

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/329557186>

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TÍNH CHẤT HÓA LÝ CỦA ENZYME CARBOXYMETHYL CELLULASE TỪ TRICHODERMA ASPERELLUM

Article · December 2018

CITATIONS

0

READS

129

7 authors, including:



[Hoang Tan Quang](#)

Hue University

22 PUBLICATIONS 28 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Nhan Nguyen Huu](#)

College of Food Industry

5 PUBLICATIONS 4 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TÍNH CHẤT HÓA LÝ CỦA ENZYME CARBOXYMETHYL CELLULOSE TỪ *TRICHODERMA ASPERELLUM*

Nguyễn Hồng Vân², Hoàng Tấn Quảng¹, Lê Mỹ Tiểu Ngọc¹, Nguyễn Hữu Nhân³, Cao Đăng Nguyên², Nguyễn Hoàng Lộc¹

¹Trung tâm Ươm tạo và Chuyển giao công nghệ, Đại học Huế

²Trường đại học Khoa học, Đại học Huế

³Trường cao đẳng Lương thực và Thực phẩm, Đà Nẵng

TÓM TẮT

Cellulase là enzyme tham gia phân cắt ngẫu nhiên các liên kết β -1,4 glucoside từ bên trong các phân tử cellulose và một số loại polysaccharide tương tự khác tạo thành các oligosaccharide và đường đơn, bao gồm 3 loại enzyme là carboxymethyl cellulase (CMCase), exo- β -glucanase và β -glucosidase. Kết quả tuyển chọn chủng *Trichoderma asperellum* có khả năng sinh CMCase ngoại bào mạnh từ 4 chủng do Viện Tài nguyên, Môi trường và Công nghệ sinh học (Đại học Huế) cung cấp cho thấy chủng *T. asperellum* PQ34 có khả năng sinh CMCase mạnh nhất. Enzyme CMCase từ chủng PQ34 được tổng hợp nhiều nhất sau 96 giờ nuôi cấy trong môi trường có 1% carboxymethyl cellulose, với hoạt độ chung là 0,083 u/mL và hoạt độ riêng là 3,624 u/mg protein. CMCase có nhiệt độ và pH hoạt động tối thích lần lượt là 55°C và 4,0, bền ở nhiệt độ thấp (10-30°C) và chỉ hoạt động ở vùng pH acid (3,5-4,5). 10 mM Ca^{2+} , 5 mM Al^{3+} và 10 mM Co^{2+} có tác dụng tăng cường mạnh hoạt động của enzyme lên lần lượt là 133, 124 và 217%. Enzyme bền trong 1 mM EDTA và 1 M urea nhưng bị bất hoạt bởi 5% SDS và Triton-X100. Kết quả phân tích bằng điện di cho thấy CMCase ở *T. asperellum* PQ34 gồm 2 enzyme có khối lượng phân tử khoảng 31 và 66 kDa.

Từ khóa: cellulase, CMCase, endo- β -1,4-glucanase, *Trichoderma asperellum*.

MỞ ĐẦU

Cellulose được tổng hợp chủ yếu ở thực vật và tảo để phục vụ cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng. Cellulose là polysaccharide cấu tạo bởi các đơn phân β -D-glucose được liên kết bởi cầu nối 1,4-glycoside. Việc phân hủy cellulose bằng các tác nhân lý hóa gặp nhiều khó khăn, làm ảnh hưởng đến tốc độ của nhiều quá trình sản xuất công nghiệp (Iqbal *et al.*, 2011; Shafaq *et al.*, 2004).

Carboxymethyl cellulase (CMCase), còn được gọi là endo- β -1,4-glucanase hay endo- β -glucanase (EC. 3.2.1.4), là một trong ba loại enzyme thuộc hệ enzyme thủy phân cellulose (cellulase). Enzyme này tham gia phân cắt ngẫu nhiên các liên kết β -1,4 glucoside từ bên trong các phân tử cellulose và một số loại polysaccharide tương tự khác tạo thành các oligosaccharide. Các loại cellulase có nguồn gốc khác nhau thường khác nhau về đặc hiệu cơ chất, nhiệt độ cũng như pH hoạt động tối thích (Iqbal *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009).

