

# THU NHẬN ENZYM XENLULOZA TỪ NẤM MỐC *TRICHODERMA HARZIANUM* ĐỂ THỦY PHÂN BÃ ĐẬU NÀNH

## PRODUCING ENZYME CELLULASE FROM *TRICHODERMA HARZIANUM* AND USING ENZYME CELLULASE TO HYDROLYZE OKARA

Trương Thị Minh Hạnh, Châu Thị Tiên

Khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng; Email: tminhhanh2001@yahoo.com

**Tóm tắt:** Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu một số điều kiện công nghệ để thu nhận enzym xenluloza từ nấm mốc *Trichoderma harzianum* và sử dụng enzym thu được cho quá trình thủy phân nguyên liệu bã đậu nành bằng phương pháp enzym. Điều kiện để *Trichoderma harzianum* sinh tổng hợp xenluloza có hoạt lực enzym cao (4,40IU/ml) trên môi trường lên men bán rắn với tỉ lệ giống 5% có mật độ bào tử  $7,8 \times 10^8$  tế bào/ml, nhiệt độ 30°C là tỷ lệ bã đậu nành bổ sung 5%, độ ẩm ban đầu 60% và thời gian nuôi cấy 120 giờ. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ enzym/cơ chất, thời gian và nhiệt độ cho thấy, điều kiện tốt nhất thủy phân bằng enzym là tỉ lệ enzym/ cơ chất 4,5/5 (v/w), thời gian 132 giờ và nhiệt độ 50°C, lượng đường khử thu được là 5,523 g/l.

**Từ khóa:** bã đậu nành, thủy phân, sinh tổng hợp, đường khử, hoạt lực enzyme.

### 1. Đặt vấn đề

Các sản phẩm giàu tinh bột là nguồn cung cấp lương thực chính cho con người và động vật nên việc sử dụng một lượng lớn các sản phẩm này cho các quá trình lên men có thể làm ảnh hưởng đến an ninh lương thực thế giới. Trong khi đó, xenluloza là một hợp chất có hàm lượng rất lớn trong thiên nhiên, nó chiếm đến hơn 50% tổng lượng hydrocarbon trên trái đất [1], là một nguồn nguyên liệu vô tận và rẻ tiền để có thể sản xuất dịch thủy phân đường và nhiều sản phẩm có giá trị khác, đồng thời giúp giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường.

Bã đậu nành là phụ phẩm của công nghiệp sản xuất sữa đậu nành, bột đậu nành và các sản phẩm khác. Với 1kg hạt đậu nành có thể cho ra 1.1÷1,5 kg bã, trong đó chứa lượng lớn chất xơ như: xenluloza, hemixenluloza và lignin chiếm khoảng 50%, khoảng 25% protein, dầu 10-15%, ít tinh bột và cacbohydrat đơn giản [1], [2]. Hiện nay lượng bã đậu nành tạo thành trong quá trình sản xuất trên toàn thế giới rất lớn. Theo tài liệu nghiên cứu mới đây ở Nhật Bản khoảng 800.000 tấn, ở Hàn Quốc khoảng 310.000 tấn và ở Trung Quốc khoảng 2.800.000 tấn bã đậu nành được sản xuất từ đậu phụ hàng năm [1].

Nhà máy sữa đậu nành Việt Nam - Vinasoy ở Quảng Ngãi trong quá trình sản xuất sữa đã cho ra một lượng lớn bã thải khoảng 30 tấn/ngày. Hiện tại vẫn chưa có hướng giải quyết mang tính lâu dài và hiệu quả kinh tế, các hướng giải quyết chủ yếu chỉ mang tính tức thời là bán cho các hộ dân làm thức ăn gia súc.

