

THU NHẬN ENZYME CELLULASE TỪ NẤM MỐC PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ MỘT SỐ NGUỒN CÀ PHÊ TRỒNG Ở VIỆT NAM

ĐỖ VIỆT PHƯƠNG

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh
dovietphuong@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v68i02.5081>

Tóm tắt. Nghiên cứu này tập trung phân lập hai chủng nấm mốc *Aspergillus* và *Trichoderma* có hoạt tính enzyme cellulase cao từ một số nguồn như đất trồng cà phê, quả cà phê mốc và cành thân cây cà phê mục. Các chủng nấm mốc sau khi phân lập sẽ được phân loại dựa vào quan sát đại thể và vi thể. Đồng thời là quá trình định tính khả năng sản sinh cellulase thông qua đo đường kính vòng phân giải Carboxymethyl cellulose (CMC). Trên cơ sở đó chọn được chủng nấm mốc có khả năng sinh enzyme cellulase hoạt tính cao. Sau cùng là quá trình thu nhận enzyme cellulase từ chủng nấm mốc đã được lựa chọn bằng phương pháp kết tủa phân đoạn với muối amoni sulphate. Kết quả cho thấy rằng, trong tổng số 24 dòng nấm mốc phân lập được thì có 13 dòng có đặc điểm giống *Aspergillus* và 11 dòng có đặc điểm giống *Trichoderma*. Chủng *Trichoderma asperellum* QT5 cho kết quả đường kính vòng phân giải CMC và hoạt tính Carboxymethyl cellulase assay (CMCase) là cao nhất trong ứng 19,5 mm và 1,17 U/mL. Sau quá trình tinh sạch sơ bộ và thu nhận được enzyme cellulase từ *T. asperellum* QT5 với hoạt tính riêng đạt cao nhất là 43,92 U/mg và hiệu suất thu hồi đạt 70,51%. Kết quả của nghiên cứu đã góp phần mở ra khả năng ứng dụng enzyme cellulase thô vào thực tế sản xuất để giảm giá thành sản phẩm cũng như khai thác triệt để nguồn nấm mốc tự nhiên này.

Từ khóa: *Aspergillus*, cà phê, cellulase, nấm mốc, phân lập, *Trichoderma*.

1. GIỚI THIỆU

Ứng dụng enzyme trong chế biến thực phẩm và nhiều lĩnh vực khác đã và đang là một trong những vấn đề mang tính cấp thiết và có ý nghĩa thực tiễn. Hiện nay, các nước phát triển đang áp dụng các chế phẩm enzyme trong sản xuất để tạo ra những sản phẩm có năng suất và chất lượng cao với giá thành thấp [1]. Việt Nam là nước giàu tiềm năng về nông sản, nhu cầu các loại enzyme phục vụ trong chế biến thực phẩm là rất lớn. Đặc biệt, trong các ngành công nghiệp sản xuất cồn hoặc các loại đồ uống. Tuy nhiên, ở Việt Nam hoàn toàn không có nhà máy sản xuất chế phẩm enzyme, hàng năm nước ta vẫn phải nhập ngoại một khối lượng lớn những loại enzyme này [2].

Cellulase tự nhiên chỉ có thể thu nhận được từ vi sinh vật bao gồm vi khuẩn, xạ khuẩn, vi nấm. Đây là một điều đặc biệt của cellulase so với những enzym khác. Trong đó, vi nấm có khả năng tiết ra ngoài môi trường các thành phần hệ cellulase rất phong phú, do đó khả năng phân giải cellulose của nấm sợi khá mạnh. Đại diện có các loài *Trichoderma reesei*, *T. viridae*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrium pulverulentum*. Đặc biệt là các loài nấm ưa nhiệt được chú trọng nhiều nhất vì chúng có thể tổng hợp các enzym bền nhiệt, sinh trưởng và phân giải nhanh cellulose từ nguồn sinh khối lignocelulose.

Khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase của các chủng vi nấm *T. viride* hay *A. niger* đã được chứng minh. Tuy nhiên nguồn phân lập các chủng nấm mốc này thì rất đa dạng. Cho đến hiện nay, các nghiên cứu trong và ngoài nước về enzyme cellulase chủ yếu tập trung vào việc tách dòng gen mã hoá cellulase, tinh sạch và nghiên cứu đặc điểm hoá sinh của cellulase, tối ưu những điều kiện nuôi cấy thu nhận chế phẩm enzyme từ các loài nấm mốc, vi khuẩn và xạ khuẩn nhưng việc khai thác ứng dụng cellulase từ nguồn tự nhiên gặp nhiều hạn chế do năng lực sinh tổng hợp của chủng giống, không chủ động nguồn enzyme, khó can thiệp thay đổi tính chất về động học enzyme, độ bền nhiệt độ và pH, khả năng hoạt động trong những điều kiện nồng độ cao chất tẩy rửa và dung môi hữu cơ.

Bên cạnh đó, sự hình thành enzyme cellulase phụ thuộc rất nhiều vào bản chất của nguồn carbon cung cấp trong suốt quá trình hình thành và phát triển của một số nấm mốc điển hình như *aspergillus* hay *trichoderma*. Một số nguồn carbon cung cấp làm cơ chất cảm ứng đã được nghiên cứu như: bột giấy, rơm