Nhiều chủng nấm tiết enzyme cellulase với lượng lớn hơn các chủng vi khuẩn và *Trichoderma* được biết như chi nấm có khả năng tiết cellulase nhiều nhất. Hầu hết các cellulase thương mại là được sản xuất bởi các loài nấm thuộc chi *Trichoderma* và *Aspergillus*. Điều này phản ánh một thực tế rằng nấm mốc là một nguồn tự nhiên tiết enzyme mạnh và có thể nghiên cứu để sản xuất enzyme với quy mô công nghiệp (Iqbal *et al.*, 2011; Zhekova *et al.*, 2012).

Trên thế giới, phân lập và xác định các tính chất lý hóa của các loại enzyme CMCase từ nấm *Trichoderma* đã được rất nhiều tác giả nghiên cứu như CMCase từ *T. reesei* (Macarrón *et al.*, 1993; Shafaq *et al.*, 2004; Zhekova *et al.*, 2012), từ *T. viride* (Iqbal *et al.*, 2011; Okada, 1976) hay từ *T. harzianum* (Nawaz *et al.*, 2006). Ở Việt Nam, các enzyme thủy phân cellulose cũng đã được phân lập và đánh giá từ nhiều nguồn khác nhau như các loại nấm *Trichoderma*, nấm *A. awamori*, *Penicillium* hay từ các loại xạ khuẩn... (Trịnh Đình Khả *et al.*, 2007; Trần Thị Lệ *et al.*, 2012).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả tách chiết và xác định các tính chất lý hóa của enzyme CMCase từ *Trichoderma asperellum* được phân lập tại Thừa Thiên Huế.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Các chủng nấm *T. asperellum* CH2, SH16, PQ34, và TN42 do Viện Tài nguyên, Môi trường và Công nghệ sinh học, Đại học Huế cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định chủng *T. asperellum* sinh CMCase ngoại bào mạnh

Chủng *T. asperellum* sinh CMCase ngoại bào mạnh được tuyển chọn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Đĩa thạch chứa 0,5% cơ chất CMC dày khoảng 0,5 cm được đục lỗ với đường kính 1,0 cm. 100 μ L dịch enzyme thô được thêm vào lỗ rồi ủ ở 50°C trong 24 giờ, sau đó đĩa thạch được nhuộm bằng dung dịch Lugol 1% và tuyển chọn dựa trên đường kính vòng phân giải cơ chất (Hung *et al.*, 2010).

Nuôi cấy các chủng nấm *T. asperellum* trên đĩa Petri chứa môi trường Czapeck-Dox ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ để thu bào tử. Bào tử nấm *T. asperellum* được thu bằng nước cất vô trùng, pha loãng mẫu đến 10^7 bào tử/mL, sau đó cấy 2 mL dịch bào tử nấm *T. asperellum* vào 100 mL môi trường lỏng Czapeck-Dox. Mẫu được nuôi ở 28°C trong 72 giờ với tốc độ lắc 180 vòng/phút. Sợi nấm được rửa sạch bằng MgCl_2 và nuôi trong môi trường lỏng Czapeck-Dox, trong đó glucose được thay bằng 1% (w/v) carboxymethyl cellulose (CMC) để cảm ứng sinh tổng hợp CMCase, điều kiện nuôi

cấy là 28°C trong 96 giờ với tốc độ lắc 150 rpm. Dịch nuôi cấy được ly tâm 10.000 rpm, trong 10 phút, ở 4°C, loại bỏ sinh khối nấm, enzyme thô thu được bảo quản ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo (Hung *et al.*, 2010).

Xác định hoạt độ CMCase

Hoạt độ của CMCase được xác định dựa theo Iqbal và đồng tác giả (2011) với CMC làm cơ chất. Hỗn hợp phản ứng gồm 300 μ L CMC 1% (trong đệm sodium acetate 0,05M; pH 5,0) với 150 μ L dịch enzyme thô được ủ ở 50°C trong 30 phút. Ngừng phản ứng bằng cách bổ sung 600 μ L DNS, hỗn hợp được đun sôi trong 5 phút để tạo màu. Đo độ hấp phụ quang của sản phẩm tạo thành ở bước sóng 540 nm. Một đơn vị hoạt độ của enzyme được định nghĩa là lượng enzyme có khả năng xúc tác chuyển hóa 1 μ mol glucose trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm (Zhekova *et al.*, 2012). Hàm lượng glucose được tính toán theo phương trình đường chuẩn $y = 0,562x$ ($R^2 = 0,962$), trong đó y là nồng độ glucose và x là OD_{540nm}.

