

NGHIÊN CỨU ENZYME CELLULASE VÀ PECTINASE TỪ CHỦNG *TRICHODERMA VIRIDE* VÀ *ASPERGILLUS NIGER* NHẪM XỬ LÝ NHANH VỎ CÀ PHÊ

Trần Thị Thanh Thuần, Nguyễn Đức Lượng
Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

TÓM TẮT: Vỏ cà phê là một phế phẩm không thể tránh khỏi trong quá trình sản xuất cà phê. Trong thành phần của nó chứa nhiều hợp chất khó phân hủy tự nhiên. Bằng việc sử dụng 2 chủng nấm mốc *Trichoderma viride* và *Aspergillus niger* để sinh tổng hợp cellulase và pectinase làm cho quá trình phân hủy diễn ra nhanh hơn. Chúng tôi đã nghiên cứu và xác định các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình sản xuất hai enzyme này. Điều kiện tối ưu sản xuất enzyme pectinase của *Aspergillus niger* là: 2 ngày, độ ẩm 62%, giống 8%. Điều kiện tối ưu sản xuất enzyme cellulase của *Trichoderma viride* là: 4 ngày, độ ẩm 58%, giống 8%. Qua thử nghiệm thực tế chúng tôi nhận thấy, vỏ cà phê phân hủy trong 14 ngày, 60% độ ẩm, 8% giống.

Từ khóa: *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, cellulase, pectinase.

1. GIỚI THIỆU

Vỏ cà phê chiếm một số lượng lớn trong quả cà phê. Những nghiên cứu chủ yếu tập trung vào việc xử lý để tận dụng vỏ cà phê như là chất dinh dưỡng cho gia súc, gia cầm, tận thu axit hữu cơ, sản xuất hương thơm tự nhiên, các nghiên cứu loại bỏ các độc chất caffeine và tanin có trong vỏ cà phê, nghiên cứu ứng dụng nhiệt năng, trồng nấm ăn và ứng dụng lên men vỏ cà phê để tạo phân bón [4].

Lên men giúp loại bỏ những chất độc hại và sau cùng là tận dụng làm phân bón. Đây là một giải pháp hữu hiệu vì khai thác triệt để việc tận dụng phế phụ liệu nông nghiệp hiện nay. Để đẩy mạnh vòng chu chuyển vật chất các phế thải nông nghiệp trong đó có vỏ cà phê là tạo phân bón [4].

Trong bài nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành các phương pháp lên men vỏ cà phê bằng *Trichoderma viride* và *Aspergillus niger*. Quá trình lên men *Trichoderma viride* và *Aspergillus niger* nhằm tận dụng nguồn phụ phế phẩm trong nông nghiệp, làm giảm khả năng ô nhiễm môi trường do các chất thải gây ra như vỏ cà phê, hèm bia sau khi lên men bia, mật rỉ đường, các loại trấu của nhà máy xay xát... Ứng dụng chủ yếu của đề tài này nhằm nghiên cứu khả năng phân hủy pectin và cellulose bằng enzyme pectinase và cellulase.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và phương pháp

Vật liệu:

- Vỏ cà phê được lấy từ một nhà máy xay xát ở Buôn Mê Thuột và Gia Lai, chúng thuộc giống cà phê *Robusta*, thuộc loài *coffea canephora*.
- Chủng *Trichoderma viride* và *Aspergillus niger* do Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách Khoa Tp.HCM cung cấp.

Phương pháp:

- Xác định hoạt tính pectinase bằng phương pháp so màu [2]
- Xác định hoạt độ của cellulase dựa vào đường khử tạo thành [1]
- Các phương pháp khác là các phương pháp lên men và nuôi cấy vi sinh vật có trong phòng thí nghiệm vi sinh vật, Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Bố trí thí nghiệm

Nghiên cứu thành phần môi trường đến sinh tổng hợp enzyme pectinase và cellulase

Chúng tôi tiến hành bố trí thí nghiệm với các thành phần môi trường tương ứng như sau. Cố định thành phần cám 75% và thành phần $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, thay đổi thành phần trấu và bột cà rốt. Bột cà rốt là tác nhân giúp kích thích sinh tổng hợp pectinase và trấu là tác nhân kích thích sinh tổng hợp cellulase. Ta có bảng thành phần môi trường thí nghiệm được bố trí như sau.

