



TRƯỜNG ĐẠI HỌC AN GIANG
KHOA NÔNG NGHIỆP - TÀI NGUYÊN THIÊN NHIÊN

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP
KỸ SƯ NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC

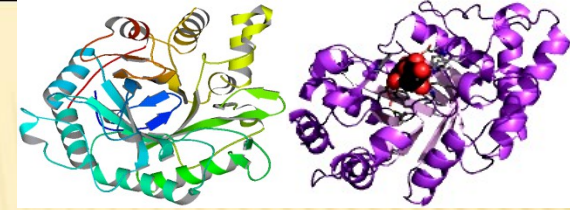
*Nghiên cứu thu nhận enzym cellulase, xylanase
từ bịch meo nấm sau thu hoạch và ứng dụng
trong xử lý rơm rạ*

GVHD: TS. Hoàng Quốc Khánh

SVTH: Mai Kim Rí

1. GIỚI THIỆU

1.1. ĐẶT VẤN ĐỀ



- Nước ta là một nước nông nghiệp với nguồn phụ phế phẩm giàu chất xơ;
- Nghề trồng lúa hàng năm thải ra hàng tấn rơm rạ, trong rơm rạ cellulose chiếm tỷ lệ rất cao và rất khó bị phân hủy;
- Việc phân hủy cellulose bằng phương pháp vật lý và hóa học rất tốn kém và gây độc hại cho môi trường. Trong khi, việc xử lý các chất thải hữu cơ chứa cellulose bằng công nghệ sinh học, đặc biệt sử dụng cellulase và xylanase ngoại bào từ vi sinh vật có nhiều ưu điểm;
- Vì những lí do trên, đề tài: “*Nghiên cứu thu nhận enzym cellulase, xylanase từ bịch meo nấm sau thu hoạch và ứng dụng trong xử lý rơm rạ*” được tiến hành với hy vọng sẽ thu được chế phẩm enzym có hoạt tính cao.

1. GIỚI THIỆU

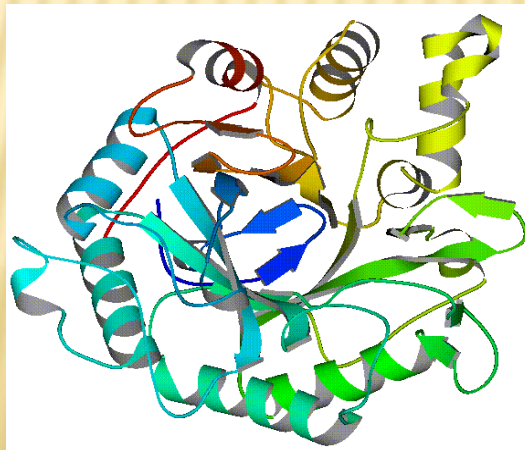
1.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- ✘ Thu nhận cellulase và xylanase từ bịch meo trồng nấm.
- ✘ Xác định hoạt tính cellulase, xylanase ly trích được.
- ✘ Khảo sát pH và nhiệt độ tối ưu của enzym cellulase và xylanase.
- ✘ Xác định khả năng thủy phân rơm rạ của enzym thí nghiệm theo thời gian.
- ✘ Ứng dụng enzym thí nghiệm thủy phân rơm rạ đã qua xử lý ở nhiệt độ và pH tối ưu.
- ✘ Phân tích protein trên gel Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel (SDS-PAGE).

2. TỔNG QUAN

2.1. ENZYM CELLULASE

- ✗ Cellulase là một phức hợp gồm nhiều enzym, các loại phức hợp này sẽ lần lượt thủy phân cellulose thông qua thủy phân liên kết 1,4- β -glucosid, sản phẩm cuối cùng là glucose.
- ✗ Hệ enzym phân hủy cellulose phân ra làm 3 nhóm:
 - 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolase (endoglucanase)
 - 1,4 β -D-glucan celluobiohydrolase (exocellulase)
 - β -D-glucosidase glucohydrolase (cellobiase)

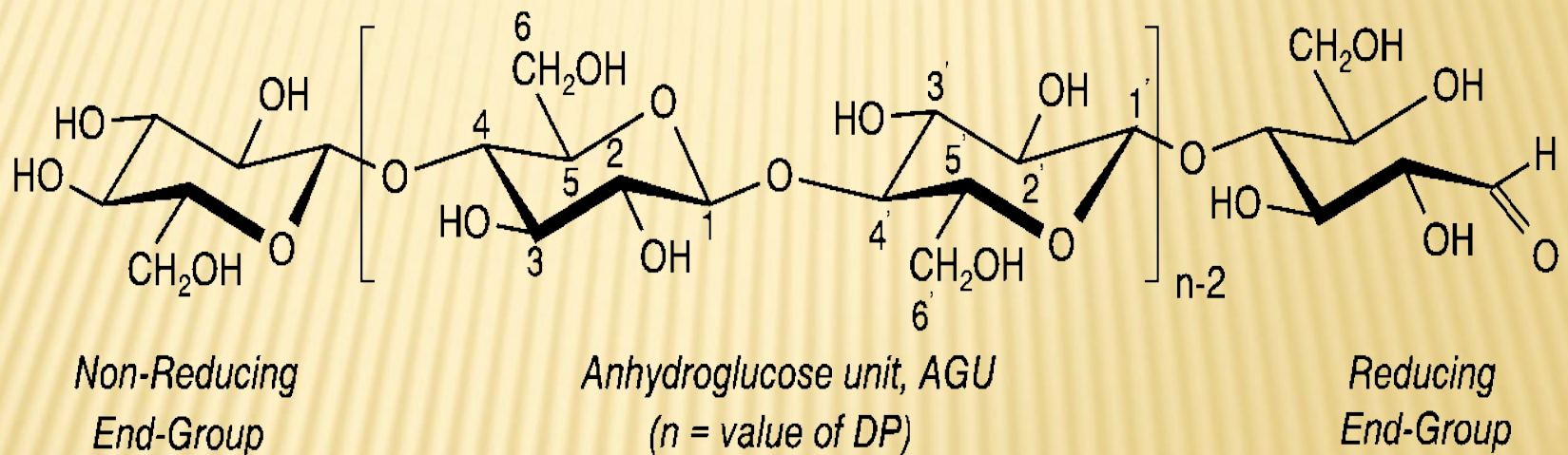


Cấu trúc endoglucanase

2.1. ENZYM CELLULASE

CƠ CHẤT CELLULOSE

Cellulose là hợp chất cơ bản của thực vật, số loài vi sinh vật, ở tế bào thực vật và VSV chúng tồn tại ở dạng sợi.

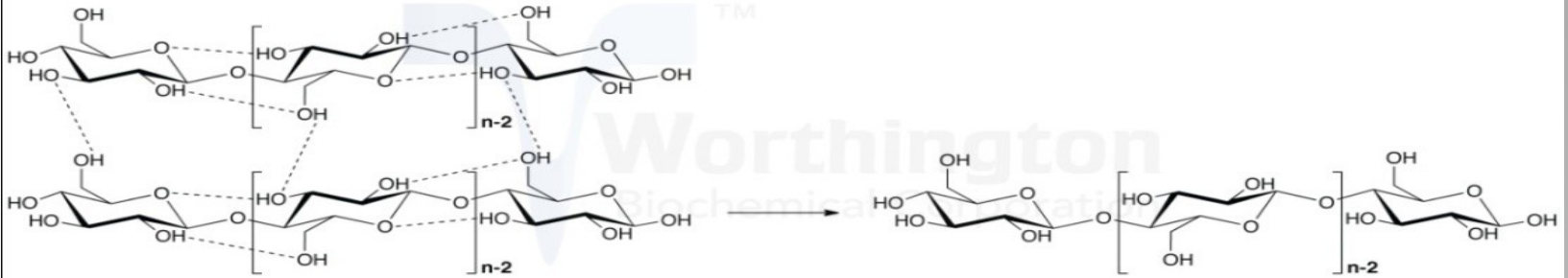


Chuỗi mạch thẳng của cellulose trong không gian

2.1. ENZYM CELLULASE CƠ CHẾ TÁC DỤNG:

- × **Endoglucanase: phân giải liên kết β -1,4-glucosid trong cellulose, lichenin và β -D-glucan.**
- × **Exocellulase: cắt đặc hiệu β -1,4 glucosid ở đầu không khử của chuỗi.**
- × **Cellobiase: thủy phân cellobiose, tạo thành glucose**

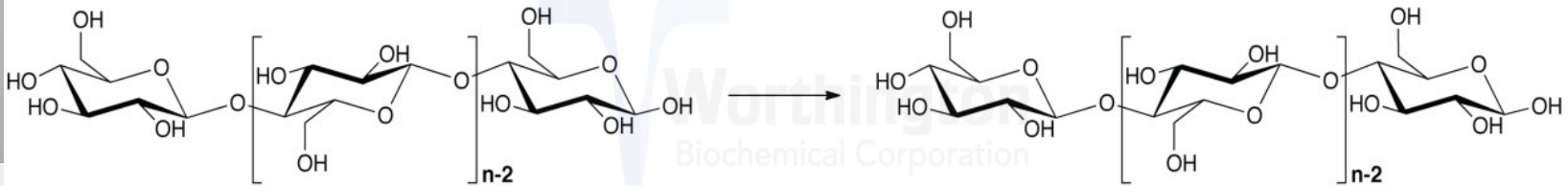
Endocellulase



Cellulose (crystal; $n = 10^2 - 10^4$ glucose residues)

Cellulose ($n = 10^2 - 10^4$ glucose residues)

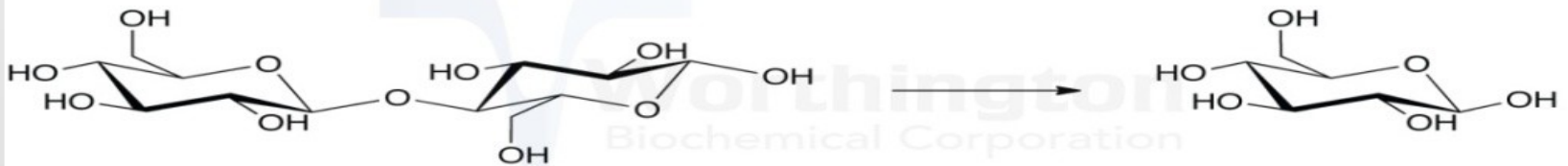
Exocellulase



Cellulose ($n = 10^2 - 10^4$ glucose residues)

Cellulose ($n = 10^2 - 10^4$ glucose residues)

Cellobiase



Cellobiose

β -D-Glucose

Sự thủy phân cellulose của cellulase

2.1. ENZYM CELLULASE

VI SINH VẬT THAM GIA TỔNG HỢP CELLULASE

Fungi	<i>Acremonium cellulolyticus</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	Bacteria Actinomycetes	<i>Clostridium thermocellum</i>
	<i>Aspergillus acculeatus</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>		<i>Ruminococcus albus</i>
	<i>Aspergillus fumigates</i>	<i>Sporotrichum cellulophilum</i>		<i>Streptomyces sp.</i>
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Talaromyces emersonii</i>		<i>Streptomyces sp.</i>
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Thielavia terrestris</i>		<i>Thermoactinomyces sp.</i>
	<i>Irpex lacteus</i>	<i>Trichoderma koningii</i>		<i>Thermomonospora curvata</i>
	<i>Penicillium funniculosum</i>	<i>Trichoderma reesei</i>		