Hàm lượng protein tổng số của dịch chiết được xác định theo phương pháp Bradford (1976) theo quy trình vi phân tích dựa vào đường chuẩn albumin huyết thanh bò (BSA). Hoạt độ riêng của enzyme CMCase được tính bằng cách chia hoạt độ chung (unit/mL) cho protein tổng số (mg/mL) (Hung *et al.*, 2010).

Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt độ của enzyme

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính enzyme được khảo sát trong khoảng từ 10-90°C. Độ bền nhiệt được khảo sát sau khi ủ dịch chiết enzyme từ 10-90°C trong 30 phút (Hung *et al.*, 2010).

Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của enzyme được khảo sát trong khoảng pH từ 3-10. Đệm sử dụng cho tối ưu pH là đệm citrate 20 mM (pH 3-5), đệm phosphate 20 mM (pH 6-8), và đệm glycine-NaOH 20 mM (pH 9-10). Dịch enzyme thô được kết tủa bằng (NH₄)₂SO₄ 70% bão hòa ở 4°C trong 2 giờ, sau đó được hòa tan trở lại trong các đệm có pH khác nhau và hoạt tính thủy phân CMC được xác định tại nhiệt độ tối ưu (Hung *et al.*, 2010).

Ảnh hưởng của các ion kim loại và các chất ức chế

Ảnh hưởng của các ion kim loại lên hoạt tính CMCase được khảo sát bằng cách ủ enzyme đã tinh sạch sơ bộ với Al³⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Fe³⁺ và Hg²⁺ ở nồng độ 5 mM trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Khảo sát hoạt tính thủy phân CMC với dung dịch đệm có pH tối ưu và tại nhiệt độ tối ưu (Hung *et al.*, 2010).

Ảnh hưởng của các chất ức chế lên hoạt tính của CMCase được khảo sát bằng cách ủ enzyme đã tinh sạch sơ bộ với SDS 1%, EDTA 1 mM, urea 1 M và Triton X-100 1% trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Hoạt tính thủy phân CMC được xác định bằng cách cho phản ứng với cơ chất trong 30 phút với dung dịch đệm có pH tối ưu và tại nhiệt độ tối ưu (Hung *et al.*, 2010).

Xác định khối lượng phân tử

Dịch enzyme thô được kết tủa bằng (NH₄)₂SO₄ 70% bão hòa ở 4°C trong 2 giờ. Hòa tan kết tủa bằng đệm citrate 20mM (pH 4,0). Thẩm tích và làm sạch dịch chiết enzyme trong đệm citrate 10m M (pH 4,0).

Khối lượng phân tử của CMCase được xác định bằng phương pháp điện di dịch chiết enzyme trên gel polyacrylamide 12% có bổ sung cơ chất CMC ở nồng độ 0,2%. Quá trình điện di được tiến hành ở 4°C trong 3 giờ, sau đó ủ trong đệm citrate 20 mM ở 50°C qua đêm có bổ sung 1% (v/v) Triton X-100 để loại SDS. Sau cùng bản gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm Lugol.

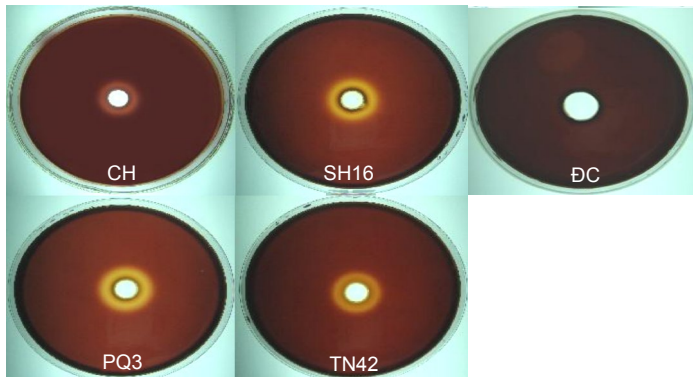
Xử lý thống kê

Tính trung bình mẫu và sai số chuẩn ít nhất 3 lần lặp lại của hoạt tính CMCase bằng chương trình Microsoft Excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định chủng *T. asperellum* sinh CMCase ngoại bào mạnh

