

# **NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG ENZYME CELLULASE TÁCH TỪ VI SINH VẬT ĐỂ XỬ LÝ RƠM RẠ**

*Đến toà soạn 3 - 10 - 2008*

**Trần Thị Hồng, Nguyễn Thị Hà Giang**

*Khoa Hoá học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

## **SUMMARY**

### **STUDY ON USE OF ENZYME CELLULASE EXTRACTED FROM MICROORGANISM IN RICE TRAWS TREATMENT**

*We determined the ability of Cellulose decomposition and activity of the enzyme Cellulase extracted from the sorts of microbes: 2P, 7P and C32, C36. The results showed that among the four sorts of studied microbes, the 2P sort has highest activity of the extracted enzyme and therefore has highest ability in cellulose decomposition.*

*The rice traws decomposition using the extracted enzyme cellulase from the 2P microbes showed the nitric concentration 42,9% higher in comparison with that in the natural decomposition. Therefore, the enzyme extraction from the 2P microbe can be used in treatment of agricultural waste to produce the artificial fertilizer. This technique contributes to the environmental protection and sustainable development of the country.*

#### **1. MỞ ĐẦU**

Cellulose là thành phần cơ bản của vách tế bào thực vật. Theo Hêichl [5] sinh khối thực vật của trái đất là 1,8.10<sup>12</sup> tấn, trong đó cellulose chiếm 40%. Ở nước ta, hàng năm sau mỗi vụ thu hoạch đã để lại trên đồng ruộng một khối lượng lớn phế phụ phẩm nông nghiệp: rơm, rạ, thân cây, lá cây... Việc đốt lượng phế phụ phẩm trên đồng ruộng sau mỗi vụ thu hoạch đang dần hình thành một thói quen xấu, không những gây ảnh hưởng tới môi trường sinh thái mà còn rất lãng phí nguồn nguyên liệu có nguồn gốc thực vật này [1,2].

Trong bài báo này chúng tôi nghiên cứu sử dụng enzyme Cellulase tách từ hai chủng xạ

khủng 2P và 7P và 2 chủng vi khuẩn C32; C36 lấy từ Phòng công nghệ lên men - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Khoa học Công nghệ Việt Nam để xử lý rơm rạ, góp phần cải tạo độ phì cho đất, bảo vệ môi trường và phát triển bền vững.

#### **2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

*- Xác định hoạt tính enzyme Cellulase bằng phương pháp axit dinitro salicylic [6]*

Dựa trên khả năng hidro hoá cơ chất CMC của enzyme Cellulase để biến đổi thành đường Glucose. Glucose phản ứng tạo màu với thuốc thử DNS. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ đường Glucose trong

**một phạm vi nhất định.** Sản phẩm sau phản ứng được xác định bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 540nm.

**Hoạt độ enzyme Cellulase được tính theo công thức sau:**

$$\text{Hoạt độ U/ml} = \frac{(C_{TL} - C_{DC})}{T \times V} (*)$$

Trong đó:  $C_{TN}$ : Nồng độ đường của ống thí nghiệm, ( $\mu\text{mol/l}$ )

$C_{DC}$ : Nồng độ đường của ống đối chứng ( $\mu\text{mol/l}$ )

$V$ : Thể tích mẫu phản ứng (ml)

$T$ : Thời gian phản ứng (phút)

**Đánh giá khả năng phân giải Cellulose bằng phương pháp đục lỗ thạch**

Pha môi trường CMC, phân phối đều vào bình tam giác có dung tích 250ml. Khử trùng ở 1atm/30 phút. Sau đó, đổ môi trường ra đĩa petri tạo thành một lớp thạch dày khoảng 0,3cm. Để thạch nguội và đông lại, dùng dụng cụ đục hai lỗ tròn đối xứng có đường kính bằng nhau ( $d = 1\text{cm}$ ) trên đĩa thạch. Dung dịch enzyme được nhỏ vào các lỗ thạch. Các đĩa petri được cho vào tủ lạnh ở  $4^{\circ}\text{C}$  trong 2 giờ để enzyme khuếch tán. Lấy ra, ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  để enzyme tác dụng vào cơ chất CMC. Sau 24 - 48 giờ đổ thuốc thử Lugol vào để quan sát vòng phân giải. Đo đường kính vòng phân giải (D). Tỷ lệ  $D/d$  hoặc  $D - d$  càng lớn thì khả năng phân giải cơ chất của chúng càng cao [5].