Vì vậy, thủy phân bã đậu nành thành dịch đường glucoza sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, sẽ góp phần nâng cao giá trị kinh tế và giảm thiểu ô nhiễm môi trường. Hiện nay quá trình thủy phân từ nguyên liệu khác

**Abstract:** In this paper, we present research results on several technological conditions for obtaining enzyme cellulase from *Trichoderma harzianum* and using this enzyme to hydrolyze okara based on the enzyme method. The conditions for *Trichoderma harzianum* to biosynthesize cellulase with high enzymic activity (4.40 IU/ml) in semi-fermentation environment with *Trichoderma* 5% having cell density of  $7.8 \times 10^8$  cell/ml at 30°C are: (i) percentage of supplemented okara 5%, (ii) initial humidity 60%, and (iii) incubation duration 120 hours. Research results on effects of enzyme/substrate ratio, duration and temperature show that the best conditions for enzymic hydrolysis are: (i) enzyme/substrate ratio 4.5/5 (v/w), (ii) duration 132 hours, and (iii) temperature 50°C. Under the above conditions, the amount of reducing sugar obtained is 5.523 g/l.

**Keywords:** okara, hydrolysis, biosynthesis, reducing sugar, enzymic activity

n nhau được thực hiện theo hai hướng, hướng axit hoặc hướng enzym. Mặc dầu thủy phân bằng axit có hiệu quả cao, thời gian ngắn nhưng đòi hỏi ở nhiệt độ cao, dễ ăn mòn thiết bị, gây ô nhiễm môi trường. Việc thủy phân bằng con đường enzym là giải pháp mang tính tích cực và thân thiện môi trường.

### 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Nguyên liệu

- Bã đậu nành thu nhận từ nhà máy sữa đậu nành Việt Nam Vinasoy – Quảng Ngãi.

- Chủng nấm mốc *Trichoderma harzianum* được lấy từ phòng công nghệ sinh học, khoa Hóa trường Đại học Bách khoa Đà Nẵng, được bảo quản ở dạng bào tử.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định thành phần hóa học: hàm lượng xenluloza, protein, tro, lipid bằng các phương pháp phân tích hóa học [3], xác định đường khử bằng phương pháp DNS [3], [4].

2.2.2. Xác định lignin bằng phương pháp AOAC 949.04 (2010).

#### 2.2.3. Phương pháp lên men :

Hoạt hóa và nhân giống [5], kiểm tra khả năng sinh enzym xenluloza của *Trichoderma harzianum* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch [5]: *Trichoderma harzianum* ở dạng bào tử bảo quản lạnh được hoạt hóa bằng môi trường Czapek-dox, sau đó nhân giống cũng trong môi trường Czapek-dox có bổ sung thêm 0,5% CMC ở 30°C trong tủ ẩm trong khoảng 4 ngày, đếm bào tử bằng buồng đếm hồng cầu, đạt mật độ ở mức  $10^8$  tế bào/ml (tham khảo kết quả nghiên cứu của Ikram-ul-Haq, Uzma Hameed (2005) [6], F. Deschamps, C. Giuliano

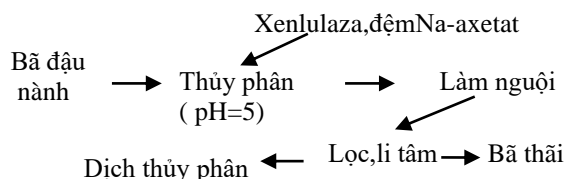
(1985), Muhammad Irfan, Quatualain Syed (2010) [7]). Bào tử giống này được kiểm tra khả năng sinh enzym xenlulaza trước khi đưa lên men thu xenlulaza trên môi trường bán rắn.

*Lên men thu enzym xenlulaza trên môi trường bán rắn [8]:* thành phần môi trường gồm trấu, bã đậu nành, cám 75%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1%, tỉ lệ giống 5% với mật độ bào tử  $7,8 \times 10^8$  tế bào/ml, nhiệt độ 30°C. Thông số cần nghiên cứu: thời gian lên men, tỉ lệ bã đậu nành/tổng chất tạo xốp, độ ẩm môi trường

2.2.4. *Xác định hoạt độ enzym bằng phương pháp đo lượng đường khử sinh ra [3][4].* Phương pháp này dựa vào sự phân hủy cơ chất CMC bởi enzym cacboxymetyl xenlulaza ở pH=5, 40°C. Lượng đường khử sinh ra được phản ứng với 2-hydroxy-3,5 dinitrobenzoic axit, màu sinh ra sau phản ứng được xác định bằng phương pháp so màu trên quang phổ ở bước sóng 540 nm. Một đơn vị hoạt tính xenlulaza (IU/ml) là lượng enzym giải phóng được 1  $\mu$  mol đường khử khi thủy phân CMC với vận tốc 1  $\mu$  mol/phút dưới các điều kiện phản ứng

