

THU NHẬN ENZYME CELLULASE CỦA *TRICHODERMA REESEI* TRÊN MÔI TRƯỜNG BÁN RẮN

Trần Thanh Phong, Hoàng Quốc Khánh, Võ Thị Hạnh, Lê Bích Phượng,
 Nguyễn Duy Long, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân
 Viện Sinh học Nhiệt đới – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

1. GIỚI THIỆU

Nhiều loài nấm sợi có khả năng sinh ra một lượng lớn cellulase thuộc giống *Alternaria*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*,... Trong đó *Trichoderma* và *Aspergillus* đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu để sản xuất cellulase (Bothast & Saha, 1997).

Cellulase là enzym đa cấu tử gồm: exoglucanase hay C_1 (EC 3.2.1.91), endoglucanase hay C_x (EC 3.2.1.4) và β -glucosidase (EC 3.2.1.21) hoạt động phối hợp để thủy phân cellulose thành glucose. Cellulase được ứng dụng để cải thiện giá trị dinh dưỡng của thức ăn gia súc, gia cầm; chế biến thực phẩm; trích ly các chất từ thực vật, từ cây thuốc; đường hóa các phế liệu giàu cellulose để sản xuất ethanol.

Việt Nam có lượng phụ phế liệu nông nghiệp thải ra rất dồi dào, trong đó lượng bã mía thải ra từ các nhà máy đường chiếm khoảng 20% mía nguyên liệu, trong bã mía có hàm lượng cellulose khoảng 50% và hemicellulose khoảng 25% nên có thể sử dụng như nguồn carbon để cảm ứng nấm sợi sinh tổng hợp cellulase.

Mục tiêu của bài báo này là thu nhận enzym cellulase của *T. reesei* VTT-D-80133 sinh trưởng trên cơ chất bã mía kết hợp với cám mì trong quá trình lên men bán rắn nhằm tận dụng bã mía để thu nhận enzym cellulase. Ảnh hưởng của các yếu tố (tỷ lệ bã mía/cám mì (BM:CM), độ ẩm ban đầu, nồng độ dinh dưỡng và thời gian nuôi cấy) đến sự sinh ra cellulase được nghiên cứu bằng phương pháp qui hoạch thực nghiệm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nấm sợi: Chủng *T. reesei* VTT-D-80133 nhận được từ bảo tàng giống Roal Oy, Phần Lan.

Cơ chất: Bã mía và cám mì.

Lên men bán rắn: Để xác định thành phần môi trường và các điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp enzym, nấm sợi được nuôi trên môi trường có tỷ lệ bã mía và cám mì khác nhau (7:3, 6:4, 5:5, 4:6 và 3:7), độ ẩm môi trường (từ 50-70%), nồng độ dinh dưỡng (dựa theo môi trường Mandel, x1-x8 hay 1-8 lần) và thời gian nuôi cấy từ 2-12 ngày.

Trích ly enzym: Cho 45 ml dung dịch đệm Na-acetate 50 mM pH 5 vào 5 g canh trường, lắc trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 5 phút, lọc thu dịch. Đem tủa dịch lọc bằng cồn 96⁰ được làm lạnh trước. Thu kết tủa và hòa lại với cùng thể tích dung dịch đệm.

Xác định hoạt tính các enzym: CMCase theo phương pháp của Công ty Shin Nihon - Nhật Bản với cơ chất là CMC 1%; FPU theo phương pháp của Hãng Biopract GmbH - Đức, với cơ chất là giấy lọc Whatman no. 1; Xylanase theo phương pháp của tổ chức EDC (Enzym Development Corporation, Mỹ), với cơ chất là xylan 1%; α -amylase theo phương pháp của Hãng Amano - Nhật Bản, với cơ chất là tinh bột 1%; Protease theo phương pháp của Công Ty Amano - Nhật Bản, với cơ chất là casein 1,5%.