Chủng nấm *T. asperellum* có hoạt độ enzyme glucanase mạnh được xác định thông qua vòng phân giải sau 24 giờ ủ dịch enzyme thô với đĩa thạch chứa 0,5% CMC ở 50°C. Kết quả cho thấy cả 4 chủng đều có khả năng sinh tổng hợp enzyme. Trong đó, chủng PQ34 có khả năng thủy phân CMC cao nhất (14 mm) và độ sáng của vòng phân giải CMC (Hình 1). Chúng tôi lựa chọn chủng nấm này cho các nghiên cứu về tính chất hóa lý của enzyme.



Hình 1. Vòng phân giải CMC của 4 chủng nấm *T. asperellum*.

Sản xuất CMCase

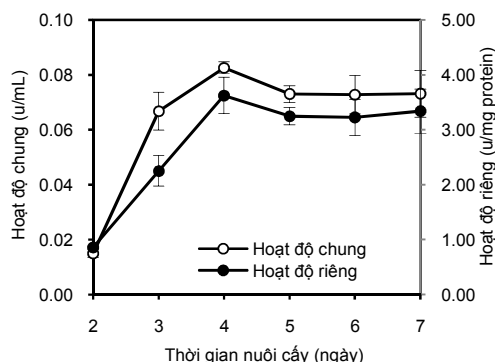
Sau khi chọn được chủng sinh enzyme CMCase ngoại bào mạnh, chúng tôi tiếp tục khảo sát quá trình sinh enzyme ngoại bào của chủng *T. asperellum* PQ34. Kết quả trình bày ở hình 2 cho thấy enzyme CMCase ngoại bào được tạo ra nhiều nhất sau 4 ngày nuôi cấy, với hoạt độ chung (HĐC) là 0,083 u/mL và hoạt độ riêng (HĐR) là 3,624 u/mg protein. Kết quả thu được của chúng tôi thấp hơn nghiên cứu của Baig (2005) khi thu được enzyme CMCase từ *T. lignorum* có HĐC là 0,25 u/mL khi nuôi trên môi trường có nguồn carbon là CMC sau 8 ngày (Baig, 2005). Nghiên cứu của Li và đồng tác giả (2009) cho thấy enzyme CMCase từ *T. viride* được sản xuất nhiều nhất sau 60 giờ nuôi cấy trong hệ lên men. Như vậy, thời gian để CMCase tiết ra môi trường ngoại bào đạt cao nhất tùy thuộc vào từng chủng nấm *Trichoderma* cụ thể.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

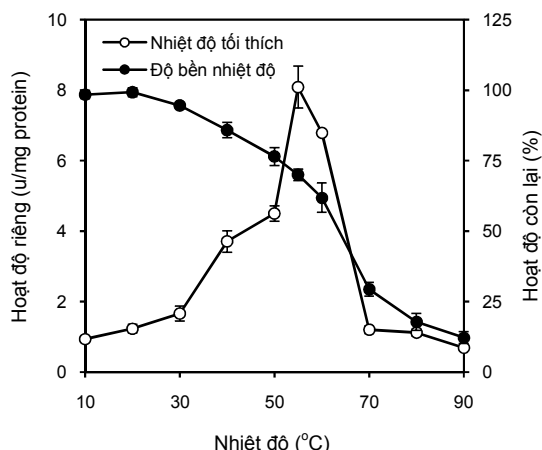
Vận tốc phản ứng do enzyme xúc tác chỉ tăng lên khi tăng nhiệt độ trong một giới hạn nhất định, chưa ảnh hưởng đến cấu trúc enzyme. Hoạt tính enzyme đạt cực đại ở nhiệt độ thích hợp, khoảng nhiệt độ thích hợp của nhiều enzyme vào khoảng 40-50°C. Ở nhiệt độ cao, enzyme bị biến tính làm hoạt tính giảm mạnh hoặc mất hoạt tính; ở nhiệt độ thấp dưới 0°C, hoạt tính enzyme bị giảm nhiều nhưng lại có thể phục hồi khi đưa về nhiệt độ thích hợp (Phạm Thị Trần Châu (CB), Phan Tuấn Nghĩa, 2006).

