quả đánh giá sơ bộ khả năng thủy phân casein của 10 chủng nấm mốc cho thấy, đường kính thủy phân của các chủng biến thiên từ 2 đến 12 cm. Có 5 chủng có khả năng

thủy phân casein thấp là các chủng: CNTP 5081, CNTP 5049, CNTP 5042, CNTP 5039 và CNTP 5026. Có 2 chủng thể hiện khả năng thủy phân casein trung bình là các chủng: CNTP 5048 và CNTP 5014. Có 3 chủng cho khả năng thủy phân casein ở mức cao là các chủng: CNTP 5082, CNTP 5043 và CNTP 5027.

### Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp protease của 3 chủng nấm mốc có khả năng sinh enzyme cao ký hiệu là CNTP 5082, CNTP 5043 và CNTP 5027

Phương pháp kiểm tra hoạt tính enzyme protease dựa vào khả năng thủy phân casein và tạo vòng halo quanh khuẩn lạc là phương pháp phổ biến dùng để đánh giá sàng lọc các chủng nấm mốc, vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp protease đã được nhiều tác giả trong nước và nước ngoài sử dụng [6, 7, 12]. Sau khi đánh giá sơ bộ, các chủng nấm mốc đã được phân chia thành các nhóm riêng biệt, chủng nấm mốc trong nhóm cho khả năng thủy phân casein cao sẽ được tiếp tục nghiên cứu đánh giá hoạt tính enzyme protease. Hình ảnh vòng thủy phân casein của các chủng thuộc nhóm có khả năng thủy phân casein cao được thể hiện ở hình 3.

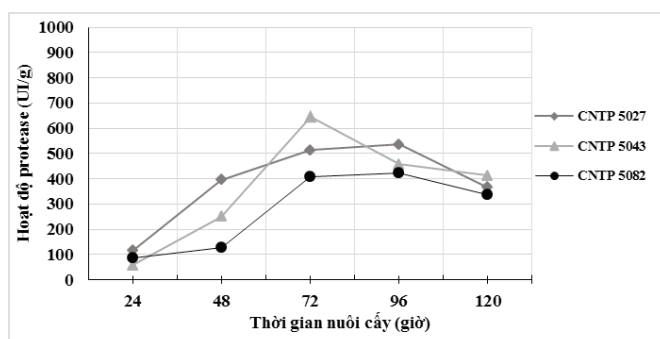


Hình 3. Hình ảnh vòng thủy phân casein của các chủng thuộc nhóm có khả năng thủy phân casein cao.

### Đánh giá hoạt tính enzyme của các chủng nấm mốc A. oryzae tuyển chọn được có hoạt tính protease cao nhất ký hiệu CNTP 5027

Từ kết quả đánh giá hoạt tính protease của 3 chủng nấm mốc đã được phân nhóm sơ bộ cho thấy, theo thời gian nuôi cấy hoạt tính protease của các chủng có sự biến đổi rõ rệt. Đối với chủng nấm mốc CNTP 5027 thời gian nuôi cấy cho hoạt lực protease đạt cao nhất (là 535,5 UI/g) ở 96 giờ, hoạt lực protease bắt đầu giảm khi tiếp tục nuôi đến 120 giờ. Đối với 2 chủng còn lại là CNTP 5043 và CNTP 5082, thời gian để hoạt lực protease đạt cao nhất lại là 72 giờ nuôi cấy (lần lượt là 645,6 UI/g và 408 UI/g). Nếu tiếp tục giữ đến 96 giờ sẽ giảm hoạt lực của enzyme protease. Sự sụt giảm hoạt lực protease diễn ra mạnh mẽ ở chủng CNTP 5043. Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ protease của các chủng nấm mốc cũng đã được nhóm tác giả Dương Thị Hương và Nguyễn Hiền Trang (2018) khảo sát với sự kết hợp của 2 chủng *A. oryzae* KZ3 và *A. awamori*

HK1, đã chỉ ra rằng hoạt độ protease đạt cực đại ở thời gian nuôi cấy là 72 giờ [10].



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ protease của các chủng nấm mốc.

