

TINH SẠCH SƠ BỘ VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT HÓA LÝ CỦA CELLULASE TỪ CHỦNG *PENICILLIUM* SP. DTQ-HK1

Trịnh Đình Khả¹, Quyền Đình Thi², Nguyễn Sỹ Lê Thanh²

¹Dại học Thái Nguyên

²Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 sinh tổng hợp ít nhất 2 loại cellulase ngoại bào có khối lượng phân tử khoảng 58 và 36 kDa. Tủa bằng 95% acetone hoặc ethanol cho hiệu suất thu hồi cellulase cao (69 - 52%) và chỉ thu được cellulase có khối lượng phân tử 58 kDa (cellulase HK1). Cellulase HK1 có phản ứng tối ưu ở nhiệt độ 60°C và pH 4,5. Độ bền nhiệt ở dải nhiệt độ 30 - 40°C và độ bền pH 4,5 - 6,0. Các dung môi hữu cơ (methanol, ethanol, isopropanol, n-butanol và acetone) với nồng độ 10 - 30% đều ức chế hoạt độ cellulase, làm mất 11 - 67% hoạt độ cellulase. Các chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80 và Triton X-100 với nồng độ 0,5 - 2% đều làm mất hoạt độ cellulase, ở các mức độ khác nhau và nhiều nhất là 53%. SDS làm giảm mạnh hoạt độ cellulase chỉ còn 18 - 34%. Ion kim loại Co^{2+} , K^+ , Ni^{2+} , Mg^{2+} với nồng độ 5 - 15 mM làm mất 7 - 47% hoạt độ cellulase. Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} làm mất 27 - 79% hoạt độ. Ion Ag^+ ức chế mạnh mẽ hoạt độ cellulase, ngay ở nồng độ thấp 5 mM Ag^+ đã làm giảm hoạt độ enzyme xuống còn 8%, ở nồng độ cao 10 - 15 mM ức chế hoàn toàn hoạt độ. Ngược lại, EDTA làm tăng hoạt độ còn lại từ 19% ở nồng độ 5 mM, lên 45% ở nồng độ 10 mM, và 59% ở nồng độ 15 mM. Đây là một cellulase có thể áp dụng vào việc bổ sung cho thức ăn gia súc cũng như phân hủy rác chứa cellulose.

Từ khóa: Cellulase, chất tẩy rửa, dung môi hữu cơ, *Penicillium* sp. DTQ-HK1, tinh sạch, tính chất lý hóa

MỞ ĐẦU

Cellulase là nhóm enzyme thủy phân có khả năng cắt mỗi liên kết β -1,4-O-glycoside trong phân tử cellulose, oligosaccharide, disaccharide và một số cơ chất tương tự khác. Cellulase được chia làm ba dạng. Dạng 1 là endoglucanase hoặc 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolase hoặc carboxymethylcellulase (CMCase) (EC 3.2.1.4), dạng 2 là exoglucanase bao gồm 1,4- β -D-glucan glucanohydrolase (còn gọi là cellobiohydrolase) (EC 3.2.1.74) và 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase (cellobiohydrolase) (EC 3.2.1.91), dạng 3 là β -glucosidase hoặc β -glucoside glucohydrolase (EC 3.2.1.21). Endoglucanase thủy phân liên kết ở bên trong phân tử cellulose. Exoglucanase thủy phân các liên kết ở đầu khử và đầu không khử của phân tử cellulose. β -glucosidase thủy phân các phân tử cellobiohydrolase và cellobiose thành glucose (Lee *et al.*, 2002).

Cellulase được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, công nghiệp sản xuất thức ăn gia súc (Đặng Thị Thu *et al.*, 2004), công nghiệp sản xuất dung môi hữu cơ (Cheryan *et al.*, 1997; Dürre,

1998), sản xuất chất tẩy rửa (Ole *et al.*, 2002), công nghiệp giấy và bột giấy (Howard *et al.*, 2003), và đặc biệt trong công nghệ xử lý rác thải (Đặng Minh Hằng, 1999; Lý Kim Bằng *et al.*, 1999; Phạm Thị Ngọc Lan *et al.*, 1999; Tăng Thị Chính *et al.*, 1999), sản xuất phân bón vi sinh (Nguyễn Đức Lượng, Đặng Vũ Bích Hạnh, 1999; Cao Cường, Nguyễn Đức Lượng, 2003).