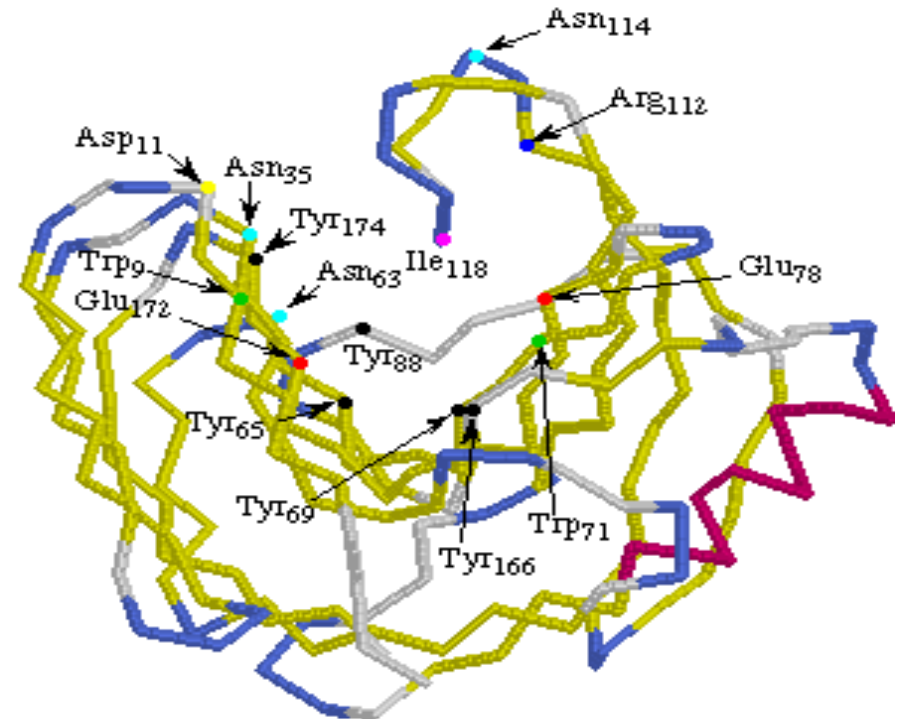
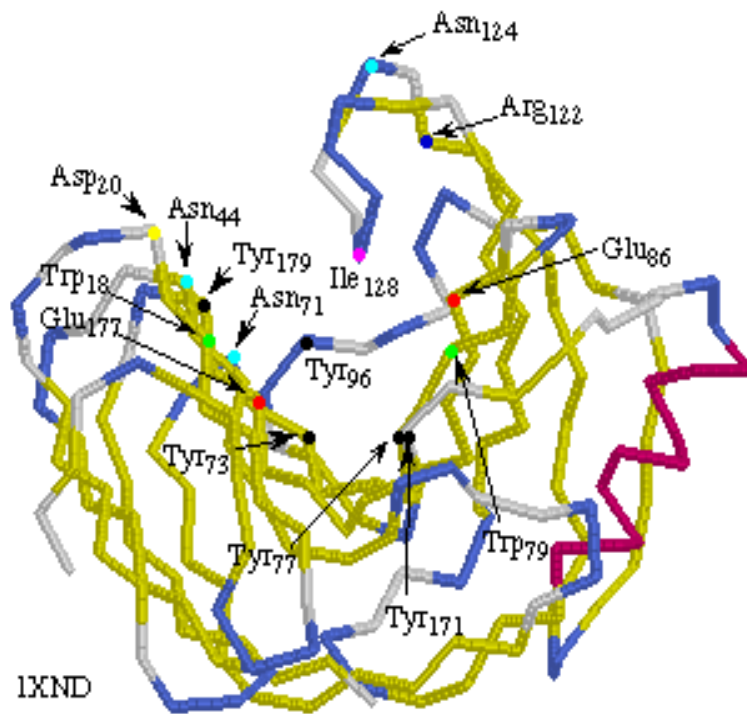
Những vi sinh vật tham gia tổng hợp cellulase được quan tâm

2.2. ENZYM XYLANASE

- ✦ **Danh pháp: 1,4-β-D-xylanohydrolase**
- ✦ **Tên thường gọi : endo-1,4-β- xylanase**
- ✦ **Thuộc loại: Thủy phân**
- ✦ **Cơ chất: Xylan**
- ✦ **Sản phẩm tạo thành: Xylose**
- ✦ **Xylanase là một tác nhân sinh học thuộc nhóm enzym thủy phân, chủ yếu xúc tác các phản ứng nội thủy phân các cầu nối 1,4-β-D-xylosidic ở xylan và tạo ra xylose.**



Xylanase họ 10



Xylanase họ 11 từ *Bacillus circulans* và *Trichoderma harzianum*

2.2. ENZYM XYLANASE CƠ CHẤT XYLAN

- ✘ Xylan là một hemicellulose phổ biến nhất trong tự nhiên, chiếm khoảng 30% khối lượng trong rơm rạ, 15 – 30% cây gỗ lá rộng, 7 – 10% cây gỗ lá kim.**
- ✘ Xylan đa dạng về cấu trúc và khối lượng phân tử.**
- ✘ xylan thủy phân hoàn toàn khi có sự kết hợp mạnh của nhiều enzym hoạt động.**

2.2. ENZYM XYLANASE

MỘT SỐ ĐẶC TÍNH

❖ *Tính chịu nhiệt:*

- Hoạt tính xylanase cao nhất được xác định ở 80°C. Tuy nhiên nó vẫn duy trì hoạt tính xấp xỉ 70% ở 90°C.
- Tùy nhiệt độ tối ưu, enzym có thể được chia thành: nhóm chịu nhiệt trung bình (40 - 60°C), nhóm chịu nhiệt (50 - 80°C) và nhóm chịu nhiệt cao (> 80°C)

❖ *Tính chịu pH:*

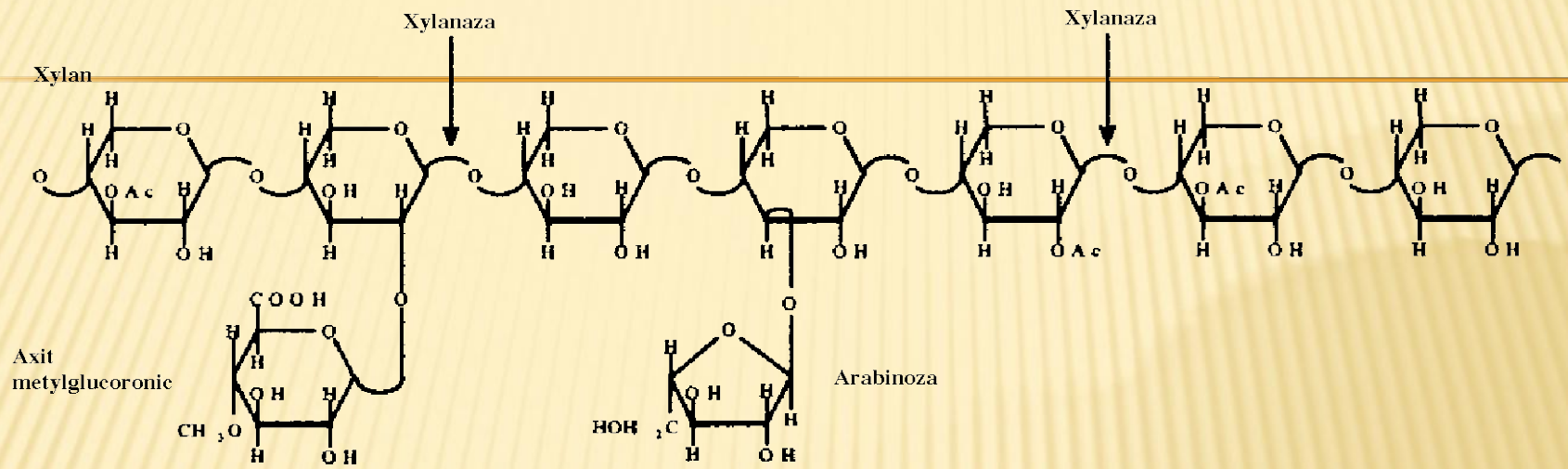
- pH tối ưu đối với hoạt tính xylanase là từ 3,0 và hoạt tính được duy trì trên 50%, pH 2,5 – 5,0.
- Hầu hết xylanase nắm thể hiện hoạt tính cao dưới điều kiện acid nhẹ. Xylanase ổn định ở pH acid cao (pH 1,0 – 5,0)

2.2. ENZYM XYLANASE CƠ CHẾ TÁC DỤNG

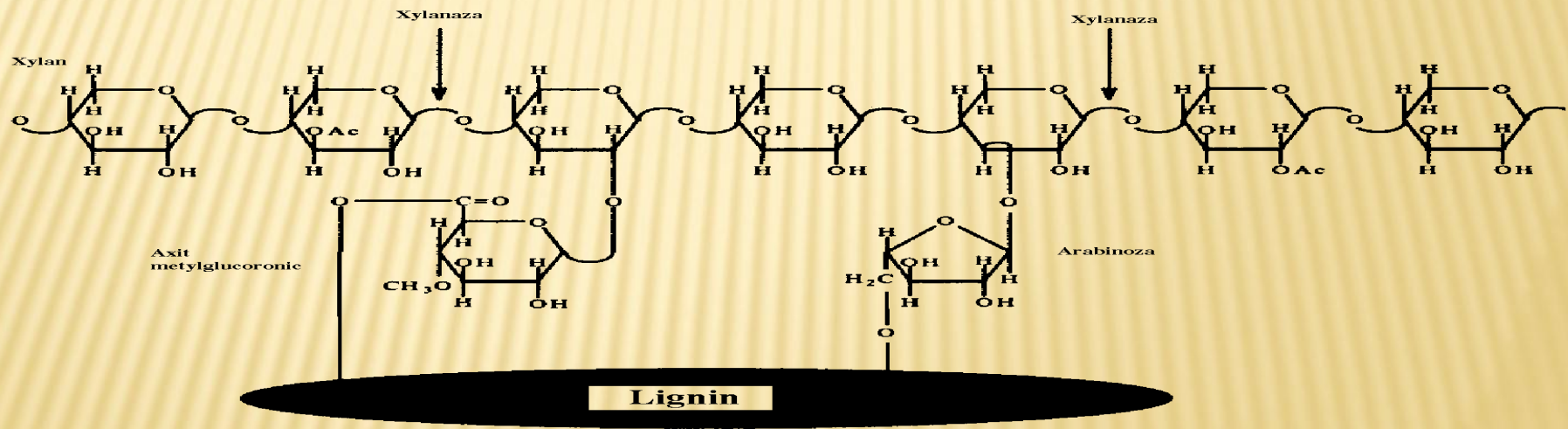
Xylanase có hai tác dụng chính:

- Tác dụng trực tiếp lên liên kết lignin – xylan
- Xúc tác quá trình phân giải và hoà tan các xylan trong vách tế bào, làm cho lignin dễ khuếch tán ra ngoài xơ sợi, đồng thời giải phóng các xylose.