**Ứng dụng trong xử lý rơm rạ:**

Cho vào 2 bình tam giác dung tích 250ml mỗi bình 5g rơm rạ cắt nhỏ.

**Bình tam giác 1 (ĐC):** Để rơm rạ phân hủy tự nhiên.

**Bình tam giác 2 (TN):** Cho thêm 2% dịch enzyme cellulase vào.

Phối trộn các nguyên liệu, đảo đều và điều chỉnh độ ẩm bình ủ sao cho độ ẩm nguyên liệu đạt 50 - 60%. Sau 22 ngày lấy mẫu đi phân

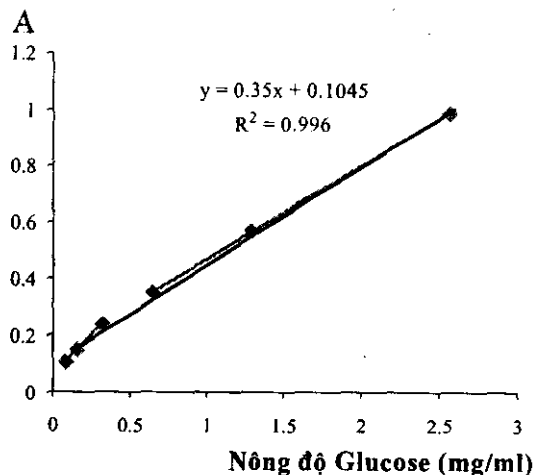
tích chỉ tiêu nitơ tổng số bằng phương pháp Kenden [3]. Đánh giá hiệu quả xử lý rơm rạ bằng cách so sánh hàm lượng nitơ tổng số trong mẫu rơm rạ được ủ ở bình đối chứng và bình thí nghiệm.

### 3. KẾT QUẢ

**3.1. Hoạt độ enzyme Cellulase từ các chủng vi sinh vật**

**- Dụng đường chuẩn Glucose:**

Lấy 300 $\mu\text{l}$  dung dịch Glucose ở mỗi nồng độ 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 1,28; 2,56 (mg/ml) cho vào dây ống nghiệm. Bổ sung 900 $\mu\text{l}$  dung dịch DNS vào mỗi ống nghiệm rồi đun sôi trong 5 phút. Làm lạnh nhanh dưới vòi nước chảy. Đo độ hấp thụ quang của dây dung dịch ở bước sóng 540nm. Từ kết quả đo, ta dựng đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ Glucose và độ hấp thụ quang.



**Hình 1. Đồ thị đường chuẩn Glucose**  
Phương trình chuẩn Glucose là:  $y = 0,35x + 0,1045$ ; Trong đó:  $y$  là độ hấp thụ quang;  $x$  là hàm lượng Glucose