Bảng 2.1. Thành phần môi trường thí nghiệm theo phần trăm

Môi trường số	Đơn vị tính phần trăm (%)					
	1	2	3	4	5	6
Cám	75	75	75	75	75	75
Trấu	22	20	18	16	14	12
Bột cà rốt	2	4	6	8	10	12
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	1	1	1	1	1

Thêm nước điều chỉnh độ ẩm 60%. Cây giống vào và nuôi cấy ở nhiệt độ phòng khoảng 28 – 30°C. Thời gian khảo sát đối với *A. niger* là 48 giờ và *T. viride* là 72 giờ. Sau đó xác định hoạt tính pectinase (đối với *A. niger*) và cellulase (đối với *T. viride*) bằng cách đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 584 nm cho pectinase và 540 nm cho cellulase.

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian đến sinh tổng hợp enzyme pectinase và cellulase

Kết quả của thí nghiệm trên được áp dụng để tiếp tục cho thí nghiệm này. Sau khi chọn được môi trường tốt nhất cho sinh tổng hợp enzyme pectinase (đối với *A. niger*) và cellulase (đối với *T. viride*), ta tiến hành bố trí thí nghiệm nuôi cấy nấm mốc và lấy mẫu ở các thời điểm khác nhau. Thời gian khảo sát từ 28 – 32 – 36 – 40 – 44 – 48 – 52 giờ, giữ nguyên độ ẩm 60%.

Nghiên cứu ảnh hưởng của độ ẩm đến sinh tổng hợp enzyme pectinase và cellulase

Cũng giống như thí nghiệm trên, những kết quả khảo sát được áp dụng như thành phần môi trường và thời gian cho thí nghiệm này. Thay đổi độ ẩm theo các giá trị như sau: 50% - 54% - 68% - 62% - 66% - 70%.

Nghiên cứu ảnh hưởng của lượng giống Trichoderma viride và Aspergillus niger đến khả năng phân giải vỏ cà phê

Cấy giống vi sinh vật vào môi trường nhân giống đã xác định các thành phần tối ưu như trên. Nuôi trong thời gian 7 ngày cho mốc sinh bào tử cực đại. Ở thời điểm này lấy một lượng giống trong môi trường nhân giống cấy vào các bình tam giác chứa môi trường vỏ cà phê theo tỷ lệ 2% - 4% - 6% - 8% - 10% - 12%. Cố định độ ẩm trong các bình nuôi cấy là 65% và thời gian khảo sát là 7 ngày. Xác định thành phần cellulose và pectin đã thủy giải so với ban đầu.

Nghiên cứu ảnh hưởng của độ ẩm đến khả năng phân giải vỏ cà phê của Trichoderma viride và Aspergillus niger

Sau khi đã xác định được lượng giống tốt nhất đưa vào môi trường vỏ cà phê, cố định chỉ tiêu này. Thay đổi độ ẩm như sau: 50% - 55% - 60% - 65% - 70% - 75%. Nuôi cấy trong 7 ngày, sau đó đem xác định thành phần cellulose và pectin đã thủy giải so với ban đầu.

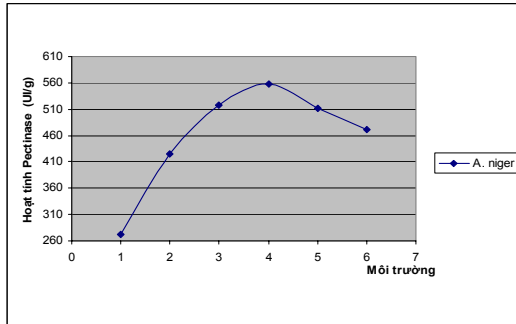
Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian đến khả năng phân giải vỏ cà phê của Trichoderma viride và Aspergillus niger

Cũng giống như trên, sau khi xác định các chỉ tiêu tối ưu cố định lượng giống đưa vào môi trường, độ ẩm và nhiệt độ tối ưu. Khảo sát theo thời gian: 7 – 14 – 21 – 28 – 35. Theo dõi sự thay đổi hàm lượng cellulose và pectin.