2.2.5. *Thu nhận enzyme xenlulaza:* Nghiên cứu 5g canh trường, cho vào 45 ml dung dịch đệm Na-axetat 50 mM, pH=5, lắc trên máy lắc 150 vòng/phút trong 5 phút, lọc thu dịch thô. Tủa dịch lọc bằng cồn lạnh tỉ lệ cồn:enzym (3:1). Tiến hành ly tâm lạnh 4500 vòng/phút trong 15 phút. Thu kết tủa hòa lại với đệm Na-axetat 50mM, pH=5 với cùng thể tích [8].

### 2.3. Phương pháp thủy phân bã đậu nành bằng enzym xenlulaza



## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Phân tích thành phần hóa học của bã đậu nành

Kết quả Bảng 3.1 cho thấy bã đậu nành khảo sát có thành phần hóa học tương tự kết quả nghiên cứu của một số tác giả như Bo Li, Fei Lu, Haijuan Nan, Yang Liu (2012) [8], của O'Toole (1999) [9], của Guadalupe Prestamo (2007)[2]. Trong đó, xenluloza chiếm tỉ lệ 49% khá cao, rất tốt cho quá trình thủy phân thu dịch đường, làm cơ chất cho nhiều quá trình lên men thu nhận sản phẩm. Tuy nhiên lignin chiếm tỉ lệ 10,20% là thành phần liên kết chặt chẽ với xenluloza gây khó khăn cho quá trình xúc tác của enzym xenlulaza.

**Bảng 1.** Một số thành phần hóa học của bã đậu nành của nhà máy Vinasoy- Quảng Ngãi

STT	Thành phần	%
1	Độ ẩm	11%
2	Xenluloza	49%
3	Lignin	10,20%

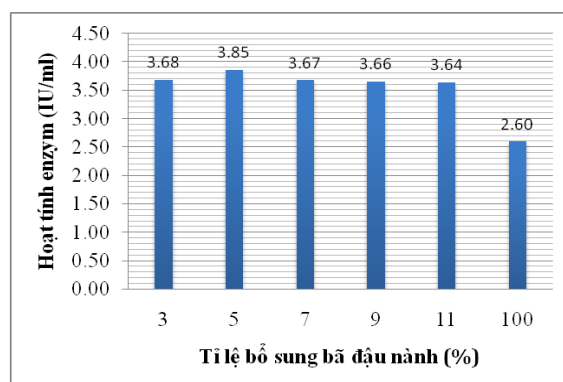
3	Protein	7,60%
4	Lipit	10%
5	Đường khử	0,10%
6	Tro	3,74%

### 3.2. Nghiên cứu lên men thu nhận enzym xenlulaza từ nấm mốc *Tricoderma harzianum*

#### 3.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ bã đậu nành bổ sung trong quá trình lên men thu nhận enzym xenlulaza

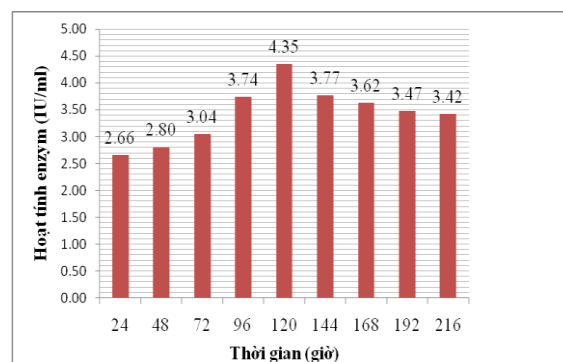
Với thời gian lên men 4 ngày, nhiệt độ 30°C, độ ẩm 60%, tỉ lệ bã đậu nành bổ sung vào môi trường là 3, 5, 7, 9, 11%. Kết quả thể hiện trên đồ thị hình 1 cho thấy: với tỷ lệ bã đậu nành 5% enzym có hoạt độ cao nhất đạt 3,85 IU/ml.