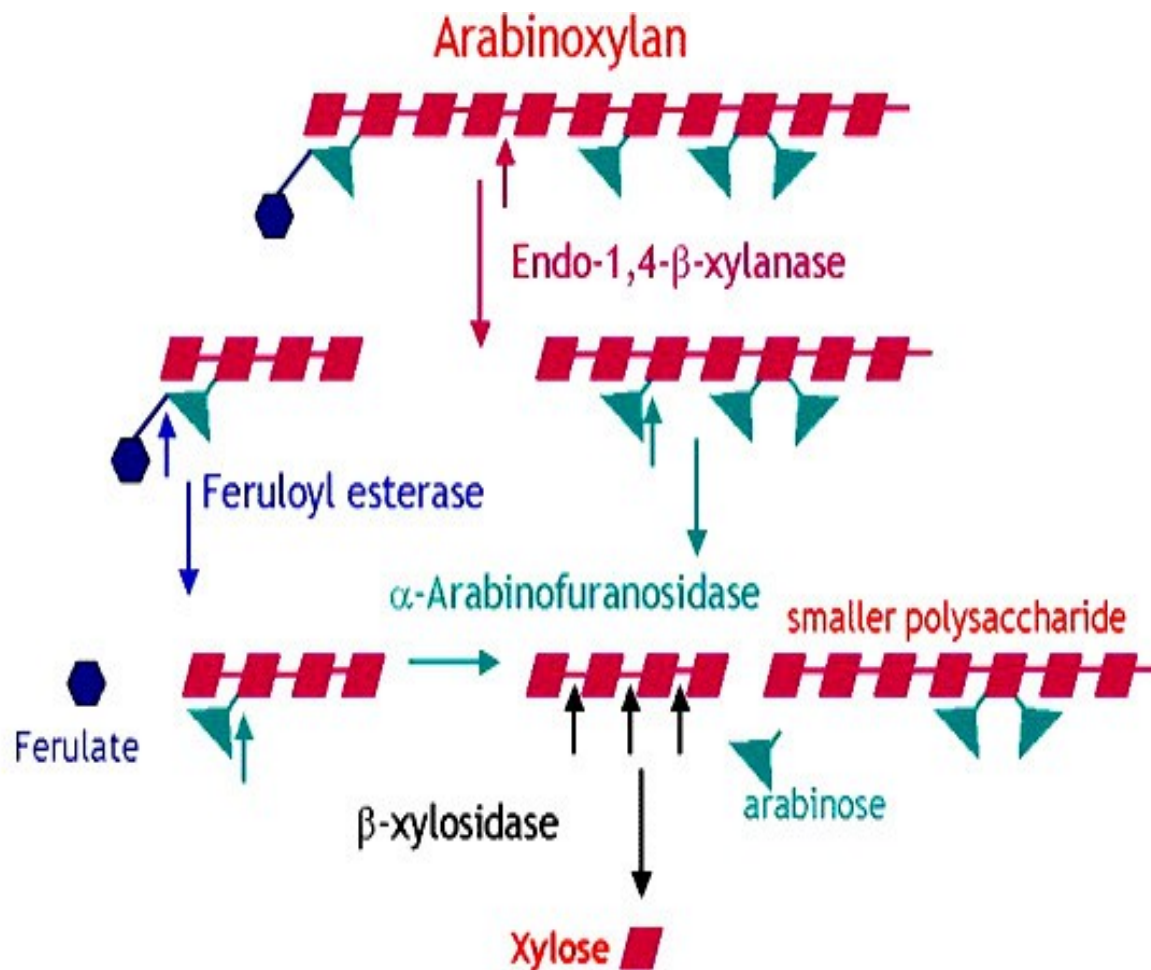
a



b

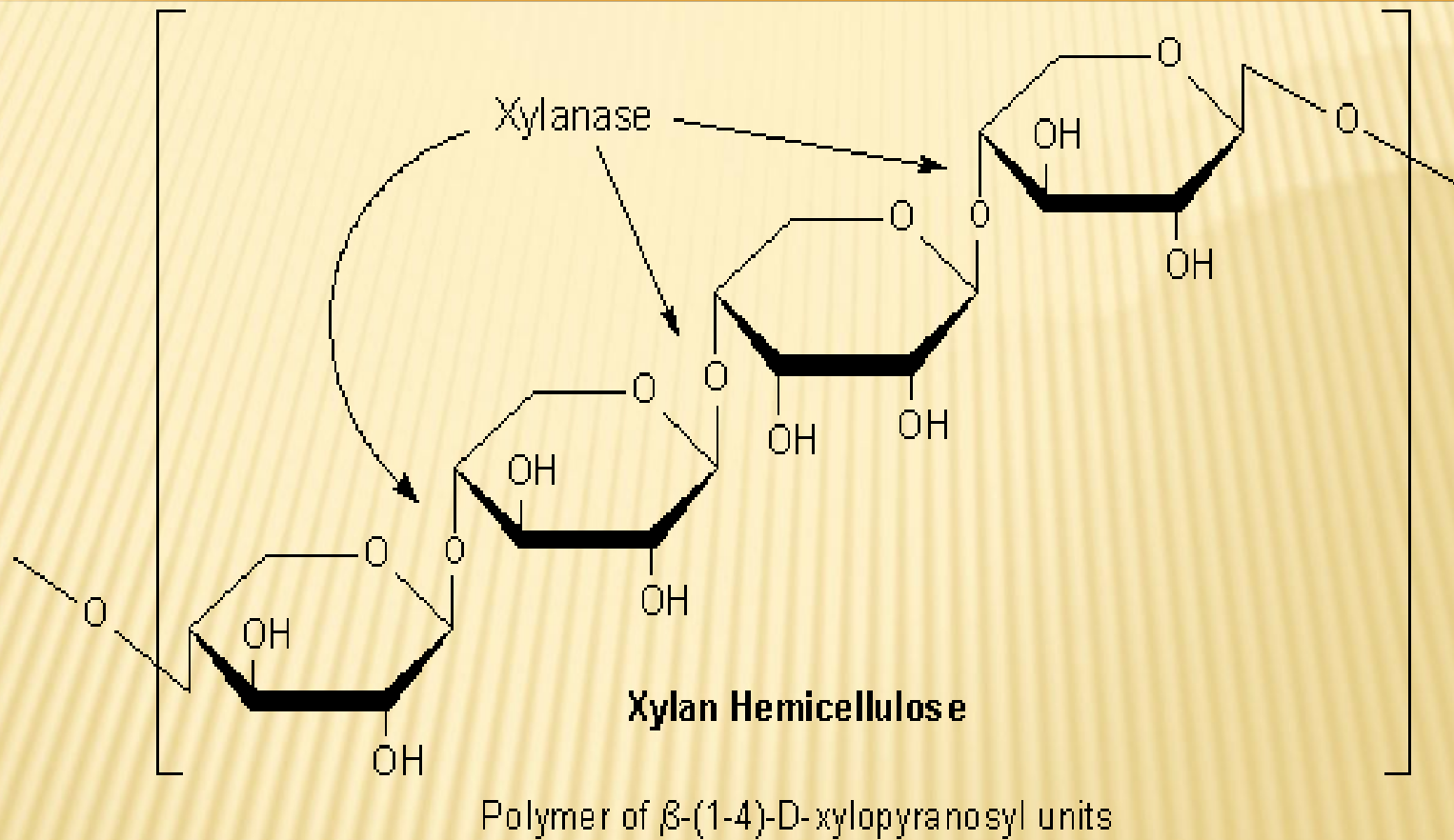


Hoạt động của xylanase trong vách tế bào thực vật



Cơ chế hoạt động của xylanase

Xylanase Specificity



Các vị trí xúc tác đặc hiệu của xylanase

2.3. NẤM LỚN

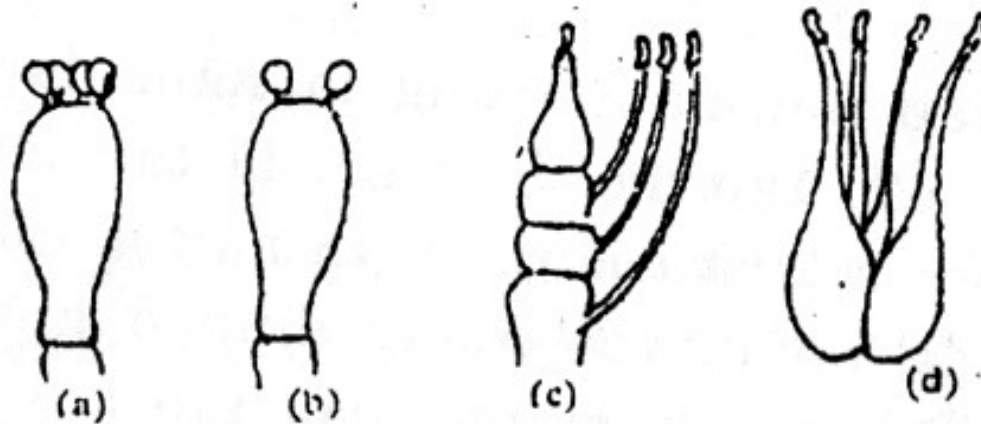
ĐẶC ĐIỂM CHUNG

- ✘ Đặc điểm chung là quả thể có kích thước lớn (dạng tán dù), ăn ngon và ít bị ràng buộc của môi trường xung quanh trong việc tạo quả thể, hầu hết không có màu xanh.**
- ✘ Đặc điểm phổ biến ở nấm là cấu trúc dạng sợi hay sợi nấm (khuẩn ty). Có những loài chỉ là một tế bào (đơn bào), nhưng cũng có những tế bào chứa nhiều nhân (cộng bào).**
- ✘ Nấm bậc cao bao gồm nang khuẩn, đảm khuẩn và nấm bất toàn.**

2.3. NẤM LỚN

ĐẶC ĐIỂM SINH SẢN

Nấm ăn, bào tử sinh ra bên dưới cấu trúc đặc biệt gọi là mũ nấm (tai nấm). Mũ nấm thường có cuống nâng lên cao để có thể nhờ gió đưa bào tử bay xa. Bào tử nảy mầm cho lại hệ sợi nấm mới.



Hình 2 : Các kiểu đảm ở nấm trồng

(a) đồng đảm (4 bào tử) nấm rơm *V.volvacea*

(b) đồng đảm (2 bào tử) nấm mỡ *A.bisporus*

(c) dị đảm (ngăn ngang) nấm mèo *Au.polytricha*

(d) dị đảm (ngăn dọc) nấm tuyết *Tremella fuciformis*

Các kiểu đảm ở nấm trồng

2.3. NẤM LỚN

ĐẶC ĐIỂM BIẾN DƯỠNG VÀ SINH LÝ

- ✘ Nấm chủ yếu sống dị dưỡng, lấy thức ăn từ các nguồn hữu cơ. Hầu hết các loài nấm đều lấy dinh dưỡng qua màng tế bào hệ sợi.
- ✘ Dựa theo cách dinh dưỡng của nấm, chia thành 3 nhóm:
 - Hoại sinh,
 - Ký sinh
 - Cộng sinh

2.4. ENZYM CỦA NẤM LỚN

- ✘ Nhiều loại nấm có hệ enzym phân giải tương đối mạnh, giúp chúng có thể sử dụng các dạng thức ăn phức tạp, bao gồm các đại phân tử như chất xơ (cellulose, hemicelluloses), chất đạm (protein), chất bột (amodon và amilose), chất mộc (lignin),...
- ✘ Tùy vào từng đặc tính sinh học, điều kiện nuôi trồng mà khả năng sinh tổng hợp nên cellulase và xylanase của các loài khác nhau.
- ✘ Hemicellulase là enzyme thủy phân hemicellulose với cơ chế gần giống cellulase, thường được vi sinh vật tổng hợp với số lượng khá lớn. Các cấu trúc của chúng cũng đơn giản hơn và kém bền hơn cellulase

3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

3.1. VẬT LIỆU

Nguyên liệu:

+ Rơm rạ đã xử lý

+ Bịch meo trồng nấm Bào Ngư, Linh Chi, Hầu Thủ, nấm

Rơm sau thu hoạch ở các địa phương

Ký hiệu mẫu	Nguồn gốc	Nơi thu mẫu
BT1	Bịch meo trồng bào ngư trắng	Q. Ô Môn, Cần Thơ
BT2	Bịch meo trồng bào ngư trắng	TP Cao Lãnh, Đồng Tháp
BT3	Bịch meo trồng bào ngư trắng	Q. Bình Chánh, TPHCM
BT4	Bịch meo trồng bào ngư trắng	TP Mỹ Tho, Tiền Giang
BN1	Bịch meo trồng bào ngư Nhật	H. Châu Thành, An Giang
BN2	Bịch meo trồng bào ngư Nhật	TP Mỹ Tho, Tiền Giang
BX1	Bịch meo trồng bào ngư xám	TP Mỹ Tho, Tiền Giang
BX2	Bịch meo trồng bào ngư xám	H. Tháp Mười, Đồng Tháp
HT	Bịch meo trồng hầu thủ	TP Mỹ Tho, Tiền Giang
LC1	Bịch meo trồng linh chi	TP Mỹ Tho, Tiền Giang
LC2	Bịch meo trồng linh chi	Q. Bình Chánh, TPHCM
R	Bịch meo trồng nấm rơm	Q. Ô Môn, Cần Thơ

Nguồn gốc các mẫu thí nghiệm

3.1. VẬT LIỆU

Thiết bị và dụng cụ:

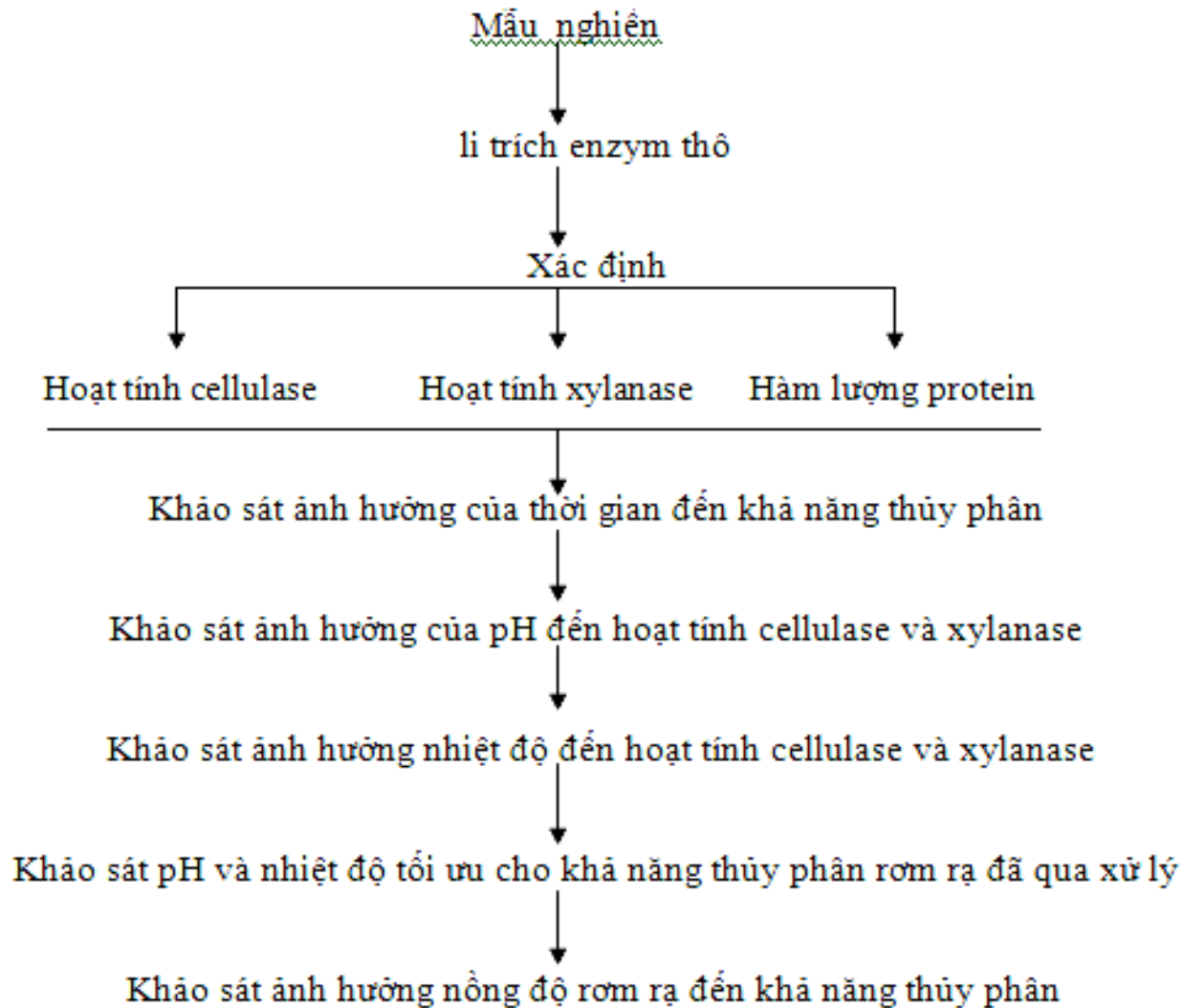
- Vortex mixer
- Bộ điện di
- Bếp cách thủy, tủ ủ, bể điều nhiệt
- Máy li tâm, máy lắc điều nhiệt, máy đo mật độ quang
- Bình tam giác, ống nghiệm, lọ thủy tinh màu nâu nút kín
- Giấy lọc, phễu thủy tinh, mycropipet, pipet,
- Bình định mức 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml
- Một số thiết bị cần thiết trong thí nghiệm.