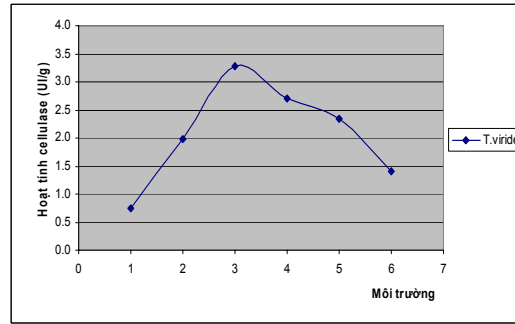
3. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến hoạt tính các enzyme pectinase và cellulase

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong hình sau:



Hình 1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến hoạt tính enzyme pectinase



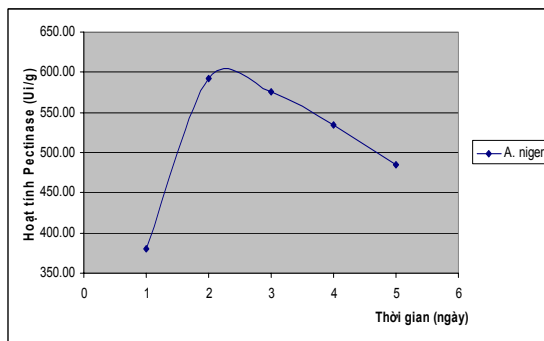
Hình 2. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến hoạt tính enzyme cellulase

Trong thành phần môi trường nhân giống, chúng tôi cố định hàm lượng cám và muối sunphat amôn ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), thay đổi thành phần trấu và bột cà rốt. Như vậy, bột cà rốt là tác nhân kích thích cho nấm mốc sinh tổng hợp pectinase. Trấu là tác nhân làm cho môi trường thoáng xốp, tạo điều kiện cho nấm mốc phát triển tốt. Ban đầu nấm mốc sẽ tận dụng những chất dễ tiêu trong môi trường như các loại đường nhưng khi môi trường dinh dưỡng bị cạn kiệt thì nấm mốc phải tiết ra những enzyme để phân hủy cơ chất khác thành đường để tiếp tục tồn tại và phát triển. Tuy nhiên, cũng tùy thuộc vào nồng độ của cơ chất nhiều hay ít mà nấm mốc sẽ tiết ra lượng enzyme khác nhau. Hàm lượng bột cà rốt là 8% kích thích cho quá trình sinh tổng hợp pectinase có hoạt tính cao nhất. Tuy nhiên, khi ta tăng hàm lượng cà rốt thì hoạt tính của enzyme vẫn không tăng vì sự tổng hợp của enzyme còn phụ thuộc vào khả năng tiết tối đa của từng loại vi sinh vật có nghĩa là nếu tăng hàm lượng cơ chất vượt quá một giới hạn nhất định thì hoạt tính enzyme sẽ giảm do 2 nguyên nhân, thứ nhất do cơ chất tạo áp lực làm giảm quá trình sinh tổng hợp, thứ hai do cơ chất tăng trong khi năng lực tiết tối đa không đổi làm hoạt tính enzyme giảm.