Xác định hàm lượng protein: Theo phương pháp Bradford sử dụng bovine serum albumin như protein chuẩn.

Thủy phân giấy: cho dịch enzym cellulase (5 FPU/ml) vào giấy xay nhỏ (10%) ủ ở 50⁰C, pH 5 trong 24 giờ. Hiệu suất (%) = lượng đường khử (g)*0,9*(100/lượng giấy in (g))

Điện di protein: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel (SDS-PAGE) được thực hiện trên gel đứng chứa 10% (w/v) polyacrylamide.

Tối ưu hóa thành phần môi trường bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm:

Tỷ lệ BM:CM, độ ẩm ban đầu, nồng độ dung dịch dinh dưỡng và thời gian nuôi cấy là 4 yếu tố có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của *T. reesei* VTT-D-80133 nên được chọn để tối ưu hóa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tối ưu hóa thành phần môi trường và các điều kiện nuôi cấy.

Các kết quả thí nghiệm trước đây, chúng tôi đã xác định được thành phần môi trường cơ sở cho chủng *T. reesei* VTT-D-80133 sinh ra cellulase theo phương pháp tối ưu hóa cổ điển: tỷ lệ BM:CM (4:6), độ ẩm ban đầu 54%, 5 lần nồng độ dinh dưỡng, thời gian nuôi ủ 7 ngày, tỷ lệ giống 6×10^6 bào tử/g môi trường, hoạt tính cellulase đạt được là 251,43 IU/g.

Tuy nhiên, thành phần môi trường và các điều kiện nuôi cấy mới chỉ được nghiên cứu ảnh hưởng ở mức độ riêng rẽ. Trong năm yếu tố trên thì bốn yếu tố là tỷ lệ BM:CM, độ ẩm ban đầu, nồng độ dinh dưỡng và thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của *T. reesei* VTT-D-80133 nên được chọn để nghiên cứu tối ưu hóa theo phương pháp qui hoạch thực nghiệm.

Qui hoạch được thực hiện với ma trận đầy đủ với số thí nghiệm $N = 2^4 = 16$

Bảng 1. Mã hóa các biến số

| Các biến số | Mức dưới (-) | Mức trung bình (0) | Mức trên (+) |
|---|--------------|--------------------|--------------|
| X ₁ : Tỷ lệ BM:CM | 2:8 | 4:6 | 6:4 |
| X ₂ : Nồng độ dinh dưỡng (lần) | x2 | x5 | x8 |
| X ₃ : Độ ẩm ban đầu (%) | 50 | 54 | 58 |
| X ₄ : Thời gian nuôi cấy (giờ) | 3 | 7 | 11 |

Từ bảng 1, tiến hành nuôi cấy *T. reesei* trong các môi trường mà có đủ các yếu tố khảo sát ở trên hai mức. Kết quả xác định hoạt tính cellulase được ghi nhận trong bảng 2.

Bảng 2. Hoạt lực CMCase từ *T. reesei* theo thực nghiệm và theo phương trình hồi qui.

| TTN | X ₁ | X ₂ | X ₃ | X ₄ | y | y [^] |
|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|--------|----------------|
| 1 | 2:8 | x2 | 50 | 3 | 28,67 | 28,92 |
| 2 | 6:4 | x2 | 50 | 3 | 0,15 | 0,4 |
| 3 | 2:8 | x8 | 50 | 3 | 1,24 | 1,48 |
| 4 | 6:4 | x8 | 50 | 3 | 2,57 | 2,8 |
| 5 | 2:8 | x2 | 58 | 3 | 144,48 | 143,72 |
| 6 | 6:4 | x2 | 58 | 3 | 18,07 | 17,82 |
| 7 | 2:8 | x8 | 58 | 3 | 5,62 | 5,38 |
| 8 | 6:4 | x8 | 58 | 3 | 99,18 | 98,94 |
| 9 | 2:8 | x2 | 50 | 11 | 130,64 | 130,4 |
| 10 | 6:4 | x2 | 50 | 11 | 58,36 | 58,12 |