Do cellulase có nhiều ứng dụng, cho nên rất nhiều enzyme có nguồn gốc khác nhau được nghiên cứu về các tính chất hóa lý của chúng như xác định khối lượng phân tử (Macarrón *et al.*, 1993; Sang *et al.*, 1995; Henriksson *et al.*, 1999; Karisson *et al.*, 2001; Coral *et al.*, 2002; Hiroshi *et al.*, 2005), xác định nhiệt độ tối ưu (Isabel *et al.*, 1992; Macarrón *et al.*, 1993; Coral *et al.*, 2002; Hoàng Quốc Khánh *et al.*, 2003), xác định pH tối ưu (Claeyssens *et al.*, 1989; Macarrón *et al.*, 1993; Coral *et al.*, 2002; Hoàng Quốc Khánh *et al.*, 2003), xác định ảnh hưởng của ion kim loại (Sang *et al.*, 1995). Trong bài báo này, chúng tôi thông báo các kết quả tinh sạch sơ bộ cellulase ngoại bào của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 và các tính chất lý hóa cellulase của chủng này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn cellulase

Chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 sinh tổng hợp cellulase được nuôi cấy trong môi trường thay thế ở 30°C trong thời gian 120 h như đã mô tả (Trịnh Đình Khả, 2006). Dịch enzyme được tủa với dung môi hữu cơ 95% (v/v) ethanol, 95% (v/v) acetone và với muối ammonium sulfate bão hòa (Bollag *et al.*, 1996). Sau đó, tủa được hòa trong 100 mM đệm acetate pH 5,5 để xác định các tính chất hóa lý.

Hóa chất

CMC, Red Congo, Sodium dodecylsulfate được mua từ hãng Sigma (Mỹ); peptone, cao nấm men từ hãng Difco (Mỹ); các hóa chất tinh khiết khác từ hãng Merck (Đức) và Fluka (Tây Ban Nha). Bột giấy do nhà máy giấy Bãi Bằng cung cấp.

Điện di protein và nhuộm đặc hiệu

Dịch enzyme được điện di trên gel 10% polyacrylamide theo mô tả của Laemmli (1970). Điện di hoạt độ được chạy trên gel 10% polyacrylamide ở 4°C, bổ sung 0,2% CMC. Bản gel sau khi điện di được ủ 1 h trong đệm 100 mM acetate pH 4,5 chứa 40% isopropanol để loại SDS. Tiếp theo, gel được ủ 1 h trong 100 mM đệm acetate pH 4,5 và qua đệm trong đệm 100 mM acetate pH 4,5 chứa 5 mM β -mercaptoethanol và 1 mM EDTA. Gel được ủ tiếp 4 - 5 h ở 37°C, nhuộm 30 phút bằng dung dịch Congo đỏ và tẩy 15 phút bằng dung dịch 1 M NaCl (Sang *et al.*, 1995; Coral *et al.*, 2002).

Xác định hoạt độ và tính chất lý hóa của cellulase

Hoạt độ cellulase được xác định theo phương pháp như đã mô tả (Trịnh Đình Khả, 2006).

Xác định nồng độ cơ chất tối ưu

Phản ứng được thực hiện với các nồng độ cơ chất CMC từ 0,2 - 1,3% (w/v) pha trong 100 mM đệm acetate ở 45°C, pH 5,0.

Xác định nhiệt độ và pH tối ưu

Hỗn hợp phản ứng của dịch enzyme với 1,1% (w/v) cơ chất CMC được thực hiện ở nhiệt độ khác nhau từ 30 - 70°C ở pH 5,0 để tìm nhiệt độ tối ưu;

hoặc ở pH khác nhau từ 3,5 - 7,5 ở nhiệt độ 60°C để tìm pH tối ưu.

Xác định độ bền nhiệt và pH

Dịch enzyme trong 100 mM đệm acetate pH 4,5 được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 - 60°C trong khoảng thời gian từ 0 - 25 h, để xác định độ bền nhiệt. Dịch enzyme được ủ 18 h với đệm 100 mM với các pH khác nhau (acetate: 3,5 - 5,5; phosphate: 6,0 - 7,5) ở 37°C, để xác định độ bền pH. Dịch enzyme được ủ trong đệm 100 mM acetate pH 5,5 và phosphate pH 6,0 ở 37°C, mẫu enzyme được xác định ở các thời điểm cách nhau 24 h để khảo sát độ bền pH theo thời gian.

Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ, chất tẩy rửa, ion kim loại

Dịch enzyme được ủ tương ứng với 10 - 30% dung môi (methanol, ethanol, isopropanol, n-butanol và acetone); 0,5 - 2% (v/v) chất tẩy rửa (Tween 20, Tween 80, SDS và Triton X-100); 5 - 15 mM ion kim loại (Cu^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ag^{+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , EDTA) ở 37°C. Sau 2 h, hoạt độ còn lại được xác định.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tinh sạch sơ bộ cellulase

Theo các nghiên cứu trước đây, để tinh sạch sơ bộ một enzyme ngoại bào của vi sinh vật nào đó, dịch nổi nuôi cấy được tủa bằng ethanol, acetone hoặc muối ammonium sulfate để loại bớt một số protein tạp. Với dịch nổi ban đầu như nhau, nếu tủa với 95% (v/v) acetone hiệu suất thu hồi đạt cao nhất 69% với hoạt độ cellulase còn lại 1,34 U/ml. Tủa với 95% (v/v) ethanol, hiệu suất thu hồi thấp hơn so với acetone, chỉ đạt 52% (1,01 U/ml). Trong khi đó hiệu suất thu hồi tủa với 100% ammonium sulfate bão hòa chỉ đạt 2% (Bảng 1).

Khi chạy điện di kiểm tra trên gel 10% polyacrylamide chỉ thấy băng protein tủa bằng acetone và ethanol (Hình 1C) còn tủa bằng muối ammonium sulfate bão hòa không thấy xuất hiện băng điện di (không dẫn hình). Kết quả này cho thấy việc thu cellulase bằng acetone và ethanol hiệu quả hơn nhiều so với ammonium sulfate. Đồng thời, tủa sơ bộ bằng 95% (v/v) ethanol và acetone cũng loại bớt một số băng protein tạp khác (Hình 1).

Mặt khác, tủa bằng 95% (v/v) acetone và ethanol chỉ thu được băng có kích thước ước tính vào khoảng 58 kDa rất đậm (Hình 1C), tương ứng với băng cellulase ngoại bào lớn của *Penicillium* sp. DTQ-

HK1 khi nhuộm đặc hiệu (Hình 1B). Trong khi đó, băng cellulase có kích thước nhỏ (ước tính vào khoảng 36 kDa) không xuất hiện ở dịch tủa (Hình 1B, C).

Bảng 1. Tinh sạch sơ bộ cellulase.

Yếu tố kết tủa	Hoạt độ (U/ml)		Hiệu suất (%)
	Trước tủa	Sau tủa	
Acetone (95%)	1,94	1,34	69
Ethanol (95%)	1,94	1,01	52
(NH ₄) ₂ SO ₄ (100%)	1,94	0,04	2

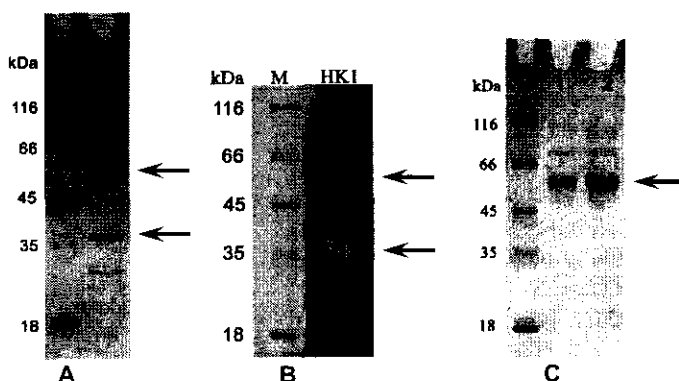
Khối lượng phân tử của các cellulase ngoại bào

Để xác định khối lượng phân tử của cellulase ở chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1, dịch nổi môi trường nuôi cấy được chạy điện di trên gel 10% polyacrylamide. Kết quả thấy xuất hiện một số băng điện di trong khoảng từ 18 đến 116 kDa. Trong các băng này có hai băng điện di protein đậm hơn các băng khác có kích thước ước tính vào khoảng 58 kDa và 36 kDa (Hình 1A). Do đó, hai băng này rất có thể là băng cellulase của *Penicillium* sp. DTQ-HK1.

Để xác định băng nào trong số các băng điện di xuất hiện là cellulase, dịch nổi môi trường được điện di hoạt độ trên gel 10% polyacrylamide chứa 0,2% CMC. Sau khi loại SDS, nhuộm gel bằng dung dịch Congo đỏ và rửa bằng 1 M NaCl thấy xuất hiện hai băng thủy phân CMC ở kích thước ước tính vào khoảng 58 kDa và 36 kDa (Hình 1B). Như vậy, *Penicillium* sp. DTQ-HK1 sinh tổng hợp ít nhất hai

cellulase ngoại bào rõ rệt, một cellulase có kích thước lớn ước tính 58 kDa và một cellulase có kích thước nhỏ ước tính 36 kDa.