Kết quả khảo sát cho thấy enzyme CMCase có hoạt tính cao nhất ở 55°C với HĐC là 0,169 u/mL và HĐR là 8,091 u/mg protein. Hoạt độ enzyme thể hiện mạnh trong khoảng 50-60°C, sau 60°C hoạt độ giảm rất mạnh (Hình 3). Một số tác giả khi khảo sát nhiệt độ tối thích của endoglucanase từ các chủng *Trichoderma* cũng cho kết quả như chúng tôi, chẳng hạn endoglucanase III từ *T. reesei* QM 9414 (Macarrón *et al.*, 1993), cellulase từ *T. viride* (Iqbal *et al.*, 2011) hay CMCase từ *T. reesei* NRRL 3652 (Zhekova *et al.*, 2012). Một số nghiên cứu khác lại cho kết quả thấp hơn nghiên cứu của chúng tôi như cellulase III từ *T. viride* là 50°C (Okada, 1976) hay CMCase từ *T. reesei* và *T. harzianum* là 30°C (Nawaz *et al.*, 2006; Shafaq *et al.*, 2004).

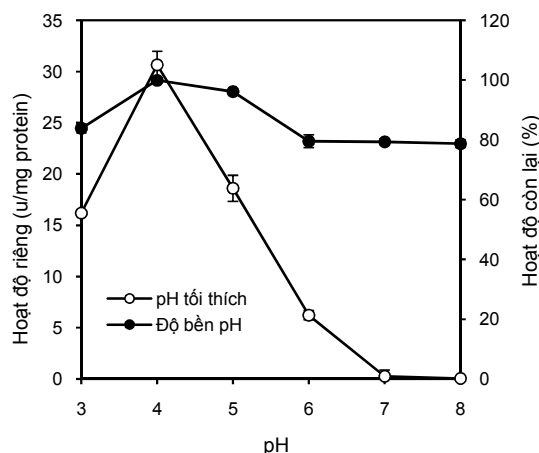
Trong nghiên cứu của chúng tôi, enzyme chỉ duy trì được 90% hoạt độ khi xử lý ở nhiệt độ dưới 30°C, từ 30°C trở lên hoạt tính giảm rất nhanh và giảm mạnh sau 60°C. Một số enzyme khác có độ bền nhiệt cao hơn CMCase của chúng tôi như CMCase từ *T. reesei* NRRL 3652 bền ở 50°C đến 160 phút (Zhekova *et al.*, 2012) hay endoglucanase III từ *T. reesei* QM 9414 chịu được nhiệt độ 65°C trong 30 phút (Macarrón *et al.*, 1993).



Hình 2. Sự sản xuất CMCase ngoại bào theo thời gian nuôi cấy.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt độ của enzyme CMCase.



Hình 4. Ảnh hưởng của pH lên hoạt độ của enzyme CMCase.