**Hình 1.** Ảnh hưởng của tỉ lệ bã đậu nành đến hoạt tính enzym xenlulaza thu được



Hàm lượng bã đậu nành tăng thì khả năng hoạt động của nấm tốt, tuy nhiên càng tăng bã đậu nành lên nhiều thì làm cho độ xốp của môi trường giảm xuống, do bã đậu nành làm môi trường không thoáng xốp, không tạo điều kiện cho nấm phát triển len lỏi sâu vào môi trường. Vì vậy, khi tăng hàm lượng bã đậu nành lên hơn 5% thì hoạt tính của enzym xenlulaza vẫn không tăng mà còn giảm xuống.

#### 3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian lên men thu nhận enzym xenlulaza trên môi trường bán rắn



**Hình 2.** Ảnh hưởng của thời gian đến hoạt độ enzyme xenlulaza thu được

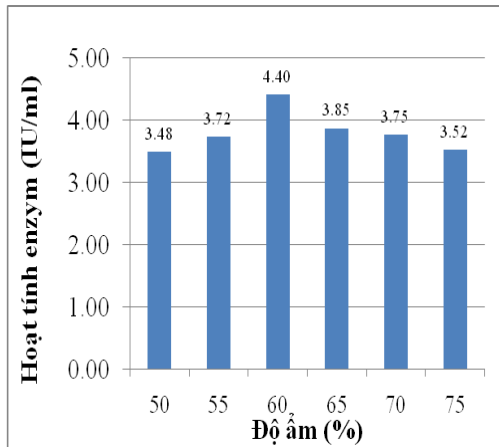
Sử dụng 5% bã đậu nành, độ ẩm 60%. Khảo sát thời

gian nuôi cấy từ 24 giờ đến 216 giờ, cứ mỗi 24 giờ tiến hành thu nhận dịch enzym để xác định hoạt tính enzym xenlulaza bằng cách đo độ hấp thụ quang ở bước sóng là 540nm. Kết quả thể hiện ở hình 2: Tại thời điểm 5 ngày (120 giờ), hoạt tính enzym đạt cao nhất  $x=4,35$  IU/ml.

### 3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của độ ẩm đến quá trình sinh tổng hợp enzym xenlulaza

Tiến hành thay đổi độ ẩm ở các giá trị 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, thời gian 120 giờ, tỷ lệ bã đậu nành là 5%. Thu và xác định hoạt tính enzym tương tự các thí nghiệm trước.

Kết quả hình 3 cho thấy với độ ẩm 60% enzym thu nhận có hoạt độ cao nhất.



Hình 3. Ảnh hưởng của độ ẩm đến hoạt tính enzym xenlulaza thu được

Tại độ ẩm 60% này thì hoạt tính enzym đạt 4,40 IU/ml và thấp nhất ở độ ẩm 50% có hoạt tính 3,48 IU/ml, trên 60% thì hoạt tính enzym giảm. Điều này có thể giải thích là độ ẩm có liên quan đến quá trình sinh trưởng của nấm mốc. Nếu độ ẩm quá thấp tức lượng nước trong môi trường thấp, làm hạn chế quá trình sinh trưởng của nấm mốc cũng như năng lực phân giải môi trường tiết enzym của nấm mốc. Nhưng nếu độ ẩm quá cao cũng không tốt cho quá trình sinh trưởng và phát triển của nấm mốc, môi trường kết dính bền chặt hơn khiến nấm mốc khó len lỏi vào môi trường.

### 3.2.4. Kết luận

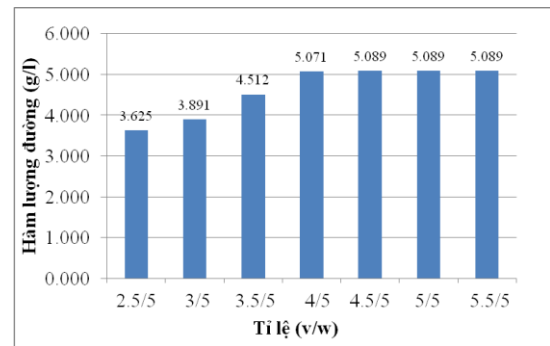
Kết hợp các điều kiện đã xác định ở mục 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, chúng tôi nhận thấy điều kiện tốt nhất để tiến hành nuôi cấy thu nhận enzym xenlulaza trên môi trường bán rắn là tỷ lệ bã đậu nành bổ sung 5%, thời gian 120 giờ, độ ẩm 60%, tỷ lệ giống 5%. Dịch enzym thu nhận có hoạt tính 4,4 IU/ml (thí nghiệm 3.2.3), được sử dụng cho quá trình thủy phân tiếp theo.