3.1. VẬT LIỆU

Hóa chất:

- ✘ Pha dd đệm acetate: CH_3COOH và CH_3COONa , Tween 20, CaCl_2 .
- ✘ Pha dd đệm $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ và KH_2PO_4 .
- ✘ Pha dd đệm Glycine – HCl: Glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) và HCl đặc (37%).
- ✘ Hóa chất xác định hoạt tính cellulase và xylanase: Glucose, xylose, Xylan, CMC.
- ✘ Pha thuốc thử DNS: 2-Hydroxy-3,5-dinitrobenzoic acid, Potassium solution tartate tetrahydrate (Trung Quốc), NaOH, KOH.
- ✘ Thuốc thử Bradford (Bio- Rad).
- ✘ Hóa chất dùng trong phương pháp Điện di:
 - Acrylamide stock 30%,
 - Bis-Acrylamide (N,N'-methylenebisacrylamide),
 - Tris-2-hydroxymethyl sulfate,
 - SDS (sodium dodecyl sulfate or sodium lauryl sulfate),
 - TEMED (N,N,N,N'-tetramethylenediamide),
 - Amonium persulfate, Glycerol, Bromophenol blue, Glycine, HCl, 2-mercaptoethanol.
- ✘ Enzym Cellulase và xylanase của hãng Amano và Fluka.

3.2. PHƯƠNG PHÁP



Qui trình thực hiện thí nghiệm

3.2. PHƯƠNG PHÁP

3.2.1. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

- × Xác định hoạt tính cellulase và xylanase**
- × Xác định hàm lượng protein**
- × Phương pháp định lượng đường khử**
- × Điện di phân tích protein**

3.2. 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm 1:

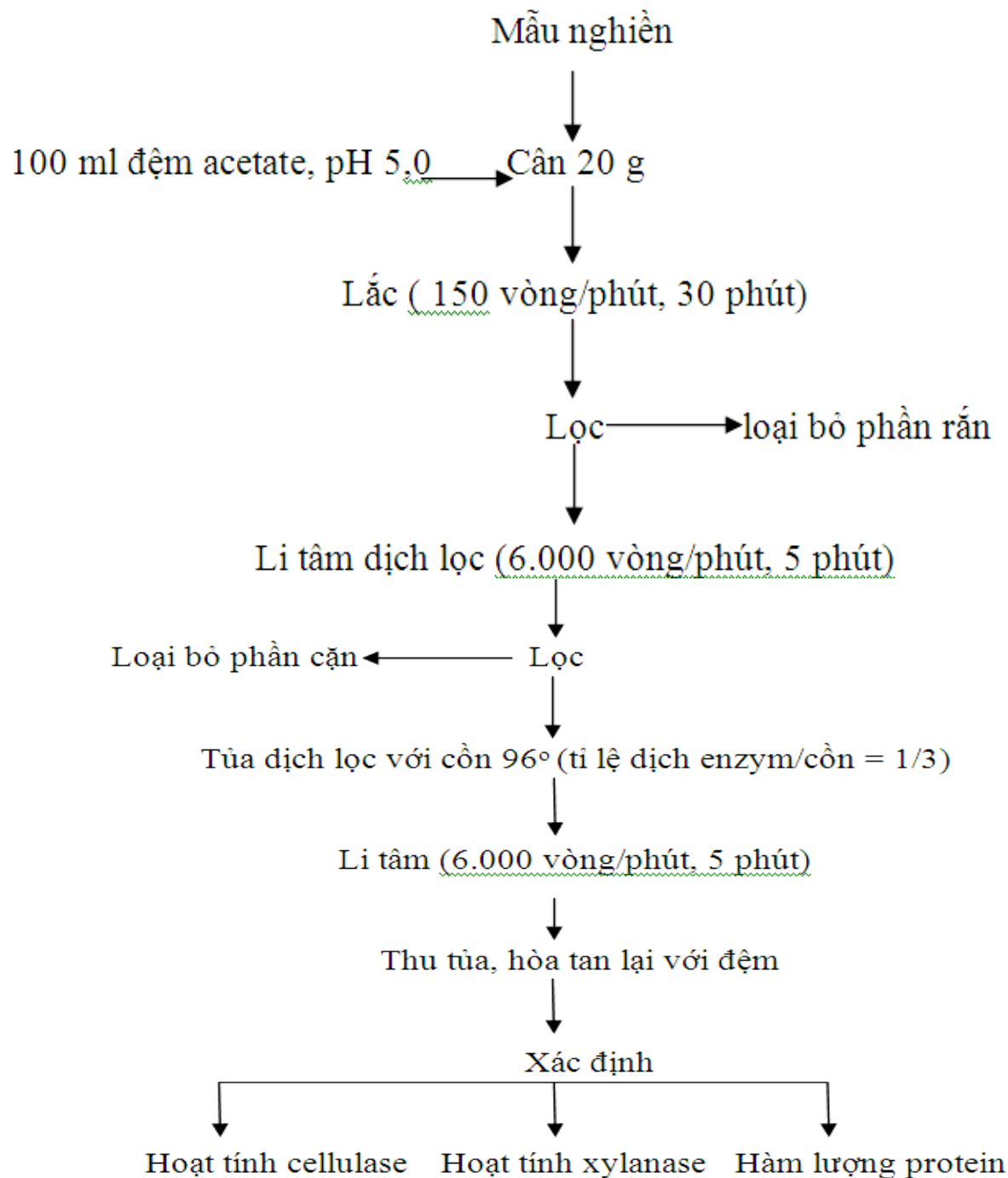
Khảo sát hoạt tính cellulase, xylanase thu nhận được từ các bịch meo trồng nấm

THÍ NGHIỆM 1

Mục tiêu:

Chọn enzym cellulase và xylanase thí nghiệm có hoạt tính cao để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

*Sơ đồ thực hiện
thí nghiệm 1*



3.2. 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm 2:

Khảo sát ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của cellulase và xylanase thí nghiệm

THÍ NGHIỆM 2

Mục tiêu:

Chọn được pH thích hợp để cellulase và xylanase thí nghiệm hoạt động mạnh nhất.

Thí nghiệm 2

Mẫu nghiên



Li trích enzym thô với đệm

pH 2,2

pH 3,0

pH 4,0

pH 5,0

pH 6,0

pH 7,0

pH 8,0



Xác định hoạt tính cellulase và xylanase

Sơ đồ thực hiện thí nghiệm 2

3.2. 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm 3:

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của cellulase và xylanase thí nghiệm

THÍ NGHIỆM 3

× *Mục tiêu:*

Chọn được nhiệt độ tối ưu của enzym cellulase và xylanase

× *Tiến hành:*

Dựa trên pH tối ưu được chọn ở thí nghiệm 2 cho phản ứng để xác định hoạt tính cellulase và xylanase ở nhiệt độ: 40°C; 45°C; 50°C; 55°C; 60°C; 70°C.

3.2. 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm 4:

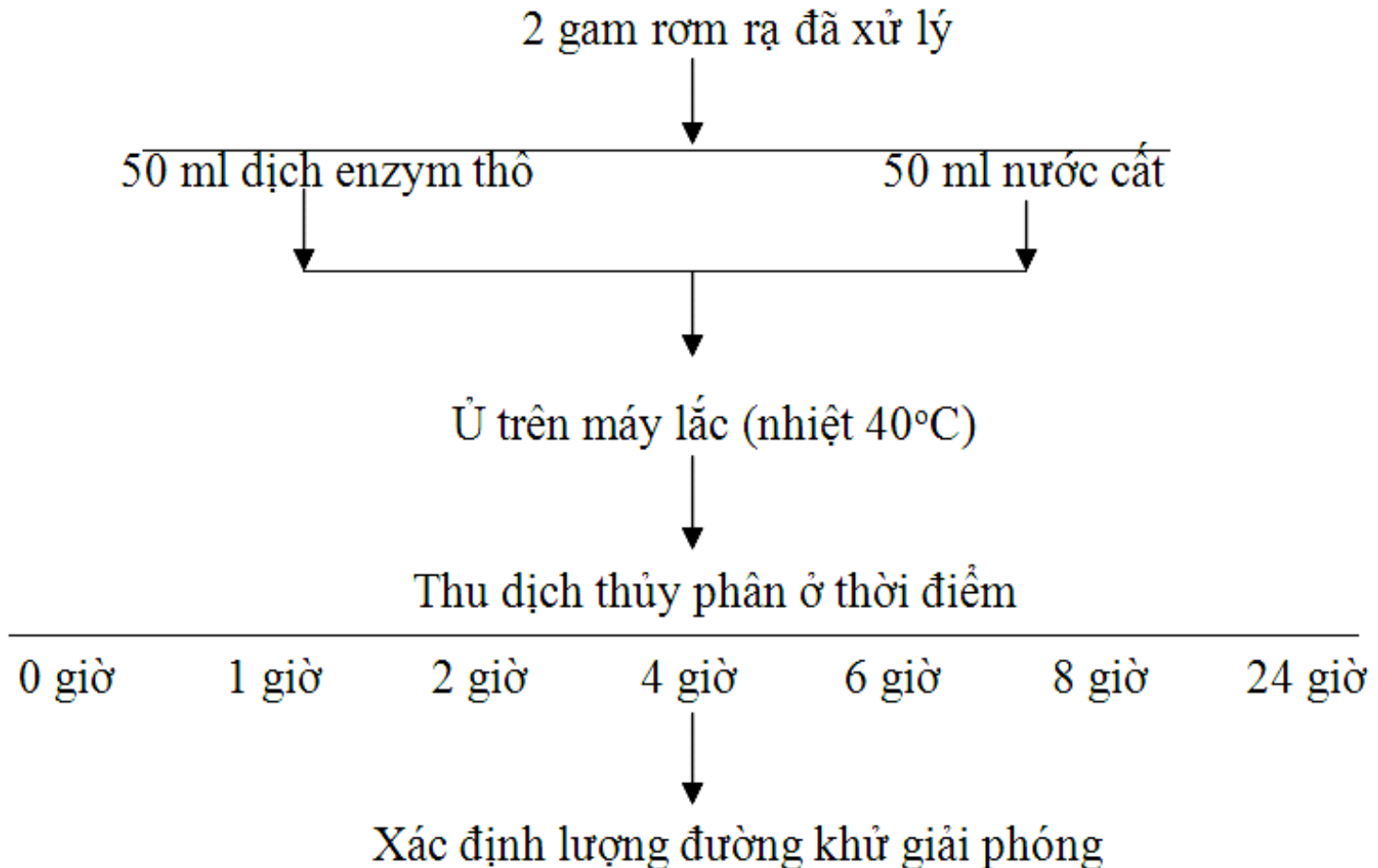
*Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến khả năng đường
hóa rơm rạ đã qua xử lý của enzym thí nghiệm*

THÍ NGHIỆM 4

Mục tiêu:

**Chọn thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân
rơm rạ**

Thí nghiệm 4



Sơ đồ thực hiện thí nghiệm 4

3.2. 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm 5:

Khảo sát pH và nhiệt độ tối ưu cho khả năng thủy phân rơm rạ đã qua xử lý của enzyme thí nghiệm.

THÍ NGHIỆM 5

✘ **Mục tiêu:**

Chọn được pH và nhiệt độ thích hợp để quá trình thủy phân rơm rạ đạt hiệu quả cao.

✘ **Tiến hành:**

Dựa vào kết quả thí nghiệm 2, 3 và 4 để thiết lập các điều kiện (thời gian, pH, nhiệt độ) cho quá trình thủy phân.