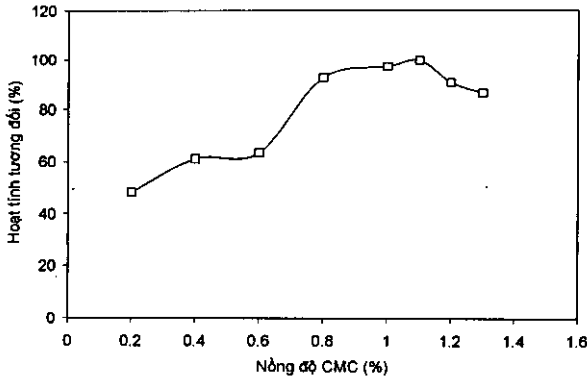
Những nghiên cứu trước đây cho thấy, cellulase từ nấm *Trichoderma reesei* có khối lượng phân tử 48 kDa và 55 kDa (Macarrón *et al.*, 1993; Karisson *et al.*, 2001), từ *Phanerochaete chrysosporium* có khối lượng 28 kDa (Henriksson *et al.*, 1999), từ *Irpex lacteus* có khối lượng 52 kDa (Hiroshi *et al.*, 2005), từ *Aspergillus niger* có khối lượng 83 kDa và 50 kDa (Coral *et al.*, 2002), từ *Bacillus* sp. D04 có khối lượng 35 kDa (Sang *et al.*, 1995). Như vậy, chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 đã sinh tổng hợp ít nhất 2 loại cellulase ngoại bào có khối lượng phân tử khác nhau là 58 kDa và 36 kDa. Kết quả này cũng khẳng định tinh sạch sơ bộ bằng 95% ethanol và acetone đã thu được cellulase có kích thước 58 kDa. Dịch tủa ethanol chứa cellulase được ký hiệu là cellulase HK1 và dùng để xác định tính chất hóa lý.



Hình 1. Điện di đồ dịch nổi môi trường nuôi cấy *Penicillium* sp. DTQ-HK1 nhuộm Coomassie (A); nhuộm đặc hiệu hoạt độ (B); dịch protein sau khi tủa nhuộm Coomassie (C). M: Thang protein; 1: Tủa bằng acetone; 2: Tủa bằng ethanol.

Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến hoạt độ cellulase

Nồng độ cơ chất CMC tối ưu cho phản ứng của cellulase HK1 là 1,1% (Hình 2). Hoạt độ cellulase tăng gần như tuyến tính khi tăng nồng độ cơ chất và đạt cực đại 100% (1,1 U/ml) ở nồng độ 1,1% CMC. Sau đó, nồng độ cơ chất tiếp tục tăng thì hoạt độ cellulase lại giảm, chỉ đạt 87% (0,96 U/ml) ở nồng độ 1,3% CMC so với hoạt độ cực đại.

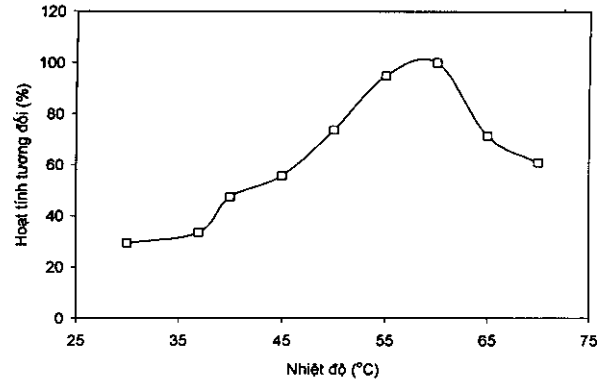


Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất CMC lên hoạt độ cellulase HK1.

Nhiệt độ phản ứng tối ưu

Hoạt độ tương đối của cellulase tăng dần từ 29% ở 30°C lên cực đại 100% (1,17 U/ml) ở 60°C (Hình 3). Sau đó, hoạt độ tương đối giảm xuống khi nhiệt độ phản ứng tăng, chỉ còn 61% (0,71 U/ml) ở nhiệt độ 70°C.