Ảnh hưởng của pH

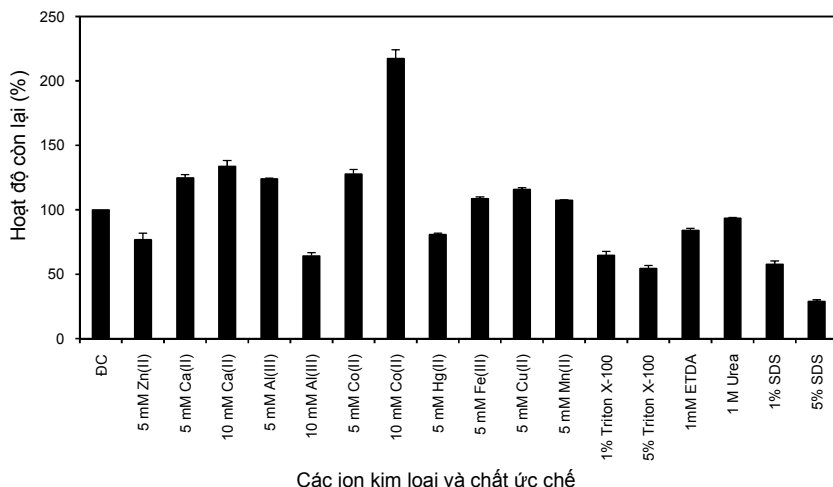
Khả năng hoạt động của enzyme còn phụ thuộc vào pH môi trường phản ứng. Tùy thuộc vào bản chất của enzyme mà pH thích hợp để enzyme hoạt động có thể trung tính, kiềm hoặc acid. Sau khi khảo sát hoạt tính enzyme trong khoảng pH từ 3-10 cho thấy hoạt tính enzyme mất hoàn toàn ở vùng kiềm (pH > 7), hoạt động mạnh ở khoảng pH 3,5-4,5, trong đó mạnh nhất ở pH 4,0. Hoạt độ riêng thu được đối với enzyme đã tinh sạch sơ bộ là 30,66 u/mg protein. Như vậy, đây là enzyme có khoảng pH hoạt động rất hẹp và chỉ hoạt động trong môi trường acid. Khi ủ dịch enzyme ở các khoảng pH khác nhau sau đó đưa về lại pH 4 cho thấy enzyme đều giữ lại được phần lớn hoạt tính (trên 80%).

Một số công bố trước đây cũng cho thấy enzyme CMCase hoạt động mạnh trong môi trường acid như endoglucanase III từ *T. reesei* QM 9414 là 4,0-5,0 (Macarrón *et al.*, 1993), CMCase từ *T. reesei* NRRL 3652 là 5,0 (Zhekova *et al.*, 2012), cellulase III từ *T. viride* là 4,5-5,0 (Okada, 1976), hoặc thấp hơn như CMCase từ *T. reesei* là 3,0 (Shafaq *et al.*, 2004). Một số enzyme có pH hoạt động tối thích cao hơn nghiên cứu của chúng tôi, thuộc vùng trung tính như 6,5 ở

cellulase từ *T. viride* (Iqbal *et al.*, 2011) hay 6,0 ở CMCase từ *T. harzianum* (Nawaz *et al.*, 2006).

Ảnh hưởng của ion kim loại

Sự có mặt của ion kim loại đã ảnh hưởng đến enzyme theo nhiều cơ chế khác nhau, nó có thể làm tăng hay giảm khả năng xúc tác của enzyme. Khảo sát ảnh hưởng của các ion kim loại lên hoạt tính CMCase cho thấy Zn^{2+} và Hg^{2+} có tác dụng ức chế hoạt động của enzyme này, hoạt độ thu được còn lại sau khi xử lý là khoảng 75%. Các ion kim loại còn lại đều có tác dụng tăng cường hoạt tính của enzyme, trong đó ảnh hưởng mạnh nhất là Ca^{2+} (125%), Al^{3+} (124%) và Co^{2+} (128%). Khi tăng nồng độ các ion này lên 10 mM, tác động của Ca^{2+} tăng lên không đáng kể (133%), trong khi đó Al^{3+} lại gây ức chế (còn 64%) và lại có hoạt tính tăng rất mạnh Co^{2+} (217%). Đối với các chất ức chế, tất cả các chất nghiên cứu đều ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme, ảnh hưởng nhiều nhất là 5% SDS (còn lại 29%) và 5% Triton X-100 (55%) (Hình 5).

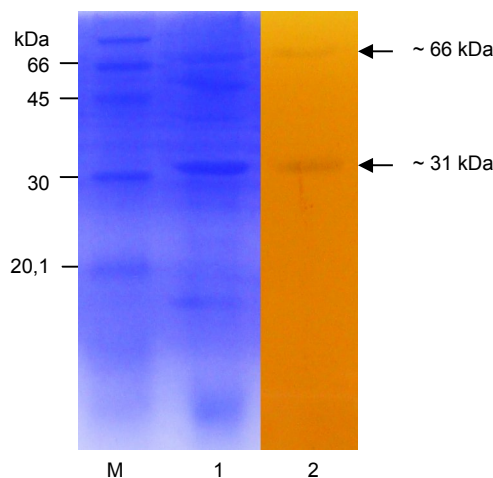


Hình 5. Ảnh hưởng của kim loại và các chất ức chế lên hoạt độ của enzyme CMCase.