| | | | | | | |
|----|-----|----|----|----|--------|--------|
| 11 | 2:8 | x8 | 50 | 11 | 188,73 | 188,48 |
| 12 | 6:4 | x8 | 50 | 11 | 55,23 | 55 |
| 13 | 2:8 | x2 | 58 | 11 | 51,94 | 52,72 |
| 14 | 6:4 | x2 | 58 | 11 | 219,5 | 219,74 |
| 15 | 2:8 | x8 | 58 | 11 | 129,45 | 129,7 |
| 16 | 6:4 | x8 | 58 | 11 | 262,94 | 263,18 |
| 17 | 4:6 | x5 | 54 | 7 | 154,03 | |
| 18 | 4:6 | x5 | 54 | 7 | 155,07 | |
| 19 | 4:6 | x5 | 54 | 7 | 156,1 | |

Các hệ số trong phương trình hồi qui được xác định như sau:

- Tính b_0 : $b_0 = \frac{\sum_{i=1}^{16} y_i}{16}$, $b_0 = 87,30$

- Tính b_j : $b_j = \frac{\sum_{i=1}^{16} x_{ji} y_i}{16}$,

$b_1 = 2,2$; $b_2 = 5,82$,

$b_3 = 29,1$, $b_4 = 49,8$

- Tính b_{ij} : $b_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^{16} (x_j x_i) y_i}{16}$,

$b_{12} = 9,66$, $b_{23} = 2,08$,

$b_{13} = 31,32$, $b_{14} = 9,71$,

$b_{24} = 16,17$, $b_{34} = -0,24$,

$b_{123} = 13,58$, $b_{124} = -21,27$,

$b_{134} = 32,03$, $b_{234} = 6,17$,

$b_{1234} = -10,19$.

Hệ số có ý nghĩa phải thỏa mãn điều kiện:

$$t_j = \frac{|b_j|}{S_{bj}} > t_{\alpha}$$

Với t_{α} : $p = 0,05$, bậc tự do $f = n - 1 = 2$

$\Rightarrow t_{(0,05;2)} = 4,3$ (Tra bảng Student)

Với y : Hoạt tính CMCCase (UI/g) theo thực nghiệm;

y^{\wedge} : hoạt tính CMCCase (UI/g) theo phương trình hồi qui

S_{bj} phương sai của các hệ số:

$$S_{bj} = \frac{S_{th}}{\sqrt{N}} = \frac{1,03}{4} = 0,26 \text{ (với } N = 16, S_{th}^2 = \frac{\sum_{i=1}^3 (y_i^0 - \bar{y}_0)}{n-1} = 1,07 \text{ (với } n = 3) \Rightarrow S_{th} = 1,03))$$

So sánh các hệ số t_j với t_{li} ta thấy, các hệ số của phương trình đều có nghĩa, ngoại trừ các hệ số t_{34} .

Vậy hàm mục tiêu có dạng:

$$\hat{y} = 87,3 + 2,2x_1 + 5,82x_2 + 29,1x_3 + 49,8x_4 + 9,66x_1x_2 + 31,32x_1x_3 + 9,71x_1x_4 + 2,08x_2x_3 + 16,17x_2x_4 + 13,18x_1x_2x_3 - 21,57x_1x_2x_4 + 32,03x_1x_3x_4 + 6,17x_2x_3x_4 - 10,19x_1x_2x_3x_4$$

Từ phương trình hồi qui thu được, ta thấy rằng thời gian nuôi ủ, độ ẩm ban đầu và nồng độ dinh dưỡng có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính cellulase hơn tỷ lệ bã mía:cám mì.

Kiểm tra sự tương thích của mô hình

Để đánh giá sự sai lệch giữa thực nghiệm và mô hình ta dựa vào tiêu chuẩn Fisher.