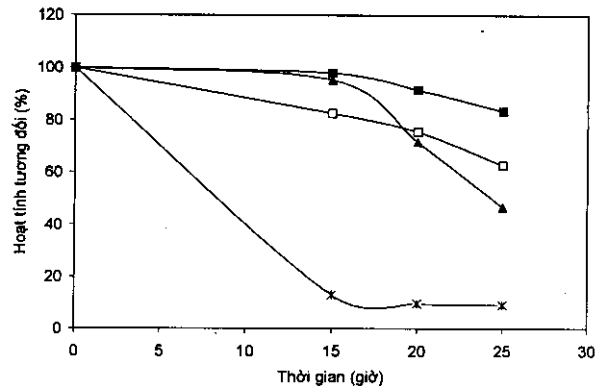
Những nghiên cứu trước đây cho thấy, nhiệt độ phản ứng thích hợp đối với cellulase của *Aspergillus niger* NRRL-363 là 50°C (Hoàng Quốc Khánh *et al.*, 2003), cellulase của *A. niger* Z10 là 40°C (Coral *et al.*, 2002), cellulase của *Trichoderma reesei* là 50°C (Nidetzky *et al.*, 1994), còn hoạt độ endoglucanase III từ *T. reesei* đạt tối đa ở 55°C (Macarrón *et al.*, 1993) và β -glucosidase từ *T. reesei* QM 9414 là 50°C (Isabel *et al.*, 1992). Cellulase của các chủng vi khuẩn chịu nhiệt phân lập từ bể ủ rác thải có nhiệt độ phản ứng tối ưu là 55°C (Tăng Thị Chính *et al.*, 1999). Như vậy, nhiệt độ thích hợp cho phản ứng phân giải cơ chất CMC của cellulase HK1 là 60°C, đây là một enzyme chịu nhiệt. Do đó, chúng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 và cellulase của chủng này có thể ứng dụng trong giai đoạn đầu của quá trình xử lý rác thải.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng lên hoạt độ cellulase HK1.

Độ bền nhiệt

Sau 15 h ủ ở 30°C và 40°C hoạt độ cellulase HK1 còn lại giảm không đáng kể (vẫn còn 95 - 98%), ở 50°C hoạt độ còn lại đạt 83% trong khi ở 60°C hoạt độ còn lại chỉ đạt 13%. Sau 20 h xử lý ở nhiệt độ 30°C hoạt độ còn lại 92%, ở 40°C và 50°C hoạt độ chỉ đạt 77% và 72%, còn ở 60°C hoạt độ giảm mạnh chỉ đạt 10%. Sau 25 h ủ thì ở các nhiệt độ hoạt độ tương đối đều giảm đặc biệt là nhiệt độ 60°C chỉ còn 9% (Hình 4). Như vậy, cellulase này khá bền nhiệt ở dải nhiệt độ 30 - 40°C.

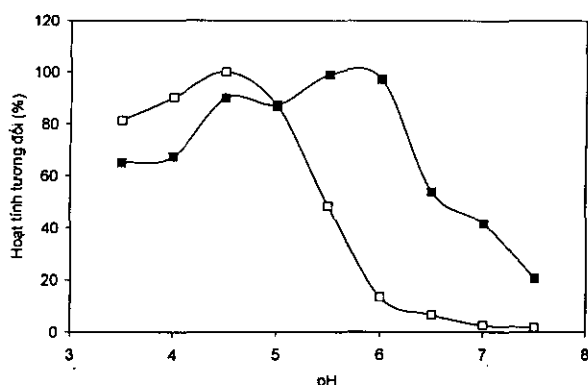


Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên độ bền cellulose HK1. (■): 30°C; (□): 40°C; (▲): 50°C; (*): 60°C.

pH phản ứng tối ưu

Hoạt độ cellulase HK1 tăng mạnh trong khoảng pH giới hạn 3,5 - 4,5, hoạt độ tương đối đạt 81% ở pH 3,5 và đạt tối đa 100% (1,68 U/ml) ở pH 4,5. Sau đó, hoạt độ tương đối giảm dần xuống còn 87% ở pH 5,0 và giảm mạnh xuống 1,6% ở pH 7,5 (Hình 5).

pH tối ưu đối với cellulase của *A. niger* NRRL-363 là 5,5 (Hoàng Quốc Khánh *et al.*, 2003); của *A. niger* Z10 là 4,5 và 7,5 (Coral *et al.*, 2002); của endoglucanase III từ *T. reesei* là 4,0 - 5,0 (Macarrón *et al.*, 1993); của cellulase từ *P. pinophilum* là 5,0 (Claeyssens *et al.*, 1989). Như vậy, cellulase HK1 hoạt động tốt trong dải pH 3,5 - 5,0 (81 - 100%), thuộc loại cellulase ưa acid.