Việc sử dụng các ion kim loại để tăng cường hoạt độ của enzyme cũng đã được nhiều tác giả nghiên cứu, Co^{2+} và Mn^{2+} tăng cường hoạt độ của cellulase từ *T. viride* (Iqbal *et al.*, 2011), Ca^{2+} và Co^{2+} tăng cường hoạt độ của CMCase từ *T. harzianum* lên gần gấp đôi (Nawaz *et al.*, 2006). Okada (1976) nhận thấy cellulase III từ *T. viride* bị ức chế bởi Hg^{2+} nhưng không bị tác động bởi EDTA (Okada, 1976), trong khi đó Iqbal và đồng tác giả (2011) công bố Hg^{2+} và SDS, EDTA ức chế hoạt độ của cellulase từ *T. viride*, nghiên cứu của Nawaz và đồng tác giả (2006) cũng cho thấy Hg^{2+} ức chế hoạt độ của CMCase từ *T. harzianum*.

Xác định khối lượng phân tử của CMCase

Kết quả điện di trên polyacrylamide gel cho thấy có 2 vùng phân giải cơ chất CMC xuất hiện ở vị trí khoảng 31 và 66 kDa. Điều này cho thấy CMCase ở *T. asperellum* PQ34 có thể là 2 loại khác nhau với khối lượng phân tử tương ứng là khoảng 31 và 66 kDa. Hiện nay, chưa có các công bố liên quan đến enzyme CMCase trên *T. asperellum*, tuy nhiên, trên các đối tượng khác thuộc chi *Trichoderma*, các công bố trước đây cho thấy enzyme này có rất nhiều loại với khối lượng phân tử khác nhau, ví dụ cellulase III từ *T. viride* có khối lượng phân tử là 45 kDa (Okada, 1976), endoglucanase III từ *T. reesei* QM 9414 là 48 kDa (Macarrón *et al.*, 1993) và cellulase từ *T. viride* là 58 kDa (Iqbal *et al.*, 2011). Như vậy, enzyme mà chúng tôi thu được khác với những enzyme đã được công bố.



Hình 6. Hình ảnh điện di enzyme CMCase. M: thang chuẩn khối lượng phân tử protein (Bio-Rad), 1 : protein ngoại bào tổng số, 2 : băng enzyme CMCase trên gel có 0,1% CMC sau khi nhuộm bằng thuốc nhuộm Lugol.

KẾT LUẬN

Cả 4 chủng nấm *T. asperellum* khảo sát đều có khả năng tiết enzyme CMCase ngoại bào để thủy phân cơ chất carboxymethyl cellulose, trong đó, chủng *T. asperellum* PQ34 có khả năng sinh CMCase mạnh nhất.

Enzyme CMCase từ chủng PQ34 được tổng hợp nhiều nhất sau 4 ngày nuôi cấy trong môi trường có 1% CMC, với hoạt độ chung là 0,083 u/mL và hoạt độ riêng là 3,624 u/mg protein.

CMCase có nhiệt độ và pH hoạt động tối thích lần lượt là 5°C và 4,0, bền ở nhiệt độ thấp và chỉ hoạt động ở vùng pH

acid. Ca^{2+} , Al^{3+} và Co^{2+} có tác dụng tăng cường mạnh hoạt động của enzyme trong khi Zn^{2+} , Hg^{2+} , SDS và Triton X-100 ức chế mạnh hoạt động của enzyme này.

CMCase ở *T. asperellum* PQ34 gồm 2 enzyme có khối lượng phân tử khoảng 31 và 66 kDa.