**- Xác định hoạt độ enzyme Cellulase từ các chủng vi sinh vật:**

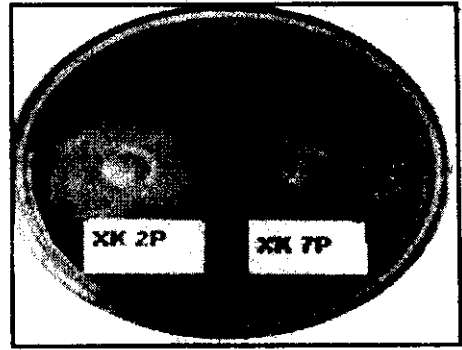
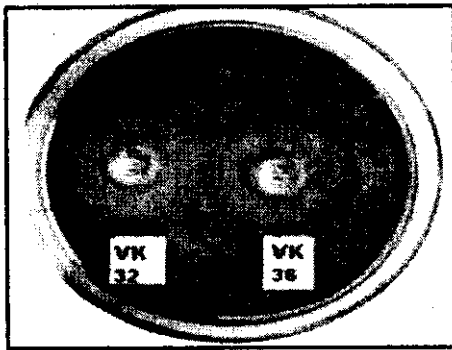
**+ Xác định hàm lượng Glucose trong mẫu thí nghiệm:** Lấy 150 $\mu\text{l}$  enzyme cho vào ống nghiệm, đặt vào bể ổn nhiệt ở  $50^{\circ}\text{C}$  trong 5

phút. Lấy mẫu ra cho thêm 150 $\mu$ l cơ chất CMC 1% (pH=7), khuấy trộn hỗn hợp thu được rồi tiếp tục ủ ở 50°C. Sau 30 phút, lấy ống nghiệm ra khỏi bể ổn nhiệt, bổ sung 900 $\mu$ l dung dịch thuốc thử DNS. Đun sôi 5 phút rồi làm lạnh nhanh dưới vòi nước chảy để hạ nhiệt độ dung dịch về nhiệt độ phòng. Tiến hành đo độ hấp thụ quang của dung dịch ở bước sóng 540nm.

+ **Xác định hàm lượng Glucose trong mẫu đối chứng:** Lấy 150 $\mu$ l enzyme cho vào ống nghiệm. Bổ sung 900 $\mu$ l dung dịch thuốc thử DNS để enzyme trong mẫu bất hoạt. Sau đó thêm 150 $\mu$ l dung dịch cơ chất CMC 1%. Tiến hành đun sôi 5 phút và làm các bước tiếp theo như ống nghiệm.

Thay giá trị độ hấp thụ quang đo được vào phương trình đường chuẩn Glucose ta tính được hàm lượng đường Glucose trong mẫu thí

### 3.2. Khả năng phân giải Cellulose của các chủng vi sinh



Hình 2. Hình ảnh phân giải Cellulose trên đĩa thạch

Bảng 2. Khả năng phân giải Cellulose trên đĩa thạch

STT	Ký hiệu chủng	D-d (cm)
1	C32	2,8
2	C36	2,1
3	2P	3,2
4	7P	1,8

Kết quả cho thấy, các chủng vi sinh vật đều có khả năng phân giải Cellulose. Trong đó, chủng 2P có khả năng phân giải Cellulose lớn hơn so với các chủng khác.

thực nghiệm và mẫu đối chứng. Áp dụng công thức (\*) ta tính được hoạt độ enzyme Cellulase tách từ các vi sinh vật. Kết quả được chỉ ra ở bảng 1.

Bảng 1. Hoạt độ enzyme Cellulase tách từ các chủng vi sinh vật

Kết quả tính toán	Dịch enzyme cellulase từ các chủng vi sinh vật			
	C32	C36	2P	7P
CTN (mg/ml)	1,373	0,753	2,307	1,053
CDC (mg/ml)	1,364	0,747	2,296	1,05
Hoạt độ (U/ml)	11,1	7,407	13,58	3,704

Kết quả cho thấy, hoạt độ enzyme Cellulase tách từ xạ khuẩn 2P có giá trị lớn nhất. Như vậy, chủng xạ khuẩn 2P có hoạt tính enzyme cellulase cao nhất, có khả năng phân giải cellulose lớn nhất trong 4 chủng vi sinh nêu trên.

Như vậy, chủng xạ khuẩn 2P là chủng có hoạt tính enzyme cellulase cao nhất, có khả năng phân giải cellulose lớn nhất trong 4 chủng vi sinh được nghiên cứu. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy rơm rạ của enzyme cellulase tách từ xạ khuẩn 2P.