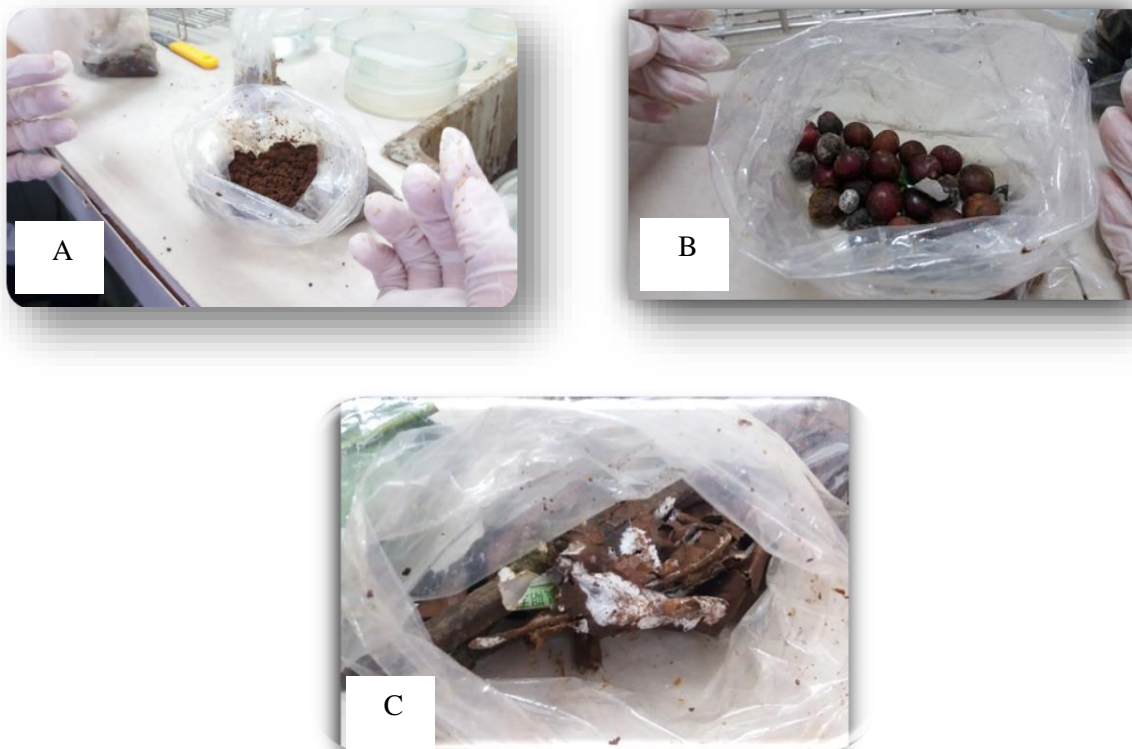
lúa mì, bã mía, lõi ngô, CMC, vỏ cà phê, thân cành cây mục. Các kết quả cho thấy rằng CMC hoặc vỏ cà phê và rom lúa là nguồn carbon tốt nhất để sản xuất enzyme cellulase [3, 4]. Do đó, rất cần có những nghiên cứu về việc ứng dụng cellulase có nguồn gốc tự nhiên mà đặc biệt là từ các chủng nấm mốc phân lập ngay trên cơ chất thủy phân của chúng (vỏ quả cà phê).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguồn phân lập nấm mốc

- Đất tại vườn trồng cà phê (giống cà phê *robusta*).
- Thân cây, cành cây cà phê mục (giống cà phê *robusta*).
- Quả cà phê mốc (giống cà phê *robusta*).

Tất cả các mẫu vật được thu thập tại xã PongDrang – huyện KrôngBuk – tỉnh ĐắkLắk. Thời gian lấy mẫu 7÷8 giờ sáng, thời điểm lấy mẫu tháng 11÷12 dương lịch.



Hình 1. (A) Đất tại vườn trồng cà phê; (B) Quả cà phê mốc; (C) Thân, cành mục

2.2 Hóa chất và môi trường

Thuốc thử 3,5- Dinitrosalicylic acid (DNS), Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), Acid etylenđiaminetetraacetic (EDTA): Trung Quốc

CMC, Ammonium Sulfate: Sigma, Hoa Kỳ

Hydrochloric acid, Sulfuric acid: Trung Quốc

Agar: Thái Lan

Môi trường Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Glucose Agar (PGA), Czapek's Agar (CZA): Ấn Độ.

2.3 Quy trình thu nhận và xử lý nấm mốc

Đối với mẫu vi sinh vật (VSV) từ quả cà phê mốc: dùng kẹp vô trùng gấp vài quả cà phê mốc cho vào túi PE có van một chiều khóa kín miệng túi. Đối với mẫu gỗ mục: dùng dao gọt một phần gỗ có chứa nấm mốc cho vào túi PE có van một chiều và khóa kín miệng. Đối với mẫu đất trồng cà phê: dùng muỗng lấy mẫu đất mặt đến độ sâu 3÷5 cm cho vào túi PE có van một chiều và khóa kín miệng túi.

Tất cả các mẫu VSV thu thập được vận chuyển về phòng thí nghiệm trong thời gian không quá 24 giờ. Các mẫu chứa VSV đều được bao kín cách ly với môi trường bên ngoài. Tất cả các thao tác xử lý mẫu đều thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Cho mẫu chứa VSV vào ống nghiệm có nắp đậy (ống nghiệm đã tiệt trùng) sau đó cho thêm nước muối sinh lý cho ngập mẫu, rồi dùng máy vortex trộn đều mẫu trong 20 phút. Mẫu sau khi được trộn đều sẽ được cấy sang môi trường thích hợp để nuôi cấy và phân lập.

2.4 Phương pháp phân lập nấm mốc

Cân 10g mẫu nguyên liệu có chứa nấm mốc cho vào erlen 250 mL, thêm vào đó 90 mL nước muối sinh lý, lắc trên máy vortex trong 30 phút. Sau đó pha loãng dung dịch bằng cách lấy 1 mL dung dịch cho vào ống nghiệm chứa 9 mL nước cất vô trùng, đồng nhất mẫu bằng cách lắc ống nghiệm nhiều lần. Tiếp tục pha loãng thành các nồng độ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Dùng micropipet hút 0,1 mL dung dịch ở các nồng độ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} cho dần đều vào đĩa petri chứa môi trường PDA, nuôi cấy ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ trong thời gian 72 giờ [5]. Quan sát trên đĩa petri nếu thấy xuất hiện các khuẩn lạc màu đen, nâu thẫm hoặc xanh nhạt đến xanh lá thì tiến hành cấy truyền vào các đĩa petri khác để tạo độ thuần chủng. Mỗi khuẩn lạc trong đĩa petri được xem là một dòng vi nấm và ghi ký hiệu để lưu trữ và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.5 Phương pháp định loại dòng nấm mốc

Dựa vào khóa phân loại *Trichoderma* của Samuels (2004) và khóa phân loại *Aspergillus* của Klich (2002). Thông qua hai bước cơ bản là định loại hình thái dựa trên đặc điểm khuẩn lạc theo phương thức cấy 3 điểm và định loại vi thể theo đặc điểm bào tử đính [6, 7].