## 3.3. Khảo sát quá trình thủy phân bằng enzym xenlulaza

### 3.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzym xenlulaza đến quá trình thủy phân bã đậu nành

Tiến hành thủy phân bã đậu nành với 7 mẫu trong 7 bình tam giác, lượng cơ chất (bã đậu nành) 5g, thời gian thủy phân 4 ngày (96 giờ), nhiệt độ 48°C, tỷ lệ enzym/cơ chất lần lượt là 2,5/5, 3/5, 3,5/5, 4/5, 4,5/5, 5/5, 5,5/5

(v/w), bổ sung đệm Na-axetat 50mM định mức đến cùng một thể tích 100ml. Dịch thủy phân thu nhận được đem xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp DNS. Kết quả trình bày ở hình 4.



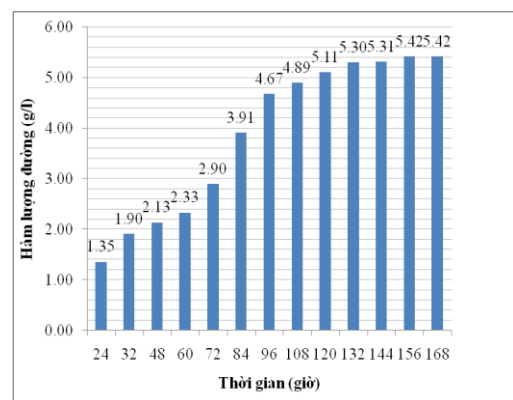
Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzym đến quá trình thủy phân bã đậu nành

Ở thể tích enzym 4,5/5(v/w) tức 4,5ml/5g cơ chất bã đậu nành thì hoạt động của enzym đủ để phân giải cơ chất cho hàm lượng đường khử cao nhất.

### 3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân bã đậu nành

Tiến hành thủy phân bã đậu nành với 13 mẫu trong 13 bình tam giác, lượng cơ chất (bã đậu nành) 5g, nhiệt độ 48°C, tỷ lệ enzym/cơ chất là 4,5/5 ml/g (v/w) với các thời gian là 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168 giờ. Bổ sung đệm Na-axetat 50mM đến cùng thể tích 100ml. Kết quả thể hiện ở hình 5.

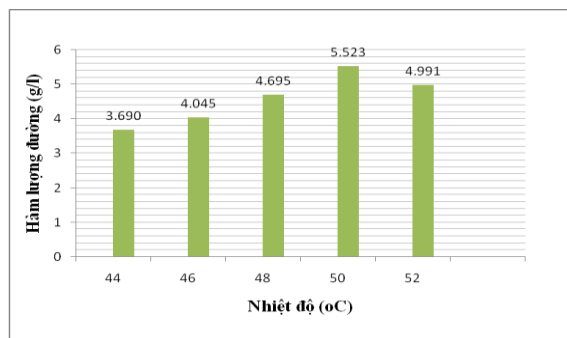
Khi thời gian tăng thì hàm lượng đường tăng lên, tuy nhiên đến một giới hạn nhất định thì hàm lượng đường không tăng lên nữa. Hàm lượng đường khử tăng dần và đạt cao nhất ở 156 giờ, lúc này nồng độ đường khử đạt khoảng 5,425 g/l, sau thời điểm này hàm lượng đường không tăng nữa.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân bã đậu nành

### 3.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân bã đậu nành

Tiến hành khảo sát quá trình thủy phân bã đậu nành ở các nhiệt độ khác nhau là 46°C, 48°C, 50°C, 52°C, tỷ lệ enzym/cơ chất là 4,5/5 (ml/g), thời gian thủy phân 132 giờ. Kết quả thể hiện ở hình 6.