Cân 0,2 g rơm rạ đã xử lý + 5 ml dịch enzym thô với pH vừa thiết lập, ủ trên máy lắc ở nhiệt độ vừa thiết lập, thời gian thủy phân được chọn ở thí nghiệm 2. Xác định hàm lượng đường khử.

THÍ NGHIỆM 5

Xác định hàm lượng đường khử :

Lượng đường khử giải phóng sau do quá trình thủy phân ở thời gian t ($t \neq 0$).

$$M = G - (M_m + M_0)$$

Trong đó:

M: Đường giải phóng do quá trình thủy phân ở thời gian t (mg/ml).

G: Đường khử trong dịch thủy phân ở thời gian t ($t \neq 0$) ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

M_m : Đường tự do trong dịch enzym thô ($t=0$) ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

M_0 : Đường của mẫu blank ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

3.2. 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm 6:

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ rơm rạ đến khả năng thủy phân của enzym thí nghiệm

THÍ NGHIỆM 6

Mục tiêu:

Chọn được nồng độ rơm rạ thích hợp để quá trình thủy phân đạt hiệu quả cao.

THÍ NGHIỆM 6

5 ml dịch enzym thí nghiệm

với có pH tối ưu

5 ml nước cất

(mẫu blank)

Rơm rạ đã xử lí

0,05 g

0,1 g

0,15 g

0,2 g

0,25 g

0,3 g

Ủ trên máy lắc (nhiệt độ và thời gian tối ưu ở thí nghiệm 5)

Xác định lượng đường khử

Sơ đồ thực hiện thí nghiệm 6

3.2. 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

ĐIÊN DI PHÂN TÍCH PROTEIN

Mục tiêu:

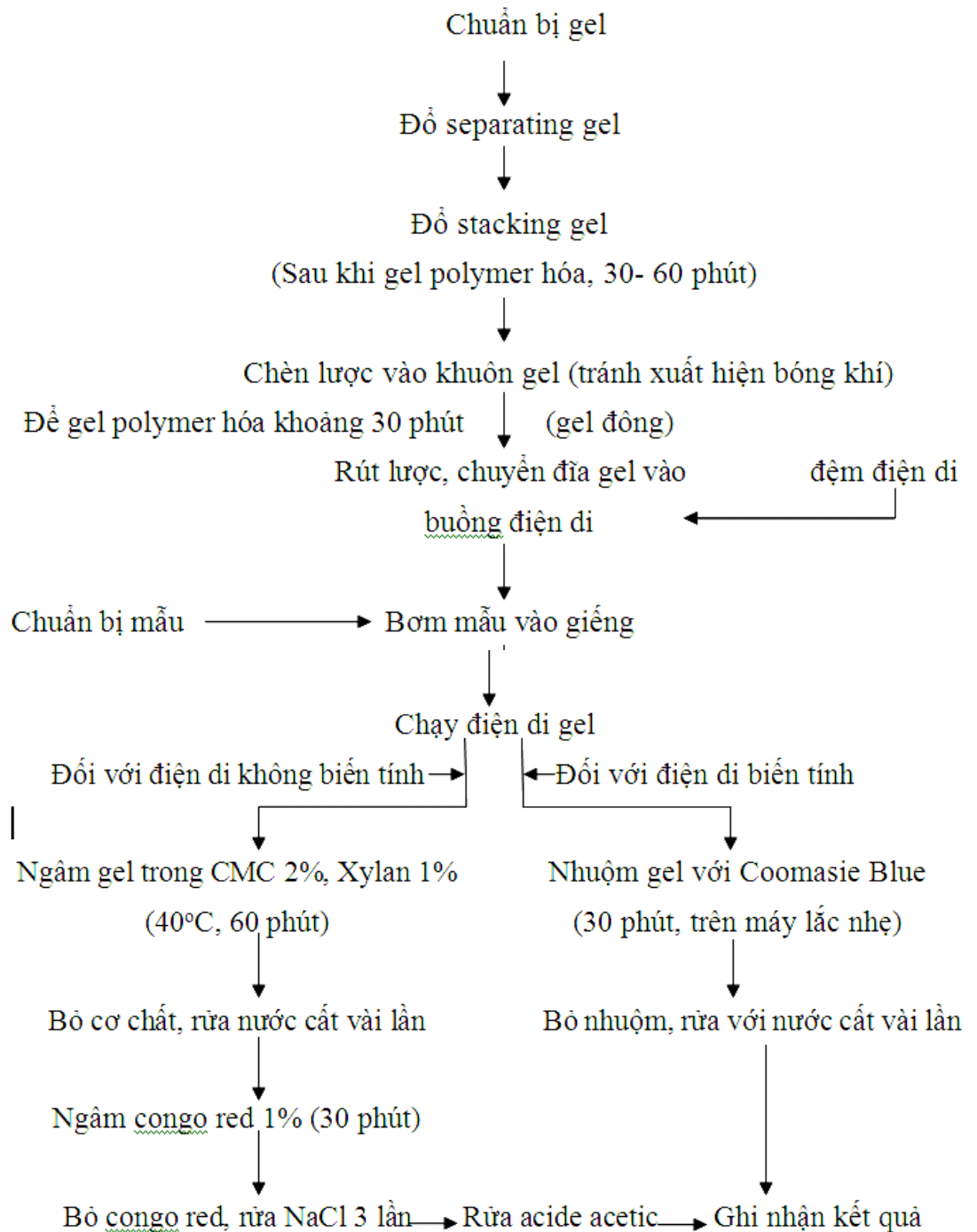
Để kiểm chứng cellulase và xylanase có trong dịch chiết của enzym thí nghiệm.

ĐIỆN DI PHÂN TÍCH PROTEIN

Nguyên tắc:

Phương pháp điện di biến tính, các protein được phản ứng với các chất hoạt động bề mặt mang điện tích âm (SDS) để tạo thành một phức hợp mang điện tích âm và sẽ di chuyển về cực dương của điện trường, SDS kết hợp với phần kỵ nước của protein, phá vỡ cấu trúc xoắn. Chất khử mercaptoethanol hoặc dithiothreitol (DTT) phá vỡ cầu nối –S-S- (disulfur) của protein. Sự di chuyển trong gel của các phân tử protein phụ thuộc vào kích thước, phân tử có kích thước lớn di chuyển chậm hơn phân tử có kích thước nhỏ khi qua lỗ gel có kích thước nhất định.

Sơ đồ thực hiện điện di protein trên gel



3.2. 3. PHƯƠNG PHÁP BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM

Tất cả thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, với ba lần lặp lại.

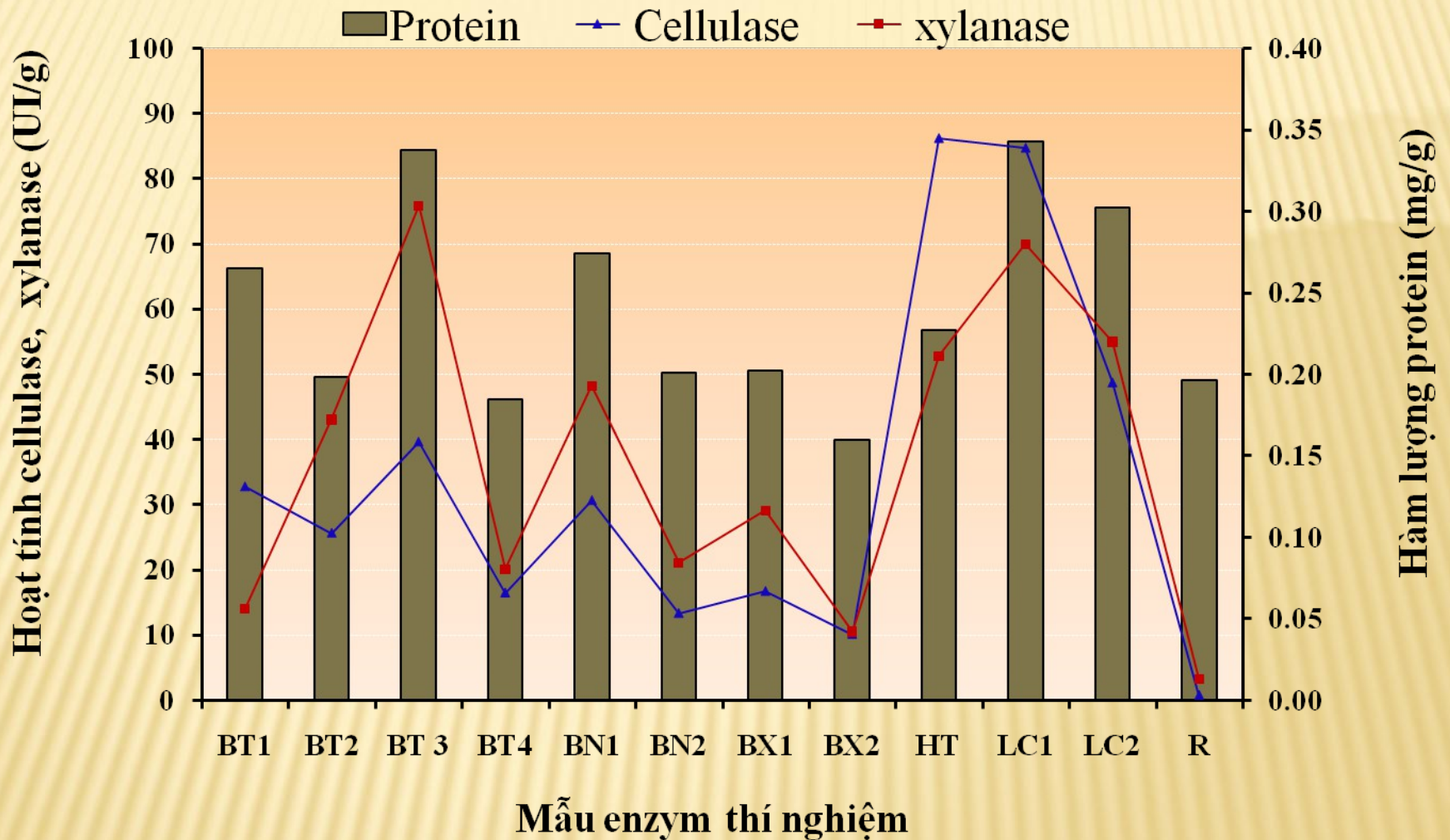
Số liệu thu được của các nghiệm thức được phân tích biến lượng đơn yếu tố (One-Way ANOVA) để đánh giá sự khác biệt giữa chúng, thao tác trên phần mềm Microsoft Excel 2007 và phần mềm Statgraphics Centurion XV.

4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Thí nghiệm 1: Hoạt tính enzym cellulase và xylanase thí nghiệm

Hoạt tính enzym cellulase và xylanase thí nghiệm

Mẫu	cellulase (UI/g)	xylanase (UI/g)	Protein (mg/g)
BT1	32,738	13,943	0,265
BT2	25,635	43,011	0,198
BT3	39,603	75,762	0,337
BT4	16,468	20,027	0,184
BN1	30,635	48,118	0,274
BN2	13,333	21,057	0,201
BX1	16,707	29,032	0,202
BX2	10,119	10,484	0,160
HT	86,151	52,778	0,227
LC1	84,682	69,893	0,343
LC2	48,690	54,928	0,302
R	0,754	3,226	0,196



Đồ thị biểu diễn hoạt lực cellulase, xylanase, protein của các mẫu thu từ các địa phương