Định loại hình thái: Cấy truyền các dòng nấm đã phân lập sang đĩa petri chứa môi trường CZA. Cấy ba điểm trên mặt môi trường. Mỗi dòng nấm được cấy sang 3 đĩa petri, ủ ở nhiệt độ 30°C . Quan sát và ghi nhận tất cả 3 đĩa petri của một dòng nấm và xác định các đặc điểm sau ở khuẩn lạc sau thời gian nuôi cấy 7 ngày bao gồm: Đường kính trung bình của khuẩn lạc; dạng mặt của khuẩn lạc; màu sắc của mặt trên và mặt dưới khuẩn lạc.

Định loại vi thể theo đặc điểm bào tử đính: Quan sát sợi nấm: có hay không vách ngăn, màu sắc, nhẵn hoặc có gai. Bộ máy mang bào tử trần: hình dạng, kích thước, màu sắc, bề mặt có gai hay nhẵn của tế bào gốc, giá bào tử đính, túi, cuống thể bình, thể bình. Bào tử đính: hình dạng, kích thước, màu sắc, mặt nhẵn hay có gai, kiểu phát sinh bào tử, dạng tập hợp của bào tử trần (chuỗi song song, chuỗi phân ly, khối cầu, tia tỏa tròn).

2.6 Phương pháp định danh nấm mốc

Các dòng nấm mốc đã phân lập được gửi mẫu định danh tại công ty Nam Khoa. Phương pháp định danh đã dùng: Định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng gen ITS (18s). Cặp mồi được sử dụng là ITS1 ($5'$ -TCCGTAGGTGAACCTGCGG- $3'$) và ITS4 ($5'$ -TCCTCCGCTTATTGATATGC- $3'$) và tỷ lệ tương đồng đạt > 99%.

2.7 Phương pháp định tính khả năng sinh cellulase

Hoạt tính cellulase được xác định tương đối theo phương pháp khuếch tán enzyme trên đĩa thạch. Đĩa thạch chứa cơ chất CMC 0,5% (w/v) trong đệm acetate 100 mM pH 5, dày khoảng 0,5 cm được đục lỗ với đường kính 0,5 cm. 50 μL dịch enzyme được bổ sung vào lỗ rồi ủ 12 giờ ở 4°C cho enzyme khuếch tán đều xung quanh. Sau khi ủ tiếp 12, 24 và 48 giờ ở 37°C , mẫu được nhuộm bằng dung dịch lugol 1% (w/v) và đo đường kính vòng phân giải cơ chất. Hoạt tính tương đối của enzyme tỷ lệ thuận với đường kính vòng phân giải cơ chất [8].

Hoạt tính = $D - d$ (với D là đường kính vòng ngoài và d là đường kính lỗ).

2.8 Phương pháp nuôi cấy thu sinh khối enzyme cellulase

Nấm mốc sau khi nuôi trên môi trường lên men bề mặt được bổ sung 75 mL Natriacetate 0,1 M, pH 5,0 vào bình nuôi cấy. Lắc 200 vòng/phút/1giờ. Hút 2 mL dịch nuôi cấy cho vào ống eppendorf, ly tâm 10.000 vòng/phút/10 phút. Sau đó thu lấy 1,5 mL enzyme thô bảo quản trong ngăn đông.

2.9 Phương pháp thu nhận cellulase

Kết tủa bằng muối trung tính: Dịch enzyme (15 mL) sau khi ly tâm ở 10.000 rpm trong 10 phút được tủa với 35÷95% ammonium sulfate bão hòa và để ở 4°C qua đêm. Sau khi ly tâm 12.500 vòng/phút, ở 4°C . Tủa được hòa với đệm acetate 100 mM pH 4,8 và thẩm tích loại muối. Đánh giá hiệu quả thu hồi enzym.

Thu chế phẩm, bảo quản ở 4°C và -20°C, định kì thời gian mẫu được lấy đi xác định hoạt độ. Mẫu đối chứng là mẫu enzyme thông không qua kết tủa.

2.10 Phương pháp xác định hoạt tính CMCase

Dựa trên sự thủy phân CMC bằng dịch cellulase sau đó bất hoạt enzyme và tạo phản ứng màu bằng DNS. Lượng glucose tạo ra được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm [9].

Cho vào 1 ống nghiệm (25 mL) gồm các chất sau: 0,5 mL dung dịch CMC 2% (pha trong đệm Na-citrate 0,05 M, pH 4,8). Sau đó hút 0,5 mL dịch enzyme cần xác định cho vào ống nghiệm rồi nâng nhiệt ống nghiệm lên 50°C trong thời gian 30 phút. Tiếp theo cho thêm vào ống nghiệm 3 mL dung dịch DNS, lắc đều rồi tiến hành đun sôi ống nghiệm trong bể cách thủy chính xác trong 5 phút. Làm lạnh ống nghiệm bằng nước đá. Cuối cùng thêm 20 mL nước cất và tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm.

Ống blank: Làm tương tự như ống thử nhưng thay vào đó là cho enzyme đã bị bất hoạt trước đó.

Như vậy độ hấp thụ A của mẫu thử = độ hấp thụ của ống thử - độ hấp thụ ống blank.

Công thức tính:

CMC=0,185/(Nồng độ enzyme pha loãng tương ứng với thủy phân tạo ra được 0,5 mg glucose) (U/mL)

Một đơn vị hoạt độ enzyme CMCase được định nghĩa là lượng enzyme có khả năng xúc tác chuyển hóa CMC tạo thành 0,5 mg đường khử (hoặc đường glucose).

2.11 Công thức tính toán, đánh giá hiệu quả tinh sạch sơ bộ cellulase

Hiệu suất thu hồi CMCase, $Y(\%) = \frac{A_1.V_1}{A_0.V_0} \times 100$ [10]

A_0, A_1 : hoạt tính CMCase có trong mẫu thô và mẫu sau tinh sạch (U/mL)

V_0, V_1 : thể tích enzyme có trong mẫu thô và mẫu sau tinh sạch (mL)

Hoạt tính riêng S (U/mg protein) = $\frac{A}{C_{Protein}}$ [10]

A: hoạt tính CMCase có trong mẫu tương ứng (U/mL);

$C_{protein}$: nồng độ protein trong mẫu tương ứng (mg/mL)

2.12 Sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng quát

THU NHẬN ENZYME CELLULASE TỪ NẤM MỐC ...