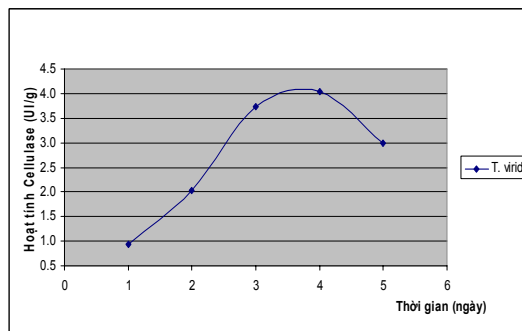
Cũng giống như thí nghiệm trên, chúng tôi cố định thành phần cám và muối sunphat amôn, chúng tôi chỉ thay đổi hai thành phần là trấu và bột cà rốt sao cho tổng của chúng chiếm 24%. Như vậy nếu tăng lượng bột cà rốt lên bao nhiêu thì lượng trấu tương ứng sẽ giảm bấy nhiêu và ngược lại. Bột cà rốt là tác nhân kích thích cho sinh tổng hợp pectinase thì trấu sẽ là tác nhân kích thích cho nấm mốc tổng hợp cellulase. Nấm mốc sẽ ưu tiên sử dụng những chất dễ tiêu trước nhưng khi môi trường dinh dưỡng ban đầu trở nên bị thiếu hụt thì chúng sẽ ưu tiên sử dụng những chất dễ phân giải để chúng có thể sử dụng được. Chúng tôi nhận thấy khi hàm lượng cà rốt đưa vào môi trường là 6% và hàm lượng trấu là 18%. Khi đó cellulose có trong trấu sẽ cao hơn lượng pectin có trong cà rốt và môi trường lúc này sẽ làm cho nấm mốc tiết ra nhiều enzyme cellulase hơn.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình tổng hợp enzyme pectinase và cellulase

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong hình sau:



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình tổng hợp enzyme pectinase



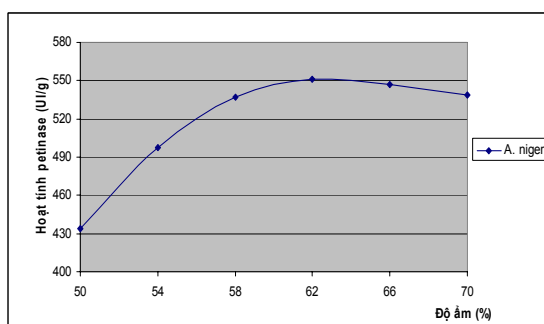
Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình tổng hợp enzyme cellulase

Khi cấy nấm mốc vào môi trường, chúng sẽ không tiết ngay ra enzyme mà sẽ tiết kiệm năng lượng đến mức tối đa và sử dụng ngay những chất dễ sử dụng nhất là các đường đơn, khoáng chất có sẵn. Sau đó chúng sẽ tiết ra enzyme tùy vào thành phần các chất có trong môi trường. Nấm mốc phát triển được chia ra thành 4 giai đoạn như sau: thích nghi, phát triển, cân bằng và tử vong. Ở giai đoạn thích nghi và phát triển, nấm mốc sẽ tìm cách thích nghi và tiết ra loại enzyme nào và số lượng bao nhiêu để có thể tồn tại và phát triển. Theo thời gian thì lượng enzyme tiết ra sẽ tăng dần và đến một mức độ ổn định, sau đó sẽ giảm đi khi môi trường dinh dưỡng cạn kiệt dần. Ở môi trường thí nghiệm này, quá trình sản sinh enzyme pectinase trong khoảng thời gian 2 ngày là cao nhất.

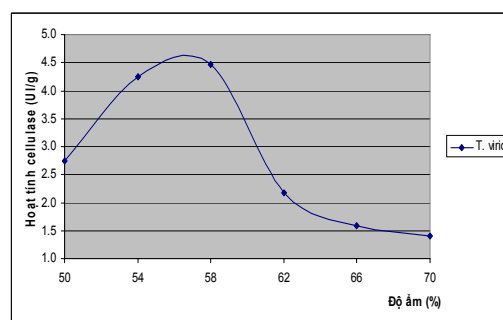
Cũng tương tự như trường hợp sinh tổng hợp enzyme pectinase, quá trình sinh tổng hợp enzyme cellulase cũng tăng tương ứng theo thời gian. Ở *T. viride*, thời gian tăng trưởng chậm hơn nhưng tạo ra hệ enzyme cellulase rất tốt. Sản phẩm của hệ enzyme cellulase là cellobiose, một chất kim hãm hoạt tính của α -D-glucanase. Do đó mà quá trình sinh tổng hợp enzyme cellulase ở *T. viride* tăng trưởng mạnh trong khoảng thời gian từ 4 ngày.