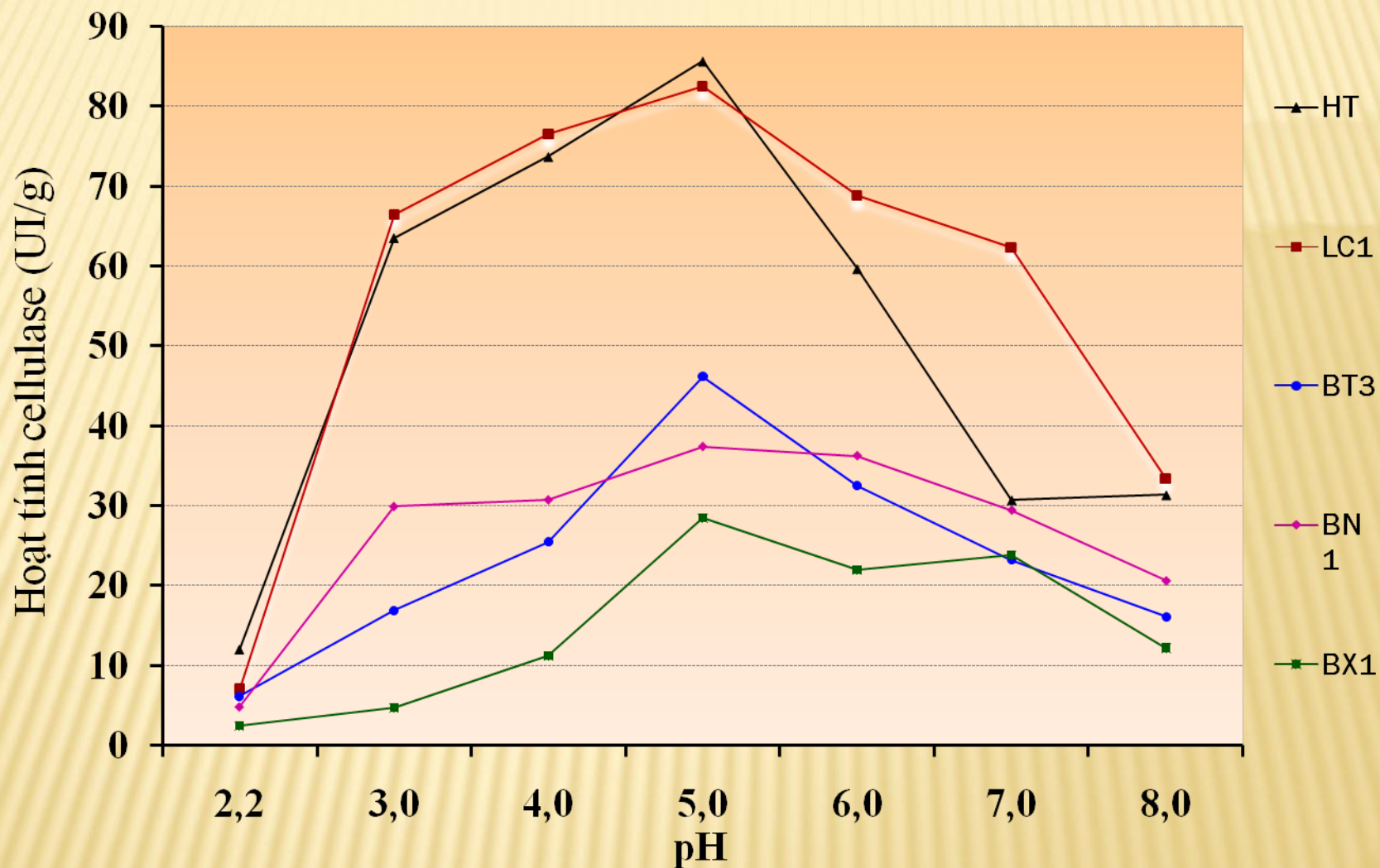
***4.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của pH
đến hoạt tính cellulase và xylanase thí
nghiệm***

4.2.1. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính cellulase thí nghiệm

pH	Hoạt tính cellulase ^a (UI/g)				
	HT	LC1	BT3	BN1	BX1
2,2	12,032 e	7,063 g	6,191 e	4,821 e	2,460 f
3,0	63,532 c	66,508 d	16,905 d	29,921 cd	4,683 e
4,0	73,690 b	76,508 b	25,476 c	30,754 c	11,230
5,0	85,635 a	82,500 a	46,131 a	37,441 a	28,452 a
6,0	59,643 c	68,849 c	32,480 b	36,290 b	21,984 c
7,0	30,714 d	62,381 e	23,234 c	29,464 d	23,849 b
8,0	31,349 d	33,452 f	16,111 d	20,615 d	12,183 d
Trung bình	50,942	56,752	23,790	27,044	14,977

^aTrung bình của ba lần lặp lại.

Các trung bình được theo sau bởi một chữ giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.



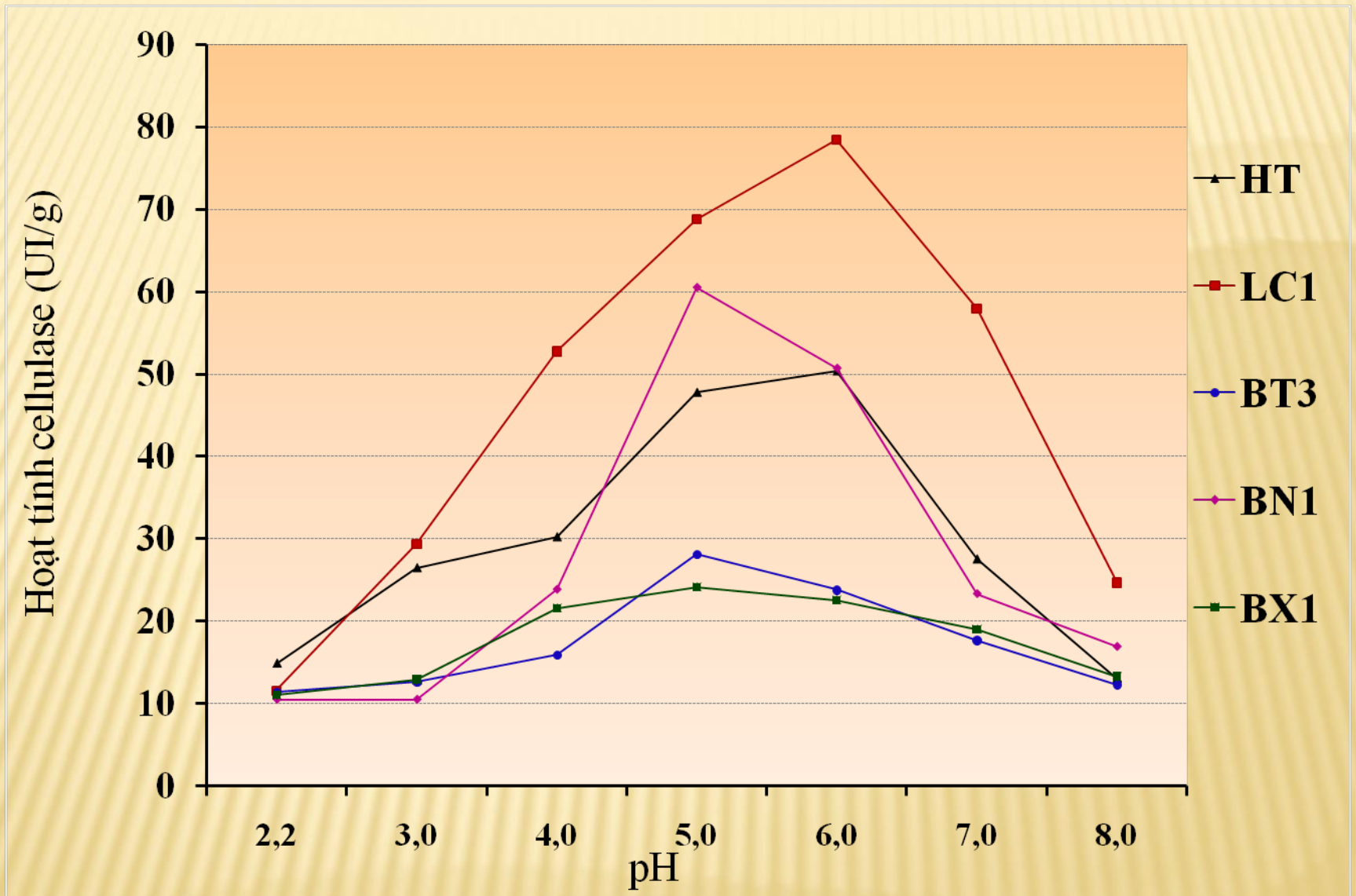
Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH đến hoạt tính cellulase thí nghiệm

4.2.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính xylanase thí nghiệm

pH	Hoạt tính xylanase ^a (UI/g)				
	HT	LC1	BT3	BN1	BX1
2,2	14,828 e	11,561 g	11,397 f	10,458 e	10,989 e
3,0	26,430 d	29,330 e	12,582 e	10,458 e	12,868 d
4,0	30,188 c	52,737 d	15,911 d	23,815 c	21,528 b
5,0	47,753 b	68,791 b	28,064 a	60,457 a	24,061 a
6,0	50,368 a	78,391 a	23,754 b	50,654 b	22,467 b
7,0	27,491 d	57,884 c	17,647 c	23,284 c	18,954 c
8,0	12,990 f	24,673 f	12,275 ef	16,871 d	13,235 d
Trung bình	30,007	46,195	17,376	28,000	17,729

^aTrung bình của ba lần lặp lại.

Các trung bình được theo sau bởi một chữ giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.



Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH đến hoạt tính xylanase thí nghiệm

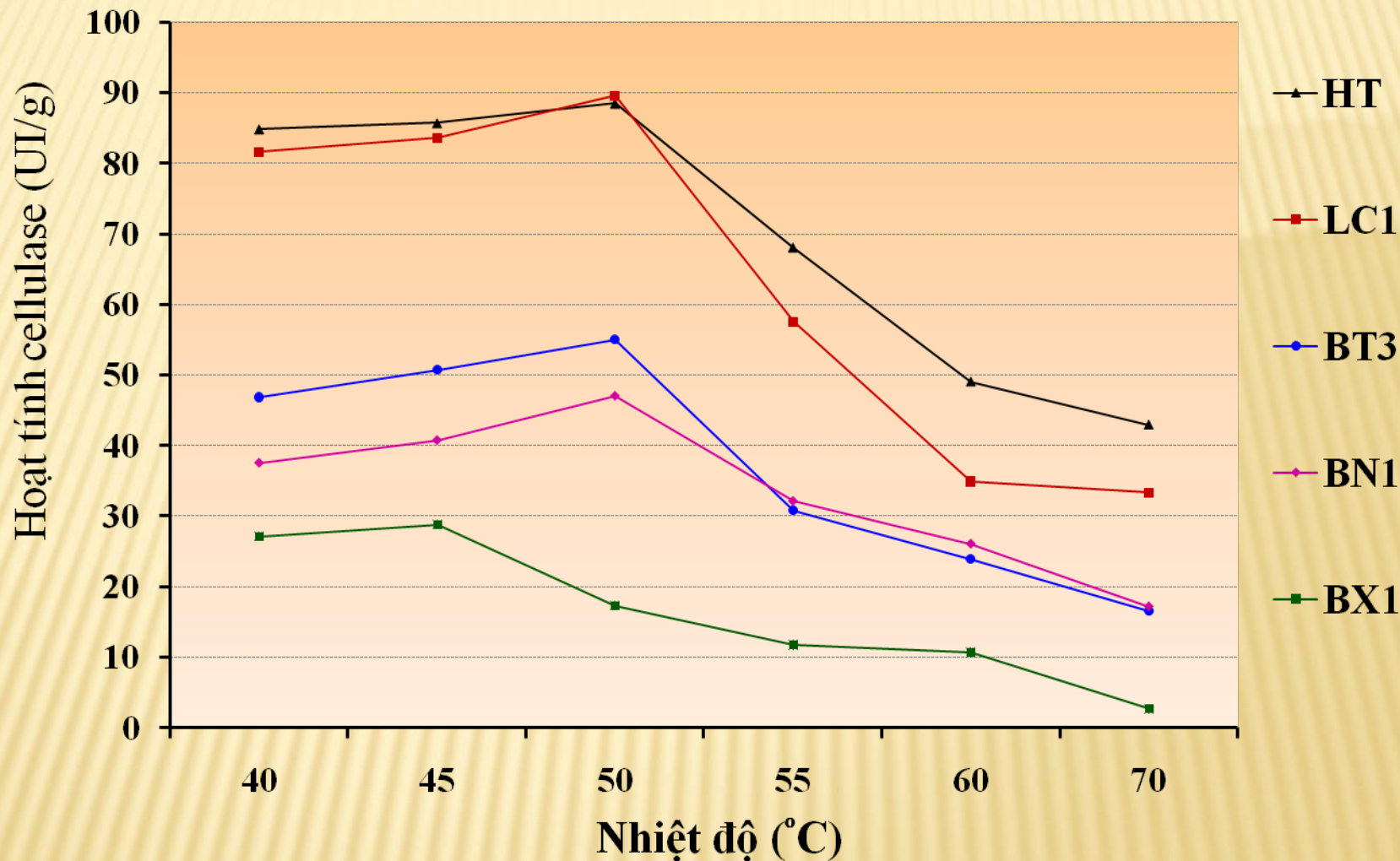
4.3. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của cellulase và xylanase thí nghiệm

4.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính cellulase thí nghiệm

Nhiệt độ (°C)	Hoạt tính đặc hiệu cellulase ^a (UI/g)				
	HT	LC1	BT3	BN1	BX1
40	84,841 a	81,627 b	46,786 c	37,560 c	27,103 b
45	85,714 a	83,532 b	50,714 b	40,774 b	28,770 a
50	88,492 a	89,524 a	54,960 a	47,064 a	17,302 c
55	68,056 b	57,540 c	30,794 d	32,143 d	11,746 d
60	49,008 c	34,921 d	23,889 e	26,071 e	10,675 e
70	42,897 d	33,333 d	16,587 f	17,183 f	2,698 f
Trung bình	69,835	63,413	37,288	33,466	16,382

^aTrung bình của ba lần lặp lại.

Các trung bình được theo sau bởi một chữ giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.