Hình 2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng quát

2.13 Phương pháp thu thập và phân tích số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại ba lần, với một hay hai nhân tố thay đổi. Sử dụng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) theo kiểm định LSD để kết luận sự sai khác giữa trung bình các nghiệm thức. Số liệu được thu thập và xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion 15.2 và phần mềm Excel dùng để tính toán trung bình và độ lệch chuẩn của các phép đo. Kết quả của thí nghiệm trước được chọn làm thông số cố định cho các thí nghiệm sau.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập một số dòng nấm mốc có đặc tính hình thái giống nhóm nấm *Aspergillus* và *Trichoderma*

Các mẫu nguyên liệu có chứa VSV cần phân lập sau khi vortex với nước muối sinh lý sẽ được cấy sang đĩa petri với môi trường nuôi cấy PGA ở 30°C. Việc nuôi cấy và tách ròng, thu nhận các dòng nấm mốc đã

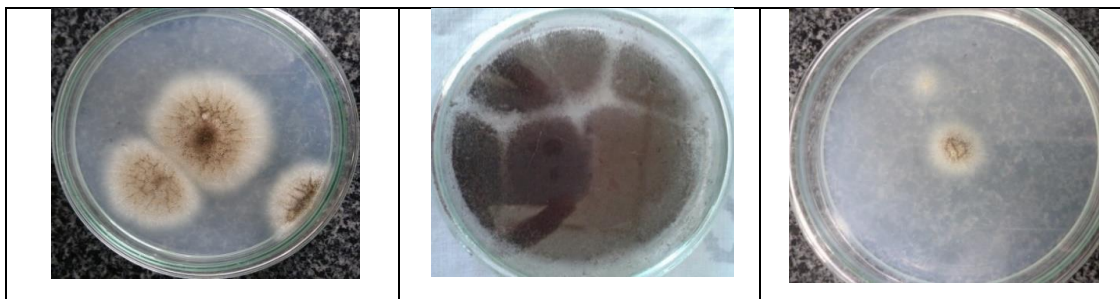
phát triển trên môi trường PDA có bổ sung cơ chất cảm ứng là 1% CMC được thực hiện dựa theo mô tả của Klich (2002) và Samuels (2004). Kết quả quan sát hình thái cho thấy có một số khuẩn lạc màu trắng phát triển nhanh sau 24 giờ ủ. Nếu theo dõi thêm sau 48 giờ và 72 giờ thì nhận thấy chúng chuyển sang màu nâu rồi nâu đen hoặc đen. Đồng thời cũng quan sát thấy có một số khuẩn lạc trong 24 giờ đầu của quá trình ủ thì có màu trắng và sau 48 giờ thì có màu xanh lục rồi đến 72 giờ thì có màu xanh đậm. Khuẩn lạc có dạng tròn đến gần tròn, thỉnh thoảng có rãnh, cao thấp khác nhau, mặt sau thường màu trắng đến vàng và không có sắc tố hòa tan. Bên cạnh đó, đường kính khuẩn lạc của các dòng nấm mốc cũng được đo đạc. Đa số đường kính khuẩn lạc sau 5 ngày nuôi cấy dao động từ 65÷78 µm. Điều này cũng phù hợp với mô tả đặc tính hình thái của một số dòng nấm thuộc nhóm nấm *Aspergillus* và *Trichoderma* của Klich và Samuels [6, 7].

Trong nghiên cứu phân lập và nhận diện dòng *A. niger* có khả năng sinh tổng hợp protopectinase, Xia *et al.* (2009) cũng đã xác nhận sự phát triển của dòng nấm mốc *A. niger* trên môi trường PDA thể hiện ở sự hình thành khuẩn lạc màu trắng trong 12÷24 giờ ngay sau khi ủ. Sau đó phát triển nhanh chóng theo dạng tỏa tròn ở 48÷72 giờ tùy thuộc đặc điểm từng dòng [11]. Theo nghiên cứu gần đây của Gupta *et al.* (2012), sự phát triển của nấm mốc *A. niger* bắt đầu với sự hình thành chấm màu kem trên bề mặt môi trường từ ngày thứ hai sau khi ủ trên môi trường PDA ở 30°C, sau đó tăng trưởng theo dạng xoắn ốc tròn trên bề mặt một cách nhanh chóng trong vòng 6 giờ. Khi kích thước khuẩn lạc khoảng 2,5÷3 cm, có sự hình thành một đốm giống như bột đen trên bề mặt môi trường và chuyển sang màu đen hoàn toàn sau 72 giờ nuôi cấy [12].

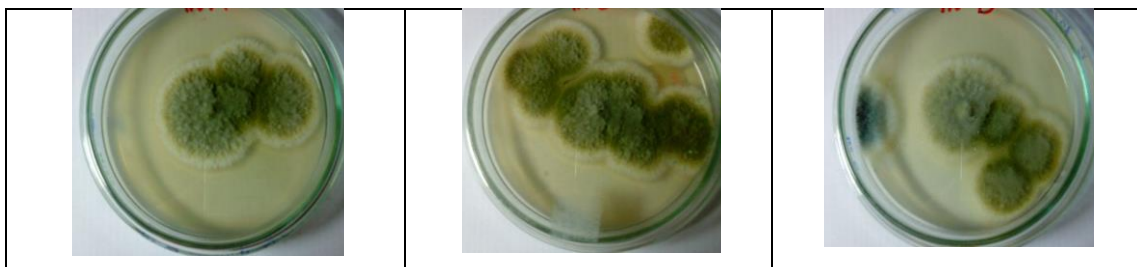
Bảng 1: Số dòng nấm mốc được phân lập từ một số nguồn

TT	Nguồn phân lập	Số dòng nấm <i>Aspergillus</i>	Ký hiệu mẫu	Số dòng nấm <i>Trichoderma</i>	Ký hiệu mẫu
1	Đất trồng	2	DA1, DA2	2	DT1, DT2
2	Quả cà phê	6	QA1÷QA6	5	QT1÷QT5
3	Cành lá mục	5	CA1÷CA5	4	CT1÷CT4
	Tổng số	13		11	

Sau khi ủ 72 giờ, tiến hành lựa chọn những khuẩn lạc riêng rẽ có màu nâu đen và màu xanh đậm, đem cấy chuyển nhiều lần trên môi trường PDA để loại bỏ tạp nhiễm và kết quả thu được 24 dòng từ ba nguồn phân lập. Những dòng này được ký hiệu theo như Bảng 1. Các mẫu phân lập này mặt trên đều có màu đen và xanh đậm, mặt dưới có màu vàng chanh hoặc trắng.