**Hình 6.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân bã đậu nành

Từ hình 6 trên chúng tôi thấy nhiệt độ tăng thì lượng đường khử tạo thành tăng. Tiếp tục tăng nhiệt độ thì kết quả lại cho hàm lượng đường giảm xuống. Cụ thể trong thí nghiệm này khi tăng nhiệt độ từ 44°C lên 50°C thì đường tăng lên, ở nhiệt độ 50°C thì hàm lượng đường tạo thành đạt 5,523 g/l, đây là hàm lượng đường là cao nhất, tăng nhiệt độ trên 50°C thì lượng đường giảm. Nguyên nhân là do khả năng tăng tốc độ phản ứng của enzym có một giới hạn nhất định. Quá giới hạn nhiệt độ đó, phản ứng enzym sẽ giảm

#### 3.3.4. Kết luận:

Kết quả ở phần 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3 cho thấy ở thời gian 132 giờ, nhiệt độ 50°C, thể tích enzyme/cơ chất 4,5/5 (v/w), dịch thủy phân thu được có hàm lượng đường 5,523g/l. Kết quả này cho phép chúng tôi chọn đó là các điều kiện tốt nhất cho quá trình thủy phân bằng enzym xenlulaza.

#### 4. Kết luận

- Bã đậu nành khô của nhà máy Vinasoy có độ ẩm 11%, xenluloza 49%, lipit 10%, protein 7,6%, lignin 10,2%, tro 3,74%, đường khử 0,1%, có thể sử dụng cho quá trình thủy phân và lên men.

- Điều kiện tốt nhất để lên men thu nhận enzym xenlulaza từ chủng *Trichoderma harzianum* trên môi trường bán rắn ở 30°C bổ sung 5% bã đậu nành, thời gian 120 giờ, độ ẩm 60%, tỉ lệ giống 5% với mật độ bào tử  $7,8 \times 10^8$  bào tử/ml. Dịch enzym thu nhận có hoạt tính là 4,40 IU/ml.

- Điều kiện tốt nhất để thủy phân bã đậu nành bằng enzym xenlulaza là tỷ lệ enzym/cơ chất 4,5/5 (v/w), pH=5, nhiệt độ 50°C, thời gian thủy phân 132 giờ thu được lượng đường khử là 5,523g/l.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] Bo Li, Fei Lu, Haijuan Nan, Yang Liu (2012), "Isolation and Structural. Characterisation of Okara Polysaccharides", *Journal of molecules*, 47, pp. 363-371
- [2] Guadalupe Prestamo, Pila Ruperr (2007). "The effects of okara on rat growth, cereal fermentation, and serum lipid". *Eur food Res Technol*. 225, pp. 925-928.
- [3] Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng, Lê Thị Lan Chi (2009), *Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
- [4] Nguyễn Văn Mùi (2007), *Thực hành hóa sinh học*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội
- [5] Nguyễn Đức Lượng (chủ biên), Phan Thị Huyền - Nguyễn Ánh Tuyết (2006), *Thí nghiệm công nghệ sinh học tập 1,2*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
- [6] Ikram-ul-Haq, Uzma Hameed, Kiran Shahzadi (2005). "Cotton saccharifying activity of cellulases *T. harzianum* UM-11 in shake flask". *International journal of Botany*, 1(1), pp. 19-22.
- [7] Muhammad irfan, Quatualain Syed (2010), "Studies on the pretreatment of wheat straw for improve production of carboxymethyl cellulose by thermophilic *Trichoderma viride*", *Academia Arena* 2010:2 (7), pp. 18-30.
- [8] Trần Thanh Phong, Hoàng Quốc Khánh, Võ Thị Hạnh, Lê Bích Phương, Nguyễn Duy Long, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân (2007), "Thu nhận enzym *Cellulase của Trichoderma Reesei* trên môi trường bán rắn", *Tạp chí khoa học công nghệ*, tập 10, số 7, pp 17-24.
- [9] DK O'Toole, (1999), "Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Production". *Journal of agricultural and food chemistry*, 47, pp 363-371.

(BBT nhận bài: 08/02/2014, phản biện xong: 15/03/2014)