3.3. Ảnh hưởng của độ ẩm đến quá trình tổng hợp enzyme pectinase và cellulase

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong hình sau:



Hình 5. Ảnh hưởng của độ ẩm đến quá trình tổng hợp enzyme pectinase



Hình 6. Ảnh hưởng của độ ẩm đến quá trình tổng hợp enzyme cellulase

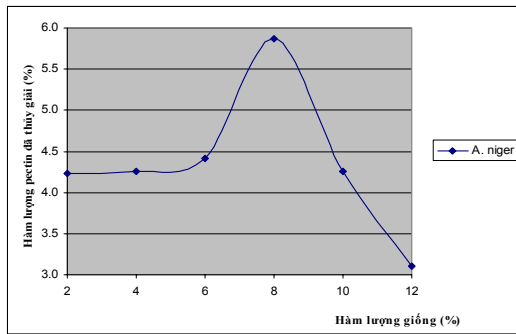
Các quá trình sinh trưởng và phát triển của nấm mốc đều có liên quan đến độ ẩm. Độ ẩm là yếu tố quan trọng trong môi trường. Nếu độ ẩm quá thấp thì xảy ra hiện tượng loại nước ra khỏi tế bào nấm mốc và làm cho tế bào bị chết. Điều này sẽ làm hạn chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc. Nếu độ ẩm quá cao thì cũng không tốt cho sự sinh trưởng và phát triển. Ở một độ ẩm nhất định, khi đó hoạt động trao đổi chất diễn ra tốt nhất thì sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc sẽ diễn ra tốt nhất. Ở môi trường thí nghiệm này, độ ẩm thích hợp cho *A. niger* phát triển tốt nhất là 62% và quá trình sản sinh enzyme pectinase là cao nhất.

Cũng tương tự như trường hợp trên, chúng tôi nhận thấy ở độ ẩm 58% thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp enzyme cellulase có hoạt tính cao nhất ở *T. viride*.

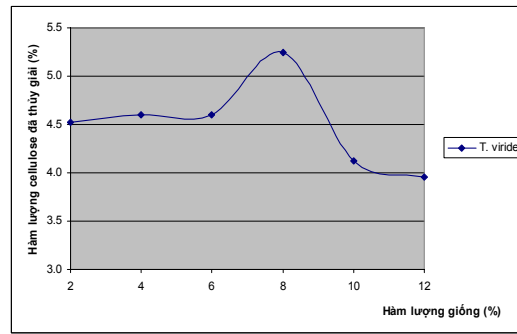
Từ các kết quả trên, chúng tôi nhận thấy để nấm mốc sinh trưởng và phát triển tốt và sản sinh ra từng loại enzyme cực đại thì tùy thuộc vào từng loại giống mà chúng ta bố trí độ ẩm thích hợp.

3.4. Ảnh hưởng của hàm lượng giống đến sự phân giải pectin và cellulose trên vỏ cà phê

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong hình sau:



Hình 7. Ảnh hưởng của hàm lượng giống đến sự phân giải pectin



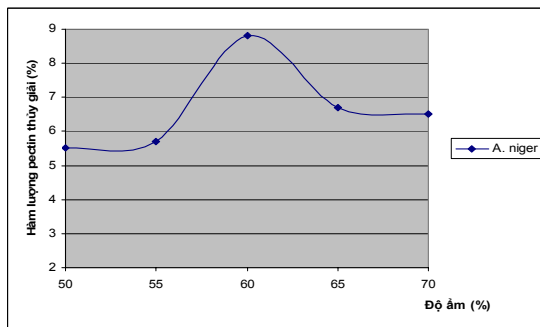
Hình 8. Ảnh hưởng của hàm lượng giống đến sự phân giải cellulose

Quá trình phân giải pectin của nấm mốc cao hay thấp phụ thuộc vào quá trình sinh tổng hợp enzyme pectinase nhiều hay ít. Tỷ lệ giống ban đầu là 2%, 4%, 6% giúp cho pha ổn định và pha sinh trưởng được hình thành. Với lượng giống 8% thì hàm lượng pectin phân hủy cao nhất.