Hình 3. Khuẩn lạc của *Aspergillus* phân lập được từ cành lá mục, quả cà phê và từ đất trồng (Các hình tương ứng từ trái sang phải)



Hình 4. Khuẩn lạc của *Trichoderma* phân lập được từ cành lá mục, quả cà phê và từ đất trồng (Các hình tương ứng từ trái sang phải)

Thông qua quan sát sơ bộ các đặc điểm về đại thể và vi thể có thể khẳng định, trong 24 dòng khảo sát có 13 dòng có đặc điểm giống *Aspergillus* và 11 dòng có đặc điểm giống *Trichoderma*. Với mục tiêu của nghiên cứu là cần sàng lọc để chọn ra một trong số 24 dòng trên có khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase có hoạt tính cao nhất. Vậy nên bước tiếp theo của quá trình phân lập là lựa chọn nhanh các dòng nấm có khả năng phân giải cellulose đã phân lập được thông qua việc định tính khả năng phân giải CMC và xác định hoạt tính CMCase.

3.2 Khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase của các chủng nấm mốc phân lập được

Tất cả 24 dòng nấm mốc đã lựa chọn được nuôi cấy trên môi trường agar-CMC để định tính khả năng sinh tổng hợp cellulase và khả năng phân giải cellulose của chúng. Việc khảo sát khả năng sinh tổng hợp cellulase của các dòng nấm mốc vừa phân lập là bước đầu tiên cho việc tuyển chọn dòng nấm thích hợp cho việc thu nhận enzyme cellulase hoạt tính cao. Dựa trên đường kính vòng phân giải CMC và hoạt tính CMCase sau 48 giờ ủ ở 30°C, phân nhóm nấm mốc có tính đặc hiệu với cellulase khác nhau, kết quả được tổng hợp ở Bảng 2.

Bảng 2: Phân nhóm nấm mốc có tính đặc hiệu với enzyme cellulase

TT	Dòng nấm	Đường kính vòng phân giải CMC (mm)		
		24 giờ	36 giờ	48 giờ
1	DA1	4,3±0,1 ^{ik}	7,8±0,4 ^{hij}	10,6±0,6 ^l
2	DA2	4,9±0,2 ^{ef}	8,8±0,8 ^{gh}	11,9±0,2 ^{jk}
3	QA1	6,8±0,1 ^c	12,3±0,4 ^b	16,7±0,3 ^{de}
4	QA2	6,0±0,1 ^e	9,1±0,1 ^g	12,8±0,3 ⁱ
5	QA3	7,9±0,2 ^a	13,9±0,9 ^a	18,3±0,4 ^b
6	QA4	5,1±0,1 ^e	7,4±0,4 ^{ij}	11,8±0,2 ^{jk}
7	QA5	6,8±0,1 ^c	11,9±0,7 ^{bc}	16,3±0,4 ^{ef}
8	QA6	4,1±0,1 ^{kl}	6,9±0,4 ^{jk}	10,5±0,1 ^l
9	CA1	6,7±0,1 ^c	12,4±0,5 ^b	17,7±0,4 ^c
10	CA2	6,4±0,1 ^d	10,7±0,4 ^{ef}	15,6±0,1 ^g
11	CA3	3,9±0,1 ^l	6,3±0,4 ^{kl}	9,3±0,3 ^m
12	CA4	4,1±0,1 ^{kl}	6,9±0,5 ^{jk}	10,2±0,3 ^l
13	CA5	4,5±0,1 ^{gh}	6,2±0,3 ^{kl}	9,5±0,3 ^m
14	DT1	4,5±0,1 ^{hi}	7,5±0,4 ^{ij}	10,3±0,3 ^l
15	DT2	3,1±0,3 ^m	5,5±0,6 ^l	11,3±0,3 ^k
16	QT1	5,8±0,2 ^e	10,4±0,6 ^f	13,3±0,4 ^{hi}
17	QT2	4,6±0,1 ^{gh}	8,3±0,7 ^{ghi}	11,7±0,2 ^{jk}
18	QT3	5,8±0,2 ^e	9,2±0,3 ^g	13,5±0,4 ^h
19	QT4	6,4±0,2 ^d	11,6±0,3 ^{bcd}	16,1±0,1 ^{fg}
20	QT5	6,4±0,2 ^d	14,2±0,3 ^a	19,8±0,3 ^a
21	CT1	6,3±0,2 ^d	11,1±0,1 ^{def}	15,7±0,2 ^g
22	CT2	7,1±0,3 ^b	9,2±0,3 ^g	16,8±0,1 ^{de}
23	CT3	4,8±0,2 ^{fg}	8,4±0,4 ^{ghi}	12,1±0,1 ^j
24	CT4	6,3±0,2 ^d	12,4±0,7 ^b	17,1±0,3 ^{cd}

Các giá trị cùng một cột có ký tự in thường khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$