Kết quả hình 4 cho thấy, trong 3 chủng có khả năng sinh tổng hợp protease cao thì có chủng *A. oryzae* CNTP 5043 có hoạt lực protease cao nhất (645,6 UI/g), tiếp theo là chủng CNTP 5027 (535,5 UI/g) và chủng cho hoạt lực protease thấp nhất là CNTP 5082. Kết quả này đối chiếu lại với kết quả tuyển chọn sơ bộ ở phần trên là hoàn toàn phù hợp.

## Kết luận

Từ 10 chủng nấm mốc được lựa chọn để nghiên cứu, sau quá trình khảo sát sơ bộ khả năng sinh tổng hợp protease đã lựa chọn được ra 3 chủng có khả năng thủy phân protein cao. Ba chủng nấm mốc được đánh giá hoạt độ protease theo thời gian nuôi cấy, kết quả cho thấy hoạt độ protease tăng dần ở thời điểm 48 tới 72 giờ và đạt hoạt độ cao nhất ở 72 giờ. Khi kéo dài thời gian nuôi cấy lên tới 96 giờ, hoạt lực protease giảm xuống. Như vậy, với mục tiêu lựa chọn các chủng nấm mốc cho khả năng sinh tổng hợp protease cao ta có thể lựa chọn 1 trong 3 chủng: *A. oryzae* CNTP 5043, *A. sojae* CNTP 5027 và *A. oryzae* CNTP 5082 (trong đó tốt nhất là chủng *A. oryzae* CNTP 5043, với thời gian nuôi cấy là 72 giờ đạt hoạt lực enzyme protease là 645,6 UI/g).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Nguyễn Thị Thảo và Quyền Đình Thi (2004), “Ảnh hưởng các yếu tố môi trường lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của chủng *Serratia* sp. DT3”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **2**(2), tr.205-226.

[2] Lương Đức Phẩm (2004), *Công nghệ vi sinh vật*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

[3] S.B. Hong, D.H. Kim, R.A. Samson (2015), “*Aspergillus* associated with Meju, a fermented soybean starting material for traditional soy sauce and soybean paste in Korea”, *Journal Microbiology*, **43**(2), pp.218-224.

[4] B. Mousavi, M.T. Hedayati, N. Hedayati, M. Ilkit, S. Syedmousavi (2016), “*Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards”, *Journal Current Medical Mycology*, **2**(1), pp.36-42.

[5] S. Shivakumar (2012), “Production and characterization of an acid protease from a local *Aspergillus* sp. by solid substrate fermentation”, *Archives of Applied Science Research*, **4**, pp.188-199.

[6] Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mười (2015), “Tuyển chọn các dòng nấm mốc *Aspergillus niger* sinh tổng hợp protease hoạt tính cao”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **41**, tr.12-20.

[7] Nguyễn Thị Hà và Nguyễn Châu Sang (2014), “Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn sản xuất protease kiềm tính ngoại bào từ đất”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **35**, tr.56-64.

[8] M.L. Anson (1938), “The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with heloglobin”, *Journal of General Physiology*, **22**, pp.79-89.

[9] O. Folin, V. Ciocattau (1929), “On tyrosine and tryptophan determination in protein”, *Journal of Biological Chemistry*, **73**, p.627.

[10] Dương Thị Hương và Nguyễn Hiền Trang (2018), “Sản xuất chế phẩm *Aspergillus oryzae* kết hợp *Aspergillus awamori* HK1 có khả năng sinh protease cao trên môi trường bán rắn (ngô mảnh - bột mỳ)”, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Kỹ thuật và Công nghệ*, **2A**(127), tr.55-68.

[11] Nguyễn Thị Ngọc Giang và Nguyễn Minh Thủy (2016), “Ảnh hưởng của điều kiện xử lý đến khả năng sinh enzyme amylase và protease từ *Aspergillus oryzae* trên koji nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.)”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **1**, tr.147-155.

[12] M.A.M. Abdalla, A.M. Mohamed, T. Katikya (2018), “Isolation and screening of extracellular protease enzyme from funfal isolates of soil”, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **12**(4), pp.2059-2067.