Điều kiện để mô hình tương thích là: $F_m < F_{lt}$,

F_{lt} : giá trị chuẩn Fisher ở mức $p = 0,05$; $f_1 = N - l$; $f_2 = n - 1$; trong đó $N = 16$, l : số hệ số có ý nghĩa $= 15$, $n = 3$), $F_{(0,05;1;2)} = 18,5 = F_{lt}$ (Tra bảng tiêu chuẩn Fisher)

$$F_m: F_m = \frac{S_{tt}^2}{S_{th}^2} = \frac{2,00075}{1,07} = 1,87 \text{ (} S_{tt}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{16} (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - l} \text{)}$$

Ta có: $F_m < F_{lt}$ (vì $1,87 < 18,5$)

Vậy: Phương trình hồi qui thu được tương thích với thực nghiệm

Tối ưu hóa thực nghiệm theo kế hoạch leo dốc

Bảng 3. Môi trường nuôi cấy *T. reesei* VTT-D-80133 theo kế hoạch leo dốc

| Môi trường | X ₁ | X ₂ | X ₃ | y |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------|
| 1 | 4:6 | x5 | 54 | 265.7233 |
| 2 | 5:5 | x6 | 56 | 275.1800 |
| 3 | 6:4 | x7 | 58 | 276.2700 |
| 4 | 7:3 | x8 | 60 | 280.6400 |
| 5 | 8:2 | x9 | 62 | 280.0900 |
| 6 | 9:1 | x10 | 64 | 233.1800 |
| 7 | 10:0 | x11 | 66 | 140.4600 |

Kết quả cho thấy, môi trường 4 cho hoạt tính CMCase cao nhất (280,64 IU/g). Đây có lẽ là môi trường tương đối thích hợp cho *T. reesei* VTT-D-80133 sinh trưởng và tạo ra cellulase.

Vậy, giá trị lân cận tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của *T. reesei* VTT-D-80133 là: tỷ lệ BM:CM (7:3), 8 lần nồng độ dinh dưỡng, độ ẩm ban đầu 60%, thời gian nuôi cấy 7 ngày.

Kết quả kiểm chứng lại hoạt tính cellulase và các enzym khác trong canh trường như sau: CMCCase 280,63 UI/g, FPU 5 UI/g thấp hơn 3,2 và 37 lần so với chế phẩm Amano T. Ngoài cellulase, canh trường còn chứa: α -amylase 368,75 UI/g, protease 12,43 UI/g và xylanase 10073,25 BXU/g

Canh trường nuôi ủ *T. reesei* VTT-D-80133 ở thời điểm 0 giờ và sau 7 ngày, có pH tương đối ổn định (pH 5,4 – 5,05); hàm lượng đường tự do từ 66,77 mg/g giảm còn 35,05 mg/g do nấm sợi sử dụng lượng đường tự do có sẵn trong môi trường nuôi ủ, lượng đường tự do sinh ra trong quá trình sinh trưởng không đáng kể; hàm lượng protein từ 0,79 tăng lên 14,45 mg/g; trọng lượng khô của môi trường từ 8,01 g giảm còn 6,17 g cho thấy một lượng cơ chất trong môi trường được sử dụng.

3.2. Kết quả đường hóa giấy in đã qua sử dụng

Dịch chiết enzym cellulase (5 FPU/ml) đường hóa khoảng 20% giấy in đã qua sử dụng (10%) trong 24 giờ thủy phân ở 50°C, pH 5,0; dịch đường hóa chứa 23,62 mg đường khử/ml có thể được sử dụng để lên men ethanol hoặc lên men sản xuất các sản phẩm có giá trị.