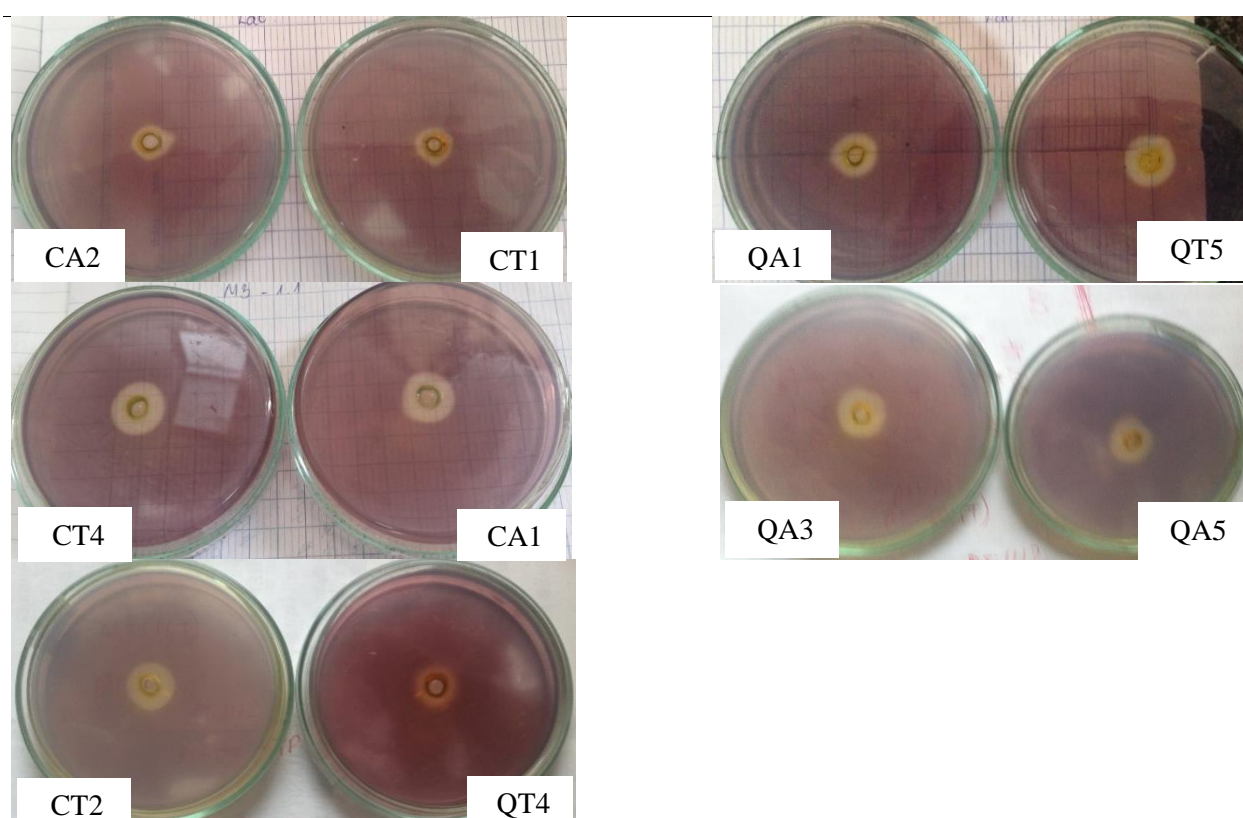
Kết quả tổng hợp ở Bảng 2 cho thấy, tất cả 24 dòng nấm mốc phân lập được đều có khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase. Trong số đó, nhóm nấm mốc phân lập được từ quả và cành cây mục thể hiện hoạt tính cellulase cao hơn là từ đất. Riêng 11 dòng phân lập được từ quả thì đã có 5 dòng cho hoạt tính cao (QA1, QA3, QA5, QT4, QT5). Với 9 dòng phân lập được từ cành lá thì có 3 dòng thể hiện hoạt tính cellulase cao (CA1, CT2, CT4). Còn lại 4 dòng phân lập được từ đất nhưng không có dòng nào thể hiện hoạt tính cellulase cao ($D < 12$ mm). Điều này góp phần khẳng định tác động của nguồn phân lập đến khả năng sinh tổng hợp một loại enzyme đặc hiệu, cụ thể ở đây là cellulase. Điều này có lẽ chịu sự chi phối của thành phần cơ chất cellulose đặc hiệu cho hoạt động của cellulase. Cellulose có trong quả cà phê chiếm khoảng 25% và trong thân cây chiếm 45% [13]. Đây chính là nguồn carbon rất phong phú cho sự có mặt của các dòng nấm mốc này.

Có thể nhận thấy hoạt lực CMCase từ các dòng nấm này là khác nhau mặc dù được phân lập từ cùng một nguồn và ở cùng điều kiện nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu về sinh học phân tử của Parenicová (2000) đã

ghi nhận sự khác nhau về gene hình thành enzyme của mỗi dòng nấm mốc, được tạo thành thông qua quá trình phiên mã và dịch mã và chịu sự chi phối của nguồn carbohydrate sử dụng. Do đó, đối với quá trình chọn lọc tự nhiên, các dòng nấm mốc được phân lập từ vị trí phù hợp, phát triển trong điều kiện môi trường thích ứng có khả năng sinh tổng hợp các enzyme đặc hiệu khác nhau [14]. Tuy nhiên việc lựa chọn dòng nấm mốc nào cho các thí nghiệm tiếp theo cần được xác định dựa trên kết quả thống kê sự khác biệt vòng phân giải CMC và hoạt tính enzyme. Tiến hành tuyển chọn các dòng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp cellulase hoạt tính cao (có 10 dòng có D > 15 mm) nuôi cấy trên môi trường lỏng cơ bản có bổ sung 1% CMC. Sau thời gian nuôi cấy (6 ngày) tiến hành thu dịch enzyme thô đem đi xác định hoạt tính CMCase.

Bảng 3: Đường kính vòng phân giải và hoạt tính CMCase từ các dòng nấm mốc

TT	Dòng nấm	Đường kính vòng phân giải (mm)	Hoạt tính CMCase (U/mL)
1	CA2	15,6±0,12 ^a	0,72±0,03 ^a
2	CT1	15,7±0,21 ^a	0,78±0,01 ^{ab}
3	QT4	16,1±0,27 ^{ab}	0,79±0,05 ^{ab}
4	QA5	16,3±0,19 ^{bc}	0,89±0,05 ^{bc}
5	QA1	16,7±0,2 ^{bcd}	0,81±0,03 ^{bc}
6	CT2	16,8±0,22 ^{cd}	0,82±0,03 ^{cd}
7	CT4	17,1±0,32 ^{de}	0,96±0,04 ^d
8	CA1	17,7±0,26 ^{ef}	0,95±0,06 ^d
9	QA3	18,3±0,31 ^f	1,06±0,01 ^e
10	QT5	19,5±0,37 ^g	1,17±0,01 ^f



Hình 5. Đường kính vòng phân giải CMC của các chủng nấm mốc

Theo kết quả Bảng 3, có 5 dòng nấm mốc có khả năng sinh enzyme cellulase hoạt tính cao được tuyển chọn bao gồm: QA3 (phân lập từ quả), CA1 (phân lập từ cành lá), QT5 (phân lập từ quả), CT2 (phân lập từ cành lá) và CT4 (phân lập từ cành lá).

3.3 Định danh năm dòng nấm mốc phân lập được

Năm dòng nấm QA3, CA1, QT5, CT2, CT4 có khả năng sinh tổng hợp cellulase hoạt tính cao được lựa chọn để định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng 18S – rDNA và 28S – rDNA bằng cặp mồi đặc chủng ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). (mẫu được gửi đến Công ty Nam Khoa để định danh). Kết quả cho ở Bảng 4.

Sản phẩm PCR của năm dòng nấm trên được sử dụng để giải trình tự DNA và sử dụng phần mềm Blast N, so sánh với trình tự DNA của các dòng nấm mốc có trong ngân hàng dữ liệu NCBI.