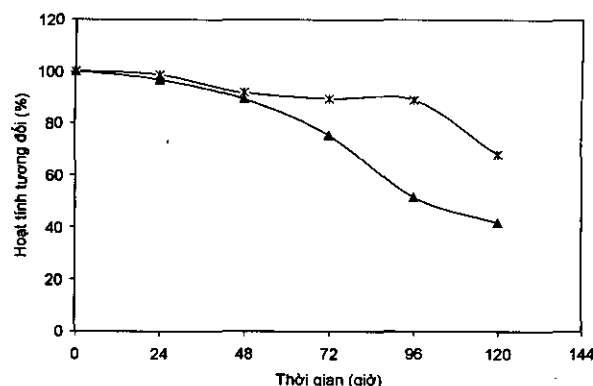
Hình 5. Ảnh hưởng của pH hỗn hợp phản ứng lên hoạt độ cellulase (□) và độ bền (■).

Ảnh hưởng của pH phản ứng lên hoạt độ và độ bền

Cellulase HK1 khá bền ở pH 4,5 - 6,0 (đệm acetate pH 4,5 - 5,5; đệm phosphate pH 6,0) hoạt độ tương đối còn lại 87 - 99% (Hình 5). Cellulase không bền ở pH > 6,0, hoạt độ tương đối còn lại chỉ bằng 21% so với đối chứng (hoạt độ enzyme không ủ với đệm) ở đệm phosphate pH 7,5 (Hình 5). Như vậy, cellulase HK1 có độ bền cao ở môi trường acid, kém bền trong môi trường trung tính và kiềm.

Hoạt độ cellulase được duy trì khá tốt ở cả hai đệm acetate pH 5,5 và phosphate pH 6,0 trong 24 h đầu, hoạt độ còn lại hầu như không giảm (97 - 99%) và sau 48 h hoạt độ còn lại cũng chỉ giảm nhẹ (89-92%). Từ 48 đến 96 h, hoạt độ cellulase tiếp tục được duy trì ở trong đệm acetate (còn 89% ở 96 h)

và bắt đầu giảm mạnh ở đệm phosphate (chỉ còn 51% ở 96 h). Sau đó, hoạt độ tương đối của cellulase giảm mạnh ở cả hai đệm chỉ còn 68% đối với đệm acetate và 42% đối với đệm phosphate sau 120 h ủ (Hình 6). Kết quả trên cho thấy, đệm acetate pH 5,5 duy trì khá tốt hoạt độ của cellulase. Như vậy, trong hai đệm acetate pH 5,5 và phosphate pH 6,0 thì đệm acetate thích hợp hơn để duy trì hoạt độ cellulase HK1 trong quá trình bảo quản.



Hình 6. Ảnh hưởng của pH tới độ bền của cellulase theo thời gian. (*): đệm acetate pH 5,5; (▲): đệm phosphate pH 6,0.

Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ

Cả 5 dung môi hữu cơ khảo sát đều ức chế hoạt độ cellulase theo chiều hướng càng tăng nồng độ dung môi càng giảm hoạt độ cellulase còn lại (Bảng 2). Sau 2 h ủ với n-butanol ở 37°C, hoạt độ còn lại của cellulase giảm mạnh chỉ còn 63% ở nồng độ 10 và 20% và 33% ở nồng độ 30% (v/v) n-butanol. Methanol, ethanol, isopropanol và acetone đều có ảnh hưởng tương tự tới hoạt độ cellulase, hoạt độ mất đi 11 - 18% ở nồng độ 10% dung môi, 23 - 37% ở nồng độ 20% dung môi và 38 - 48% ở nồng độ 30% dung môi.

Bảng 2. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt độ cellulase HK1.

Dung môi hữu cơ	Hoạt độ còn lại (%) ở 3 nồng độ dung môi		
	10%	20%	30%
Methanol	83	65	62
Ethanol	82	68	60
Isopropanol	85	65	52
Acetone	89	77	61
n-Butanol	63	63	33

Bảng 3. Ảnh hưởng của một số chất tẩy rửa lên hoạt độ của cellulase HK1.

Chất tẩy rửa	Hoạt độ còn lại (%) ở các nồng độ chất tẩy rửa			
	0,5%	1%	1,5%	2%
Tween 20	97	94	80	76
Tween 80	90	85	83	81
Triton X-100	78	76	67	47
SDS	34	28	22	18

Ảnh hưởng của ion kim loại

Cũng như dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa, các ion kim loại khảo sát đều ức chế hoạt động của cellulase theo cùng một xu hướng càng tăng nồng độ ion kim loại càng giảm hoạt độ enzyme. Đối với các ion Co^{2+} , K^+ , Ni^{2+} và Mg^{2+} , hoạt độ còn lại mất 7 - 21% ở nồng độ 5 mM, 25 - 39% ở nồng độ 10 mM và 34 - 47% ở 15 mM. Đối với các ion Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} hoạt độ còn lại giảm 27 - 43% ở nồng độ 5 mM, 44 - 76% ở nồng độ 10 mM và 45 - 79% ở 15 mM. Riêng Ag^+ ức chế hoạt độ cellulase rất rõ rệt. Ở nồng độ thấp 5 mM, hoạt độ còn lại chỉ đạt 8% còn ở

nồng độ cao 10 - 15 mM, Ag^+ ức chế hoàn toàn enzyme (Bảng 4).