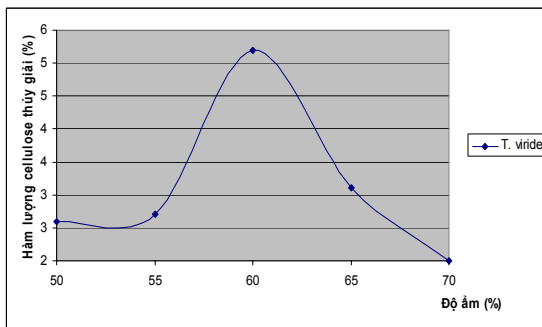
Sự phân giải cellulose dựa vào quá trình sinh tổng hợp enzyme cellulase. Ở tỷ lệ giống 8% thì hàm lượng cellulose bị phân hủy cao nhất. Tỷ lệ gây bề của vỏ cà phê cao nhất.

3.5. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sự phân giải pectin và cellulose trên vỏ cà phê

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong hình sau:



Hình 9. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sự phân giải pectin

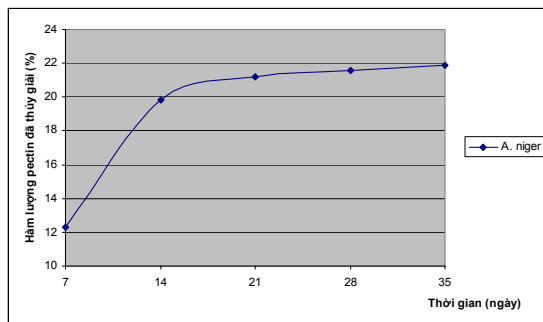


Hình 10. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sự phân giải cellulose

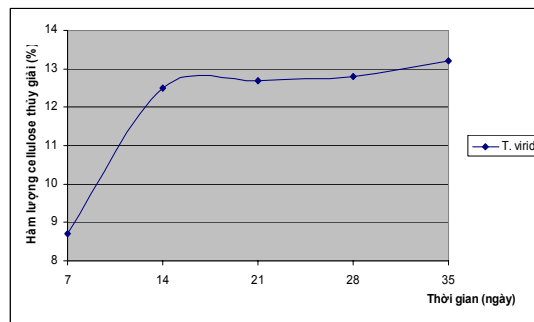
Độ ẩm thay đổi làm thay đổi sự phân giải pectin. Ở độ ẩm 60% thì sự phân giải của pectin là tốt nhất. Theo thí nghiệm 3.3 với độ ẩm 62% thì hàm lượng pectin đạt mức cao nhất. Ở đây có sự thay đổi và sự thay đổi này không lớn lắm. Chúng tôi nghĩ rằng, độ ẩm có thể làm thay đổi hình dạng vỏ trong môi trường làm ảnh hưởng đến khả năng tiếp cận với cơ chất và điều này làm ảnh hưởng đến khả năng phân giải vỏ cà phê.

Ở độ ẩm 60%, quá trình phân giải cellulose là tốt nhất. Đây là điều kiện thích hợp cho môi trường vỏ cà phê phân hủy nhanh và chế phẩm enzyme phát triển tối ưu.

3.6. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng phân giải vỏ cà phê của *Aspergillus niger* và *Trichoderma viride*



Hình 11. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng phân giải vỏ cà phê của *Aspergillus niger*



Hình 12. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng phân giải vỏ cà phê của *Trichoderma viride*

Chúng tôi nhận thấy, sự phân giải pectin xảy ra mạnh mẽ sau thời gian 7 ngày khi cho chế phẩm vào môi trường vỏ cà phê. Quá trình phân giải pectin không xảy ra đồng thời với sự phát triển của nấm. Chúng tôi nhận thấy, nấm mốc phát triển khá tốt và sinh nhiệt mạnh trong thời gian đầu là 7 ngày nhưng sự phân giải của pectin xảy ra mạnh vào tuần thứ hai. Điều này chứng tỏ nấm mốc phát triển tốt nhờ những chất dễ phân giải có sẵn trong vỏ cà phê như đường và các khoáng chất. Chúng tôi nhận thấy, sau thời gian 21 ngày trở đi, quá trình gầy bề của vỏ cà phê tương đối chậm hơn. Điều này có thể do lượng nấm mốc trong môi trường đã đạt trạng thái cân bằng. Như vậy quá trình lên men phân giải vỏ cà phê trong vòng 14 ngày sẽ giúp chúng ta tiết kiệm được thời gian và chi phí cho quá trình lên men.