Bảng 4: Kết quả định danh các chủng nấm mốc phân lập được

TT	Dòng nấm	Kết quả định danh	Phương pháp định danh
1	CT2	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Giải trình tự gen vùng ITS và tra cứu trên BLAST SEARCH
2	QT5	<i>Trichoderma asperellum</i>	Giải trình tự gen vùng ITS và tra cứu trên BLAST SEARCH
3	CT4	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Giải trình tự gen vùng ITS và tra cứu trên BLAST SEARCH
4	QA3	<i>Aspergillus niger</i>	Giải trình tự gen vùng ITS và tra cứu trên BLAST SEARCH
5	CA1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Giải trình tự gen vùng ITS và tra cứu trên BLAST SEARCH

Kết quả cho thấy, các dòng nấm này có tỷ lệ tương đồng di truyền với nấm mốc *Aspergillus* và *Trichoderma*, cụ thể:

Dòng CT2 có tỷ lệ đồng hình với *Trichoderma longibrachiatum* là 99% (677/679)

Dòng QT5 có tỷ lệ đồng hình với *Trichoderma asperellum* là 99% (849/851)

Dòng CT4 có tỷ lệ đồng hình với *Trichoderma longibrachiatum* là 99% (849/851)

Dòng QA3 có tỷ lệ đồng hình với *Aspergillus niger* là 99% (882/885)

Dòng CA1 có tỷ lệ đồng hình với *Aspergillus fumigatus* là 100% (858/858)

Dựa trên kết quả xác định đường kính vòng phân giải và hoạt tính CMCase cũng như kết hợp kết quả định danh thì chủng nấm ***Trichoderma asperellum* (QT5)** được phân lập từ quả cà phê được chọn lựa để tối ưu môi trường nuôi cấy sinh tổng hợp enzyme cellulase.

3.4 Thu nhận enzyme cellulase từ *T. asperellum* QT5 bằng muối amoni sulphate

Chủng *Trichoderma asperellum* QT5 được lên men trong môi trường tối ưu. Sau thời gian lên men canh trường được ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút thu dịch enzyme thô và dùng muối ammonium sulphate để kết tủa phân đoạn. Dịch sau khi thẩm tích để loại muối được đem đi xác định hoạt tính cellulase và hàm lượng protein. Dựa vào số liệu Bảng 5 có thể thấy, sự thay đổi nồng độ dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ có ảnh hưởng đến lượng protein kết tủa, hoạt tính, hiệu suất thu hồi và độ tinh sạch.

Số liệu Bảng 5, có thể thấy sự thay đổi nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ trong dung dịch cellulase thô có ảnh hưởng đến lượng protein kết tủa, hoạt tính, hiệu suất thu hồi và độ tinh sạch của enzyme. Ở các phân đoạn muối ammonium sulfate càng cao thì lượng protein kết tủa càng nhiều. Điều này được giải thích là do các ion của phân tử $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ liên kết với các phân tử nước làm cho protein mất lớp áo nước, liên kết lại với nhau và hình thành kết tủa [15].

Tuy nhiên, hàm lượng protein hòa tan trở lại sau khi kết tủa càng thấp khi nồng độ tác nhân kết tủa tăng. Hàm lượng protein hòa tan sau kết tủa cho biết hiệu quả thu hồi của tất cả các enzyme và protein trong hỗn hợp enzyme thô. Trong khi đó, hoạt tính cellulase, hoạt tính riêng và hiệu suất thu hồi cũng có ý nghĩa quan trọng hơn trong việc đánh giá hiệu quả giữa các phương pháp áp dụng. Kết quả thí nghiệm cho thấy, hoạt tính cellulase cũng như hoạt tính riêng không quan hệ tuyến tính với hàm lượng protein hòa tan sau kết tủa. Điều này là do mỗi loại enzyme có mức độ ion hóa, hydrate hóa và ái lực với nước khác nhau [16].

Bảng 5: Hiệu quả tinh sạch cellulase từ *Trichoderma asperellum* bằng phương pháp kết tủa với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /cellulase thô (w/v)	Protein (mg/mL)	Hoạt tính (U/mL)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Hiệu suất thu hồi (%)
Đối chứng	0,96±0,01 ^e	13,6±0,31 ^e	14,16±0,4 ^a	
F35 ÷ 45%	0,314±0,008 ^c	7,28±0,11 ^{bc}	23,16±0,52 ^b	33,95±0,41 ^e
F45 ÷ 55%	0,306±0,006 ^b	8,01±0,33 ^c	26,18±0,33 ^b	37,65±0,6 ^c
F55 ÷ 65%	0,28±0,003 ^a	9,57±0,32 ^d	34,12±0,38 ^c	54,7±0,86 ^b
F65 ÷ 75%	0,316±0,004 ^c	13,9±0,55 ^e	43,92±0,28 ^d	70,51±0,55 ^a
F75 ÷ 85%	0,283±0,004 ^a	6,79±0,12 ^b	24,05±0,56 ^b	36,82±0,34 ^{cd}
F85 ÷ 95%	0,322±0,006 ^d	4,61±0,1 ^a	14,33±0,3 ^a	21,8±0,43 ^f

Các giá trị cùng một cột có ký tự in thường khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$

Do vậy, đối với mẫu kết tủa ở phân đoạn F35÷45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hoạt tính cellulase cũng như độ tinh sạch khá thấp mặc dù hàm lượng protein cao nhất. Ngược lại, mẫu kết tủa ở phân đoạn F65÷75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cho hiệu quả tinh sạch tốt nhất (hoạt tính riêng và hiệu suất thu hồi cao). Khi nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ được sử dụng ở các phân đoạn cao hơn F65÷75% thì hiệu quả tinh sạch giảm dần, phù hợp với kết quả về hàm lượng protein thu hồi. Điều này cho thấy, việc sử dụng nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ quá cao cũng làm biến tính không thuận nghịch cellulase.

Theo nghiên cứu của Jaffar *et al.* (1993), nồng độ muối bão hòa được sử dụng cho quá trình kết tủa enzyme tùy thuộc vào loại enzyme, nguồn gốc thu nhận enzyme và thường từ 60 đến 80% [16]. Arotupin *et al.* (2008) cũng tìm thấy hiệu quả của việc ứng dụng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ trong kết tủa PME thô từ *A. repens*, tuy nhiên hiệu suất thu hồi của tiến trình này cũng chỉ đạt 56,82% và độ tinh sạch tăng 2,5 lần [17].