Theo nghiên cứu trước đây, ion Ca^{2+} làm tăng hoạt độ cellulase của *Bacillus* sp. D04 lên 40% so với đối chứng, còn Mg^{2+} làm giảm nhẹ (hoạt độ còn lại 92%) và Zn^{2+} ức chế mạnh hoạt độ cellulase này (hoạt độ còn lại bằng 37% so với đối chứng) (Sang *et al.*, 1995).

EDTA có tác động ngược lại với ion kim loại theo chiều hướng càng tăng nồng độ càng tăng hoạt độ enzyme trở lại. Nồng độ EDTA tăng từ 5 mM lên 15 mM thì hoạt độ còn lại tăng từ 19 lên 59%.

Bảng 4. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt độ cellulase HK1.

Ion kim loại	Hoạt độ cellulase còn lại (%) ở 3 nồng độ ion kim loại		
	5 mM	10 mM	15 mM
Co	93	75	66
K	88	69	57
Ni	80	62	57
Mg	79	61	53
Zn	73	48	45
Ca	63	56	55
Cu	61	28	28
Fe	57	24	21
EDTA	19	45	59
Ag	8	0	0

KẾT LUẬN

Chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1 sinh tổng hợp ít nhất 2 loại cellulase ngoại bào có khối lượng phân tử khoảng 58 kDa và 36 kDa. Tủa bằng 95% acetone hoặc ethanol cho hiệu suất thu hồi cellulase cao (69 - 52%) và chỉ thu được cellulase có khối lượng phân tử 58 kDa (cellulase HK1).

Cellulase HK1 có phản ứng tối ưu ở nhiệt độ 60°C và pH 4,5; bền ở dải nhiệt độ 30 - 40°C và bền ở dải pH 4,5 - 6,0.

Các dung môi hữu cơ, chất tẩy rửa, ion kim loại đều có tác động đến hoạt độ cellulase theo cùng một chiều hướng là càng tăng nồng độ yếu tố ảnh hưởng càng giảm hoạt độ còn lại.

Đây là một cellulase có các tính chất hóa lý phù hợp có thể ứng dụng làm phụ gia thức ăn gia súc hoặc xử lý rác thải chứa nhiều cellulose.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài: Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm đa enzyme có chất lượng từ vi sinh vật tái tổ hợp nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn chăn nuôi, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2007 - 2010.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bollag D, Rozycki M, Edelstein S (1996) *Protein methods*. Wiley-liss, Inc, New York.
- Cao Cường, Nguyễn Đức Lượng (2003) Khảo sát quá trình cảm ứng enzyme chitinase và cellulase của *Trichoderma harzianum* ảnh hưởng của hai enzyme này lên nấm bệnh *Sclerotium rolfsii*. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 321-324.
- Cheryan MS, Shah PM, Witjitra K (1997) Production of acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Adv Appl Microbiol* 43: 1-33.
- Claeysens M, Tilbeurgh H, Tomme P, Wood T, Rae S (1989) Fungal cellulase systems comparison of the specificities of the cellobiohydrolases isolated from *Penicillium pinophilum* and *Trichoderma reesei*. *Biochem J* 261: 819-825.
- Coral G, Burhan A, Ünalı M, Güvenmez H (2002) Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain. *Turk J Biol* 26: 209-213.
- Đặng Minh Hằng (1999) Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của một số chủng vi sinh vật để xử lý rác. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 333-339.
- Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Xuân Sâm (2004) *Công nghệ enzyme*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Dürre P (1998) New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 639-648.
- Henriksson G, Nutt a, Henriksson H, Pettersson B, Stahlberg J, Johansson G, Pettersson G (1999) Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *Eur J Biochem* 259: 88-95.
- Hiroshi T, Satoshi T, Makoto O, Yoshihiko A, Takahisa K, Mitsuo O, Makoto S (2005) Gene cloning of an endoglucanase from the basidiomycete *Irpex lacteus* and its cDNA expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosi Biotechnol Biochem* 69 (7): 1262-1269.
- Hoàng Quốc Khánh, Ngô Đức Duy, Nguyễn Duy Long (2003) Khả năng sinh tổng hợp và đặc điểm cellulase của *Aspergillus niger* RNNL-363. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 304-307.
- Howard R, Abotsi E, Rensburg Ev, Howard S (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African J Biotech* 2 (12): 602-619.
- Isabel D, Estrada P, Macarron R, Dominguez J, Castillon M, Acebal C (1992) Chemical mechanism of β -glucosidase from *Trichoderma reesei*. *Biochem J* 283: 679-682.
- Karisson J, Saloheimo M, Siika-aho M, Tenkanen M, Penttilä M, Tjerneld F (2001) Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem* 268: 6498-6507.
- Laemmli U (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee R, Weimer P, vanZyl W, Pretorius I (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 506-577.
- Lý Kim Bảng, Lê Gia Hy, Tăng Thị Chính, Phan Tuyết Minh, Lê Thanh Xuân, Trần Quang Huy, Đào Ngọc Quang, Phạm Thị Cúc (1999) Sử dụng vi sinh vật có hoạt độ phân giải cellulose cao để nâng cao chất lượng phân hủy rác thải sinh hoạt và nông nghiệp. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 546-551.
- Macarrón R, Acebal C, Castiellón M, Domínguez J, Manta I (1993) Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biochem J* 289: 867-873.
- Nguyễn Đức Lượng, Đặng Vũ Bích Hạnh (1999) Khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Atinomyces griseus*. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 804-809.
- Nidetzky B, Stainer W, Claeysens M (1994) Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis. *Biochem J* 303: 417-423.