### 3.3. Ứng dụng enzyme Cellulase trong xử lý rơm rạ

Hàm lượng N tổng số xác định bằng phương pháp Kenden được tính theo công thức:

$$N(\%) = \frac{(V_1 - V_2) * N * 0,014 * 100}{a}$$

Trong đó:  $V_1$  và  $V_2$  là số ml HCl dùng để chuẩn độ mẫu phân tích và mẫu trắng;  $N$  là nồng độ đương lượng của HCl;  $a$  là khối lượng mẫu khô kiệt tương đương với thể tích dung dịch đem đi cất.Đ

+ Mẫu rơm rạ phân hủy không có enzyme Cellulase

$$N(\%) = \frac{(0,9 - 0,2) * 0,05 * 0,014}{0,25} * 100 = 0,196(\%)$$

+ Mẫu rơm rạ phân hủy có enzyme Cellulase lấy từ chủng 2P

$$N(\%) = \frac{(1,2 - 0,2) * 0,05 * 0,014}{0,25} * 100 = 0,28(\%)$$

+ Tỷ lệ % hàm lượng nitơ tổng số của mẫu thí nghiệm so với mẫu đối chứng

$$\%TN/ĐC = \frac{0,28}{0,196} \% = 142,9(\%)$$

Kết quả phân tích trên cho thấy nồng độ N tổng số trong mẫu rơm rạ không có enzyme Cellulase nhỏ hơn so với mẫu có enzyme Cellulase.

Hàm lượng N tổng số trong mẫu rơm rạ chứa enzyme là 42,9%. Chúng tỏ mẫu rơm rạ chứa enzyme Cellulase tách từ chủng xạ khuẩn 2P sau khi được phân hủy có hàm lượng dinh dưỡng lớn hơn so với mẫu không có enzyme Cellulase.

#### 4. KẾT LUẬN

- Kết quả xác định khả năng phân giải Cellulose và hoạt độ enzyme Cellulase tách từ hai chủng xạ khuẩn 2P, 7P và 2 chủng vi khuẩn C32, C36 cho thấy, chủng xạ khuẩn 2P có hoạt tính enzyme cellulase cao nhất, có khả năng giải cellulose lớn nhất trong 4 chủng vi sinh được nghiên cứu.

- Rơm rạ phân hủy có sự tham gia của enzyme cellulase tách từ chủng xạ khuẩn 2P có nồng độ nitơ tổng số lớn hơn 42,9% so với nồng độ nitơ trong mẫu rơm rạ phân hủy tự nhiên. Như vậy, có thể sử dụng dung dịch enzyme tách từ xạ khuẩn 2P trong chế phẩm vi sinh để xử lý phế thải nông nghiệp, làm phân bón cho cây trồng một cách hiệu quả, phục vụ nền sản xuất nông nghiệp sạch, góp phần bảo vệ môi trường và phát triển bền vững.

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài QT - 08 - 70.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Báo cáo hiện trạng môi trường quốc gia, Bộ Tài nguyên và Môi trường, (2006).
2. Đỗ Thúc, Máy nhận xét ban đầu về nông thôn, nông nghiệp thủy sản nước ta hiện nay. Con số và sự kiện, Tạp chí của tổng cục thống kê, tr. 16-22, (tháng 1/2007).
3. APHA, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19<sup>th</sup> edition, (1995).
4. Enari T. M., Folan M. A, *Adv. Bioche. Eng* (5), pp. 1-24, (1997).
5. Gilbert J. J & Hazelwood G. P *Bacterial cellulases and xylanases*. J. Gen. Microbiol, pp. 187 - 194, (1993).
6. Heichel G. H, *Energetics of producing agricultural sources of cellulose*, Biotechnol. Bioeng. Symp (5), pp. 43 - 47, (1975).