Trong điều kiện khảo sát, phân đoạn sử dụng thích hợp nhất của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cho quá trình kết tủa cellulase là **F65÷75%**, khi đó hoạt tính riêng của cellulase đạt 43,92 U/mg protein và hiệu suất thu hồi là 70,51%.

4. KẾT LUẬN

Từ các nguồn đất trồng cà phê, cành thân mục, quả cà phê mốc đã phân lập được 13 dòng nấm thuộc chi *Aspergillus* và 11 dòng thuộc chi *Trichoderma*. Từ 24 dòng nấm trên, đã tuyển chọn ra 01 chủng nấm có khả năng sản sinh ra enzyme cellulase cao nhất đó là *Trichoderma asperellum* QT5. Sử dụng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở phân đoạn F65÷75% để kết tủa và thu nhận enzyme cellulase, khi đó hoạt tính riêng tăng từ 14,16 U/mg lên 43,92 U/mg.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin cảm ơn các đồng nghiệp và cộng sự Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh (IUH) đã hỗ trợ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Suutarinen and K. Autio, Improving the texture of frozen fruit: the case of berries, *Texture in food: volume 2: solid foods*, pp. 388-409, 2004.
- [2] Đ.T.T.Thu and N.T.X.Xâm, *Công nghệ enzyme*, in *Cơ sở công nghệ sinh học*, Đ.T.T.Thu, Editor, NXB Giáo dục: Việt Nam, 2009,
- [3] J. Steiner, C. Socha, and J. Eyzaguirre, Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 10, pp. 280-284, 1994.
- [4] B. Mishra and L. Nain, Rice straw as a substrate for lignocellulolytic enzymes production from *Phanerochaete chrysosporium* and cellulolytic bacteria, *Journal of Mycology and Plant Pathology*, vol. 40, no. 1, pp. 111, 2010.
- [5] R. Watts, J. Dahiya, K. Chaudhary, and P. Tauro, Isolation and characterization of a new antifungal metabolite of *Trichoderma reesei*, *Plant and Soil*, vol. 107, pp. 81-84, 1988.
- [6] G.J. Samuels, *Trichoderma: A guide to identification and biology*. USDA, Washington, DC (EUA), 2004.

- [7] M.A. Klich, *Identification of common Aspergillus species*. CBS, 2002.
- [8] N.L.Dũng, N.Đ.Đức, and Đ.Đ.H.Miên, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật-Tập I*. Hà Nội: NXB khoa học và kỹ thuật, 1976.
- [9] T. Ghose, Measurement of cellulase activities, *Pure and applied Chemistry*, vol. 59, no. 2, pp. 257-268, 1987.
- [10] L. Ngo, T. Pham, and V. Le, Purification of endopolygalacturonase from submerged culture of *Aspergillus awamori* L1 using a two-step procedure: Enzyme precipitation and gel filtration, *International Food Research Journal*, vol. 15, no. 2, pp. 135-140, 2008.
- [11] J.-l. Xia, H. Meng, R.-m. Wang, C.-g. Zhang, J. Xiong, Z.-y. Nie, and G.-z. Qiu, Identification and fermentation optimization of protopectinase-overproducing strain *Aspergillus niger* CD-01 for pectin production, *Journal of Central South University of Technology*, vol. 16, no. 1, pp. 53-60, 2009.
- [12] M. Gupta, K. Manisha, and R. Grover, Effect of various media types on the rate of growth of *Aspergillus niger*, *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 141-144, 2012.
- [13] A.S. Franca, L.S. Oliveira, and M.E. Ferreira, Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds, *Desalination*, vol. 249, no. 1, pp. 267-272, 2009.
- [14] L. Pařenicová, H.C. Kester, J.A. Benen, and J. Visser, pgaD encodes a new type of endopolygalacturonase from *Aspergillus niger*, *PECTINASES OF ASPERGILLUS NIGER: A Molecular And Biochemical Characterisation*, vol. 150, pp. 83, 2000.
- [15] G. Mukherjee and R. Banerjee, Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by a co-culture of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 22, pp. 207-212, 2006.
- [16] M. Jaffar and S. OOMMEN, Production, purification and characterization of pectin methylesterase (PME) from *Arthrobotrys oligospora*, *Journal of food biochemistry*, vol. 17, no. 1, pp. 53-65, 1993.
- [17] D. Arotupin, F. Akinyosoye, and A. Onifade, Purification and characterization of pectinmethylesterase from *Aspergillus repens* isolated from cultivated soil, *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 12, 2008.

CELLULASE ENZYME RECOVERY FROM MOLD STRAINS ISOLATED FROM COFFEE SOURCES IN VIETNAM

DO VIET PHUONG

*Institute of Biotechnology and Food technology, Industrial University of Ho Chi Minh City
dovietphuong@iuh.edu.vn*

Abstract. This study focused on isolating two strains of mold, *Aspergillus* and *Trichoderma*, with high cellulase enzyme activity from several sources such as coffee soil, moldy coffee berries, and rotting coffee stems. The isolated mold strains were classified based on macroscopic and microscopic observations. Simultaneously, a qualitative process of cellulase production capability was carried out by measuring the diameter of the Carboxymethyl cellulose (CMC) resolution zone. Based on these results, a mold strain with the ability to produce highly active cellulase enzyme was selected. Finally, the cellulase enzyme was obtained from the selected mold strain by fractional precipitation with ammonium sulfate salt. The results showed that out of a total of 24 mold strains, 13 strains were same *Aspergillus* characteristics, and 11 strains were same *Trichoderma* characteristics. The strain *Trichoderma asperellum* QT5 showed the highest CMC resolution zone diameter and Carboxymethyl cellulase assay (CMCase) activity 19.5 mm and 1.17 U/mL, respectively. After the preliminary purification process, the cellulase enzyme was obtained from *T. asperellum* QT5 with the highest specific activity of 43.92 U/mg, and the recovery efficiency reached 70.51%. The results of the study have contributed to opening up the possibility of applying crude cellulase enzyme in production to reduce product costs as well as fully exploiting this natural source of mold.

Keywords: *Aspergillus*, coffee, cellulase, isolation, mold, *Trichoderma*.

Ngày gửi bài: 01/06/2023

Ngày chấp nhận đăng: 24/08/2023