Ole K, Borchert T, Fuglsang C (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotech* 13: 345-351.

Phạm Thị Ngọc Lan, Phạm Thị Hòa, Lý Kim Bảng (1999) Tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ mùn rác. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 177-182.

Sang J, Yong J, Hyen S (1995) Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. The cell gene of *Bacillus* sp. D04 has exo- and endoglucanase

activity. *J Biol chem* 270: 26012-26019.

Tăng Thị Chính, Lý Kim Bảng, Lê Gia Hy (1999) Nghiên cứu sản xuất cellulase của một số chủng vi sinh vật ưa nhiệt phân lập từ bề úi rác thải. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 790-797.

Trịnh Đình Khả (2006) Tuyển chọn, nuôi cấy chủng vi sinh vật sinh tổng hợp cellulase và đánh giá tính chất hóa lý của cellulase. *Luận văn thạc sỹ khoa học*. Đại học Quốc gia Hà Nội.

PRELIMINARY PURIFICATION AND SOME PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF A CELLULASE FROM *PENICILLIUM* SP. DTQ-HK1

Trịnh Đình Khả¹, Quyên Đình Thi^{2*}, Nguyễn Sỹ Lê Thanh²

¹Thai Nguyen University

²Institute of Biotechnology

SUMMARY

Penicillium sp. DTQ-HK1 produced two extracellular cellulases with molecular masses of 58 and 36 kDa. Precipitated by 95% ethanol or acetone, 52 - 69% cellulases were yielded, and only one cellulase with the size of 58 kDa was obtained and designated as cellulase HK1. The enzyme had a temperature optimum at 60°C and pH optimum at 4.5, temperature stability in a range of 30 - 40°C and pH stability in a range of 4.5 - 6.0. Organic solvents (methanol, ethanol, isopropanol, n-butanol, and acetone) at concentration of 10 - 30% reduced 11 - 67% of cellulase activity. Detergents as Tween 20, Tween 80, and Triton X-100 at concentration of 0.5 - 2% reduced 3 - 53% of cellulase activity. SDS reduced 66 - 72% of cellulase activity. Metal ions Co^{2+} , K^+ , Ni^{2+} , Mg^{2+} at concentration of 5 - 15 mM reduced 7 - 47% of cellulase activity. Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} caused loss of 27 - 79% of cellulase activity. Ag^+ ion inhibited cellulase strongly at low concentration of 5 mM, and decreased the cellulase activity by 8%, and completely inhibited the cellulase at higher concentration of 10 - 15 mM. In contrast, EDTA increased the residual activity from 19% at concentration of 5 mM to 45% at concentration of 10 mM and 59% at concentration of 15 mM. This cellulase might be an applicable enzyme for feed additives and cellulose degradation.

Keywords: Cellulose, detergents, organic solvents, *Penicillium* sp. DTQ-HK1, physicochemical properties, purification

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7568260; Fax: 84-4-8363144; E-mail: quyen@ibt.ac.vn