Cũng tương tự như trường hợp pectinase, chúng tôi nhận thấy sự phân giải mạnh của cellulose cũng sau 7 ngày khi cho chế phẩm vào môi trường. Chúng cũng phân giải khá tốt và sau 14 ngày thì quá trình lên men phân giải cellulose là mạnh nhất.

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tìm thấy điều kiện tối ưu cho sinh tổng hợp enzyme pectinase của *A.niger* là: Thời gian: 2 ngày, độ ẩm: 62%, hàm lượng giống: 8%.

Điều kiện tối ưu cho sinh tổng hợp enzyme cellulase của *T.viride* là: Thời gian: 4 ngày, độ ẩm: 58%, hàm lượng giống: 8%.

Điều kiện tối ưu cho sự phân giải trên vỏ cà phê là: Thời gian: 14 ngày, độ ẩm: 60%, hàm lượng giống: 8%.

RESEARCH ON CELLULASE AND PECTINASE ENZYME FROM *TRICHODERMA VIRIDE* AND *ASPERGILLUS NIGER* IN ORDER TO PROCESS COFFEE PULP QUICKLY

Tran Thi Thanh Thuan, Nguyen Duc Luong
University of Technology, VNU-HCM

ABSTRACT: Coffee pulp, which is waste material from coffee production line, has many poor natural degradable property. Cellulase and pectinase, which were biosynthesized by the fungus races of *Trichoderma viride* and *Aspergillus niger*, can improve the disintegration process of coffee pulp. In this study, the conditions affecting the production of these enzymes were studied. The optimum conditions for producing Pectinase enzyme of *Aspergillus niger* include: 2 days, 62% of humidity, 8% of culture. The optimum conditions for the production of Cellulase enzyme of *Trichoderma viride* are lasting for 4 days, 58% of humidity, 8% of culture. By carrying out real experiments we found that coffee pulp was disintegrated in the duration of 14 days, 60% of humidity, 8% of culture.

Key words: *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, cellulase, pectinase.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phạm Thị Ánh Hồng, *Kỹ thuật sinh hóa*, nhà xuất bản Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, 113 - 114, 2003.
- [2]. Nguyễn Đức Lương, Cao Cường, *Thí nghiệm công nghệ sinh học, tập 1- Thí nghiệm hóa sinh học*, nhà xuất bản Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, 128 - 129, 2003.
- [3]. Lê Hồng Phú, *Nghiên cứu sinh tổng hợp Enzyme Pectinase và Cellulase từ Aspergillus niger và ứng dụng để xử lý vỏ cà phê trong sản xuất phân hữu cơ*, Luận văn thạc sĩ ngành sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên thành phố Hồ Chí Minh, 2003.
- [4]. Trung tâm CAI Đại học Bách Khoa thành phố Hồ Chí Minh, *Tài liệu những công trình đã thực hiện trên đối tượng vỏ cà phê*, Tp.HCM, 2003.
- [5]. Gary J. Samuels, *Trichoderma a guide to identification and biology*. Unit States Department of Agriculture Agricultural Research service Systematic Botany and Mycology Laboratory 304, B-011A Beltsville, MD 20705-2350, USA, 2004.
- [6]. Okada G., *The growth of Trichoderma viride on media containing cotton fibres*, J. Biochem., trang 591 – 607, 1963.
- [7]. Ruy D.D.Y. And Mandels M. – *Cellulase, Biosynthesis and applications - Enzyme Microbiology Technology*, 1980.