Lời cảm ơn: Đây là kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Tỉnh, được ngân sách nhà nước tỉnh Thừa Thiên Huế đầu tư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phạm Thị Trân Châu (CB), Phan Tuấn Nghĩa (2006) Công nghệ Sinh học. Tập 3: Enzyme và ứng dụng. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
- Trịnh Đình Khả, Quyền Đình Thi, Nguyễn Sỹ Lê Thanh (2007) Tuyển chọn và nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp.DTQ-HK1. *TC Công nghệ Sinh học* 5(3): 355-362.
- Trần Thị Lệ, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Xuân Kỳ (2012) Tuyển chọn chủng nấm *Trichoderma* spp. phân giải cellulose mạnh để sản xuất phân hữu cơ vi sinh và nghiên cứu ảnh hưởng của chúng đối với giống đậu xanh 208 vụ xuân 2011 tại HTX Hương Long, thành phố Huế. *TC Khoa học (Đại học Huế)* 71(2): 203-214.
- Baig MMV (2005) Cellulolytic enzymes of *Trichoderma lignorum* produced on banana agro-waste: Optimisation of culture medium and conditions. *J Sci Ind Res* 64: 57-60.
- Hung NB, Quang HT, Ha TTT, Thao TN, Chau TTD, Loc NH (2010) Isolation and characterization of 42 kDa chitinase from *Trichoderma asperellum*. *Vietnamese J Biotechnol* 8(3B): 1651-1657.
- Iqbal HMN, Ahmed I, Zia MA, Irfan M (2011) Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. *Adv BiosciBiotechnol* 2: 149-156.
- Li X, Yang H, Roy B, Park EY, Jiang L, Wang D, Miao Y (2009) Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. *Microbiol Res* 165(3): 190-198.
- Macarrón R, Acebal C, Castiellón MP, Domínguez JM, Manta IDL (1993) Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biochem J* 289: 867-873.
- Nawaz S, Malana MA, Ikram N, Hafeez S, Ghori MI, Jamil A (2006) Kinetic study of carboxymethyl cellulase from *Trichoderma harzianum*. *Pak J Life Soc Sci* 4(1-2): 15-19.
- Okada G (1976) Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*. *J Biochem* 80: 913-922.
- Shafaq A, Malana MA, Ikram N, Ghori MIs, Butt KY, Ahmed S (2004) Kinetic study of carboxymethylcellulase from *Trichoderma reesei*. *Pak J Life Soc Sci* 2(1): 1-4.
- Zhekova B, Dobrev G, Dobrev V, Hadjikinova M (2012) Characterization of enzyme with carboxymethyl cellulase activity produced by *Trichoderma reesei* NRRL 3652. *Agri Sci Tech* 4(3): 311-314.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE CARBOXYMETHYL CELLULASE FROM *TRICHODERMA ASPERELLUM*

Nguyen Hong Van², Hoang Tan Quang¹, Le My Tieu Ngoc¹, Nguyen Huu Nhan³, Cao Dang Nguyen², Nguyen Hoang Loc^{1,*}

¹Center for Technology Incubation and Transfer, Hue University

²College of Sciences, Hue University

³College of Food Industry, Da Nang

SUMMARY

Cellulase is a generic name for the group of enzymes which catalyze the hydrolysis of cellulose and related cellu-oligosaccharide derivatives, including carboxymethyl cellulase (CMCase), exo- β -glucanase and β -glucosidase. A highly CMCase producing-*Trichoderma asperellum* strain was collected from four *T. asperellum* strains supported by Institute of Resources, Environment and Biotechnology (Hue University) (strain PQ34). Maximum activity of extracellular CMCase from *T. asperellum* PQ34 was observed after 96 h inoculation of micelia on 1% carboxymethyl cellulose medium with total activity of 0.083 u/mL and specific activity of 3.624 u/mg protein. Characterization of the CMCase displayed an optimum pH at 4 and temperature at 55°C. The enzyme is high activity at a narrow pH values between 3.5-4.5 and is able to retain its high activity from 10 to 30°C. The presence of 10 mM Ca^{2+} , 5 mM Al^{3+} and 10 mM Co^{2+} ions increased the CMCase activity up to 133%, 124%, and 217%, respectively. It is also stable towards chelating reagent (1 mM EDTA) and denaturing agent (1 M urea) but inactivate by detergents (5% SDS and Triton-X100). SDS-PAGE and native PAGE shown that CMCase of *T. asperellum* PQ34 include 2 enzymes and their molecular weight were 31 and 66 kDa, respectively.

Keywords: cellulase, CMCase, endo- β -1,4-glucanase, *Trichoderma asperellum*.

* Author for correspondence: Tel: +84-54-6505051, Fax: +84-54-3830208, Email: nhloc@hueuni.edu.vn