3.3 Kết quả phân tách hệ cellulase trên gel SDS-PAGE

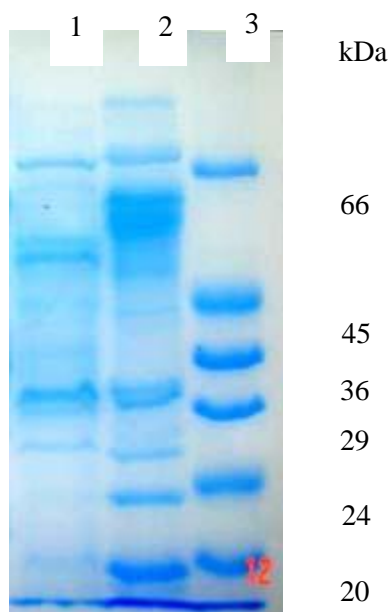
Kết quả điện di đồ trên gel SDS-PAGE của các dịch enzym cellulase ghi nhận được như hình bên.

Giếng 1: Dịch enzym từ *T. reesei* VTT-D-80133.

Giếng 2: Dịch enzym từ chế phẩm Amano T

Giếng 3: Thang phân tử lượng nhỏ

Kết quả cho thấy, giếng 1 có các vạch protein rất giống với giếng 2. Kết quả này có thể được giải thích như sau: theo Barnett (1991), hệ cellulase từ *T. reesei* gồm CBHI, CBHII, EGI, EGII, EGIII, EGV và một β -glucosidase; theo báo cáo gần đây thì *T. reesei* sinh ra hai loại β -glucosidase là Bgl1 và Bgl2 (Alinda A. Hasper et al., 2001). Dựa vào các dữ liệu trên, ta có thể kết luận rằng canh trường nuôi cấy *T. reesei* VTT-D-80133 có đầy đủ các tiểu phần của hệ cellulase



4. KẾT LUẬN

Môi trường tối ưu cho *T. reesei* VTT-D-80133 sinh ra cellulase là: tỷ lệ BM:CM (7:3), 8 lần nồng độ dinh dưỡng, độ ẩm ban đầu 60 %, thời gian nuôi cấy 7 ngày. Hoạt tính CMCCase và FPU

tương ứng là: 280,63 IU/g và 5 FPU/g; thấp hơn 3,2 và 37 lần so với Amano T. Ngoài cellulase, canh trường còn chứa α -amylase 368,75 UI/g, protease 12,43 UI/g và xylanase 10073,25 BXU/g

Qua phân tích trên gel polyacrylamide, cellulase thu nhận được có các vạch protein với trọng lượng phân tử bằng với các vạch protein của chế phẩm AmanoT.

Dịch enzym cellulase của *T. reesei* VTT-D-80133 với hoạt lực 5 FPU/ml, có khả năng đường hóa khoảng 20% giấy in đã qua sử dụng; dịch đường hóa chứa 23,62 mg đường khử/ml có thể được sử dụng để lên men ethanol hoặc lên men sản xuất các sản phẩm có giá trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Cảnh, *Qui hoạch thực nghiệm*, Trường ĐHBK Tp. Hồ Chí Minh (1993).
- [2]. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Trần Châu, Nguyễn Lân Dũng, *Enzym vi sinh vật*, tập 2, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội (1982).
- [3]. Chahal D. S., *Solid-state fermentation with Trichoderma reesei for cellulase production*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 49, No. 1, p. 205-210 (1985).
- [4]. Jeffries T. W., *Production and applications of cellulase laboratory procedures*, Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin (1987).
- [5]. Liming Xia, Xueliang Shen, *High-yield cellulase production by Trichoderma reesei ZU-02 on corn cob residue*, Bioresource Technology 91, pp. 259-262 (2004).
- [6]. Mary Bigelow and Charles E. Wyman, *Cellulase production on bagasse pretreated with hot water*, Applied Biochemistry and Biotechnology, pp. 98-100 (2002).
- [7]. Smits J.P., *Solid-state fermentation, modelling fungal growth and activity*, *The Doctor Thesis* (1998).
- [8]. Uhlig Helmut, Elfriede M. Linsmaier-Bednar, *Industrial enzymes and their applications*, Awiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc (1998).