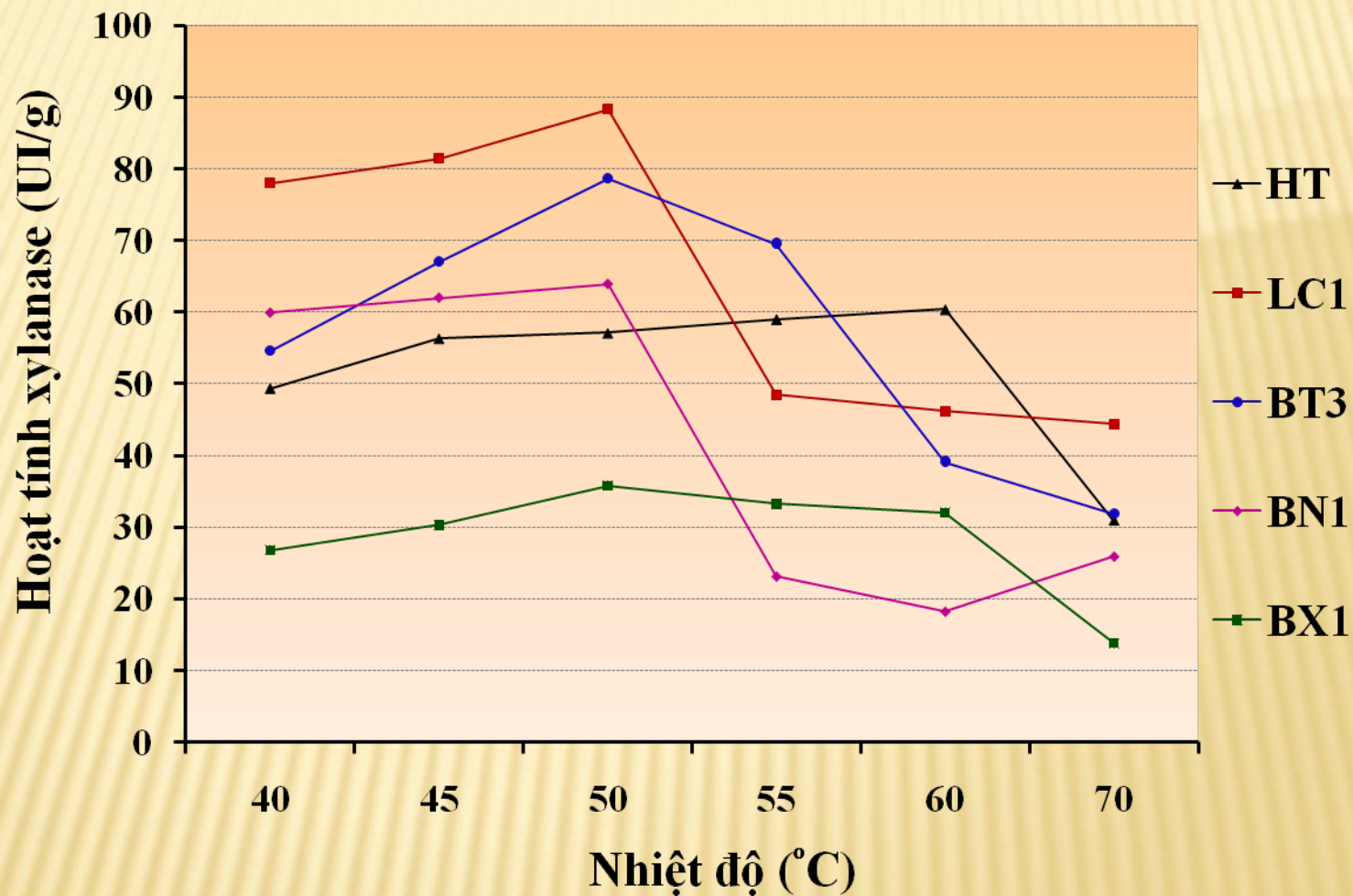
Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính cellulase thí nghiệm

4.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính xylanase thí nghiệm

Nhiệt độ (°C)	Hoạt tính đặc hiệu xylanase ^a (UI/g)				
	HT	LC1	BT3	BN1	BX1
40	49,387 d	78,106 a	54,698 c	59,927 c	26,838 e
45	56,332 c	81,536 a	67,116 b	62,010 b	30,310 d
50	57,108 c	88,358 a	78,677 a	63,930 a	35,784 a
55	59,028 b	48,529 b	69,608 b	23,121 e	33,252 b
60	60,417 a	46,242 b	39,216 d	18,219 f	32,067 c
70	30,923 e	44,444 b	31,944 e	25,899 d	13,848 f
Trung bình	52,199	64,536	56,876	42,184	28,683

^aTrung bình của ba lần lặp lại.

Các trung bình được theo sau bởi một chữ giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.



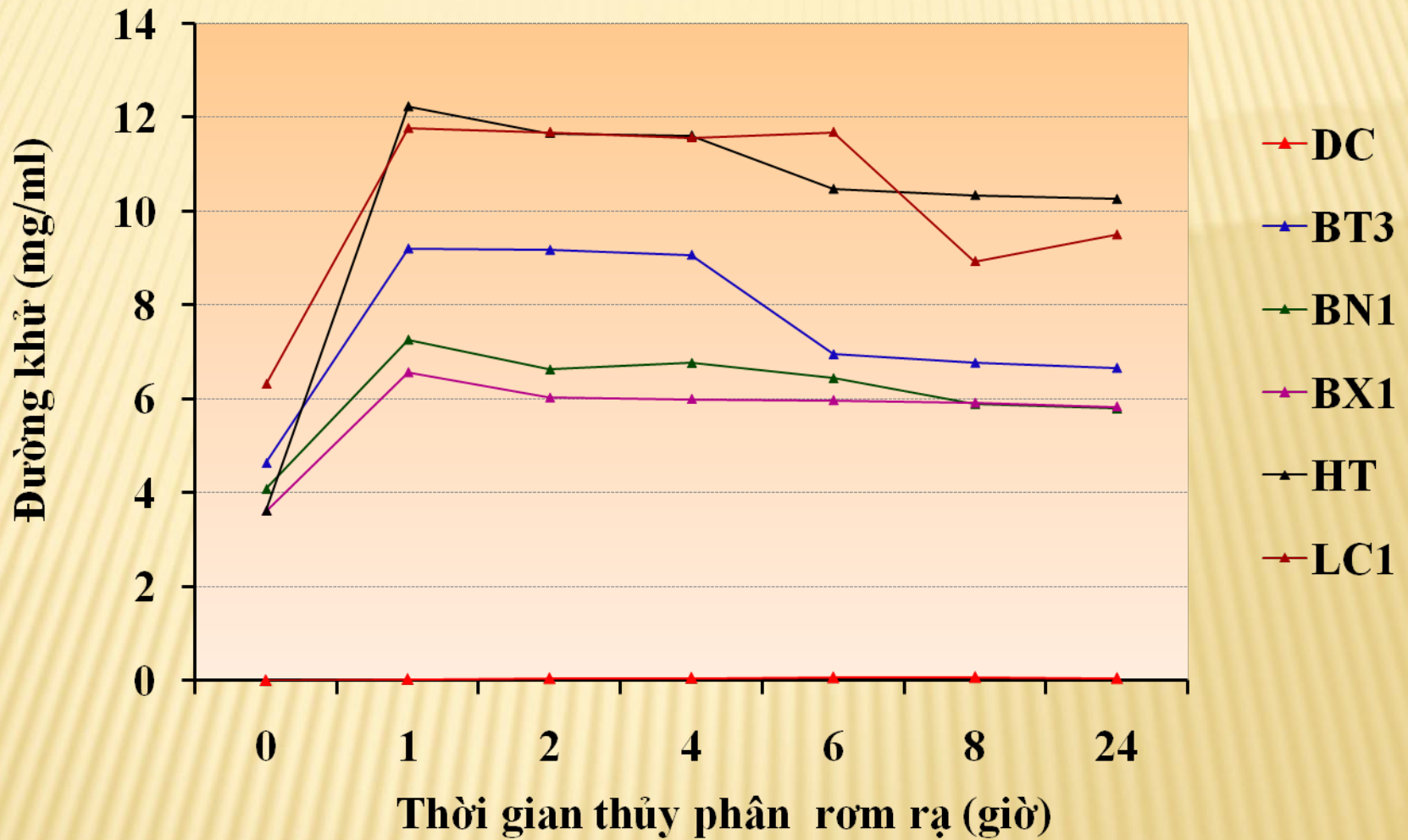
Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính xylanase thí nghiệm

4.4. Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng thủy phân rơm rạ đã qua xử lý của enzym thí nghiệm

Lượng đường khử trước và sau thủy phân của các mẫu thí nghiệm

Mẫu	Nồng độ đường trong dịch thủy phân rơm rạ (mg/ml)						
	0 giờ	1 giờ	2 giờ	4 giờ	6 giờ	8 giờ	24 giờ
DC	0,000	0,027	0,045	0,054	0,063	0,072	0,045
BT3	4,649	9,216	9,189	9,081	6,964	6,784	6,676
BN1	4,090	7,270	6,636	6,775	6,450	5,901	5,802
BX1	3,613	6,568	6,027	6,000	5,973	5,919	5,838
HT	3,631	12,243	11,676	11,622	10,486	10,351	10,270
LC1	6,324	11,784	11,703	11,586	11,703	8,946	9,514

(Chú thích DC: đối chứng)



Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng thời gian đến hàm lượng đường khử trong dịch thủy phân rơm rạ

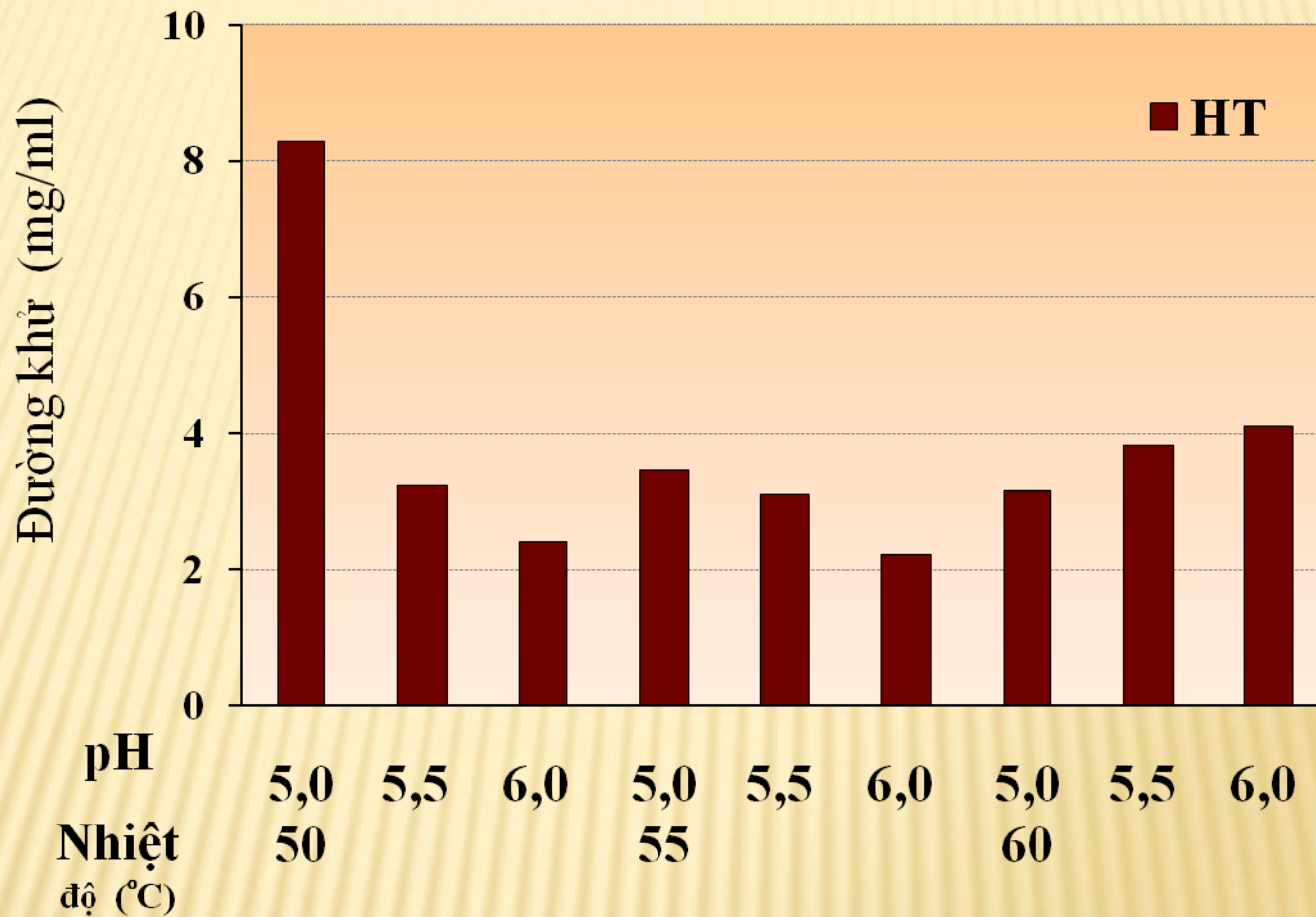
*4.5. Thí nghiệm 5: Khả năng thủy phân
rơm rạ đã qua xử lý của emzym thí
nghiệm dưới các điều kiện pH và nhiệt
độ*

Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến lượng đường khử giải phóng trong quá trình thủy phân

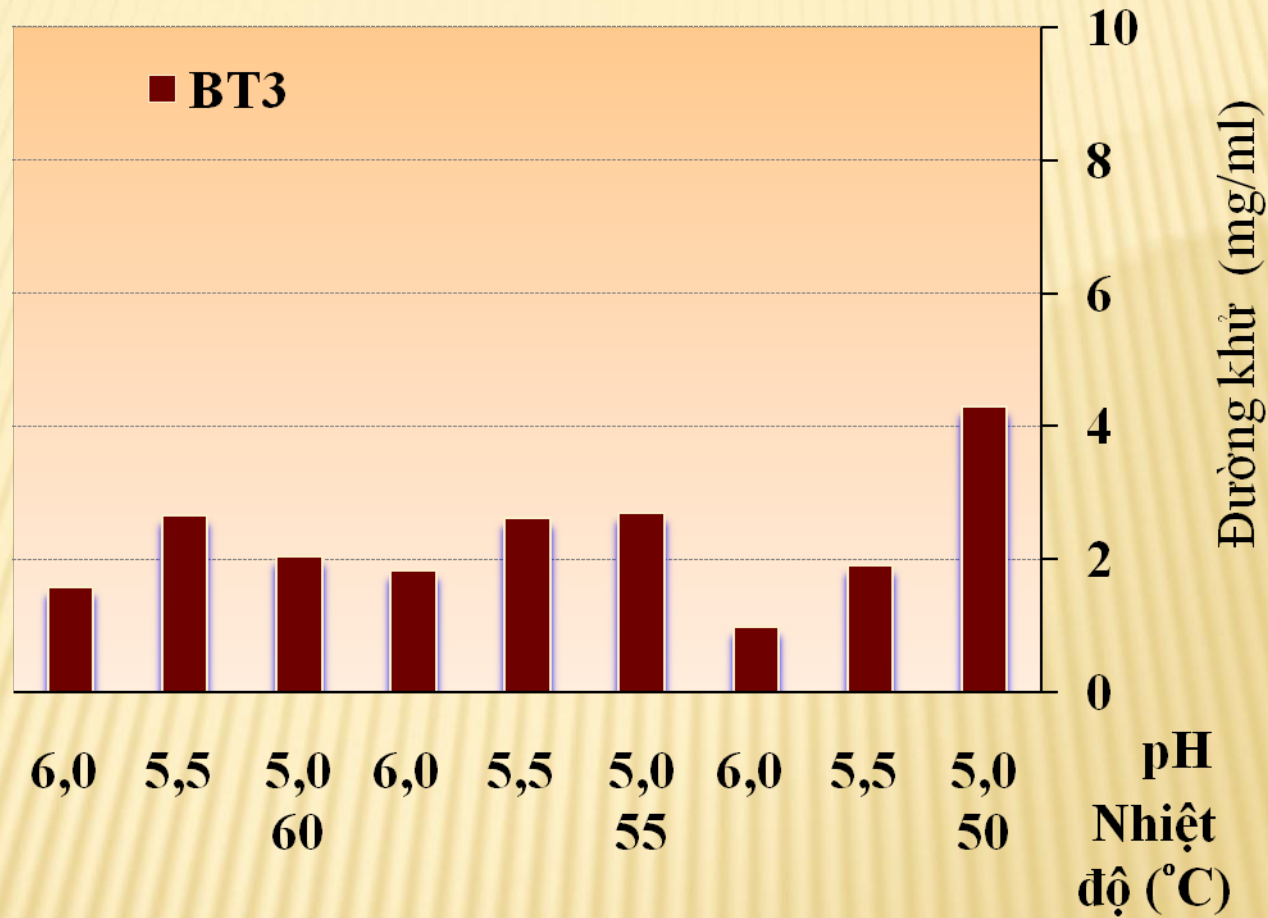
Nhiệt độ (°C)	pH	Lượng đường khử giải phóng khi thủy phân ^a (mg/ml)				
		HT	LC3	BT4	BN1	BX1
50	5,0	8,288 a	1,667 e	4,306 a	3,748 a	2,973 a
	5,5	3,225 e	2,234 d	1,910 cd	3,000 c	2,333 b
	6,0	2,414 f	2,270 d	0,982 e	2,099 e	1,252 d
55	5,0	3,459 d	3,279 c	2, 694 b	3,505 b	1,685 c
	5,5	3,108 e	3,036 c	2,631 b	2,739 d	1,225 d
	6,0	2,216 g	3,829 b	1,838 d	0,586 g	1,135 d
60	5,0	3,162 e	8,171 a	2,045 c	2,848 cd	1,486 c
	5,5	3,838 c	3,298 c	2,658 d	1,838 f	1,045 de
	6,0	4,117 b	2,486 d	1,577 e	0,135 h	0,837 e

^aTrung bình của ba lần lặp lại.

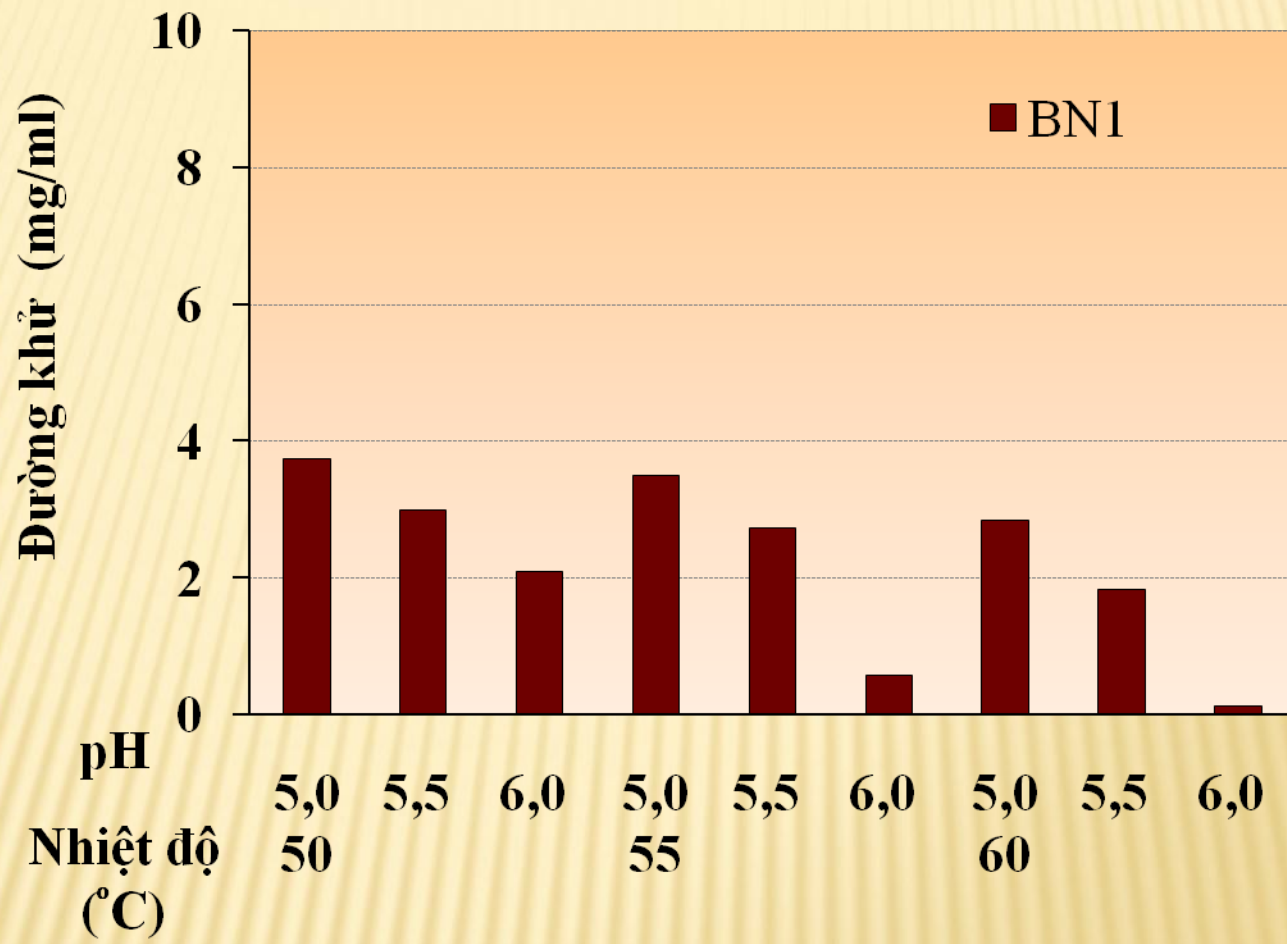
Các trung bình được theo sau bởi một chữ giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.



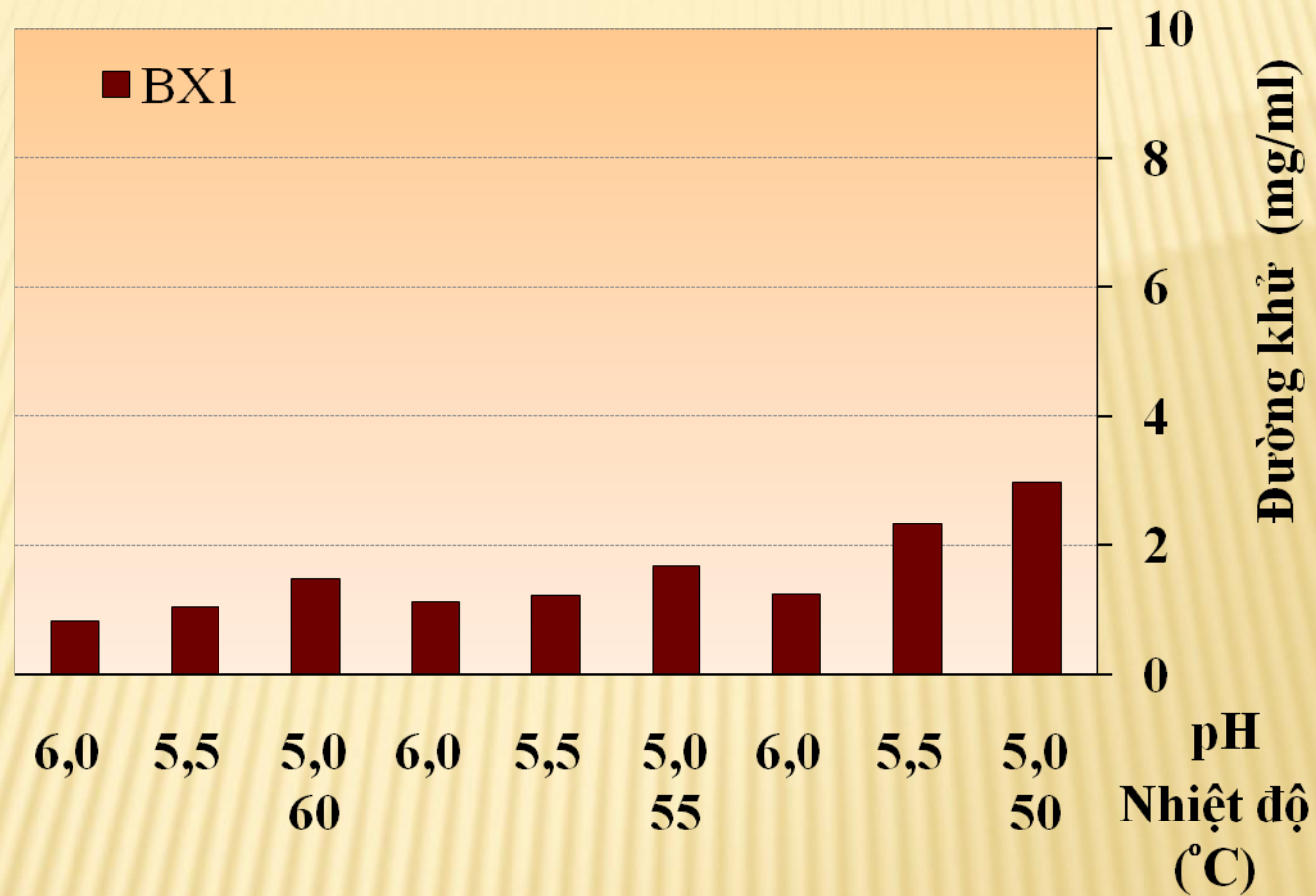
Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng thủy phân rơm rạ của HT



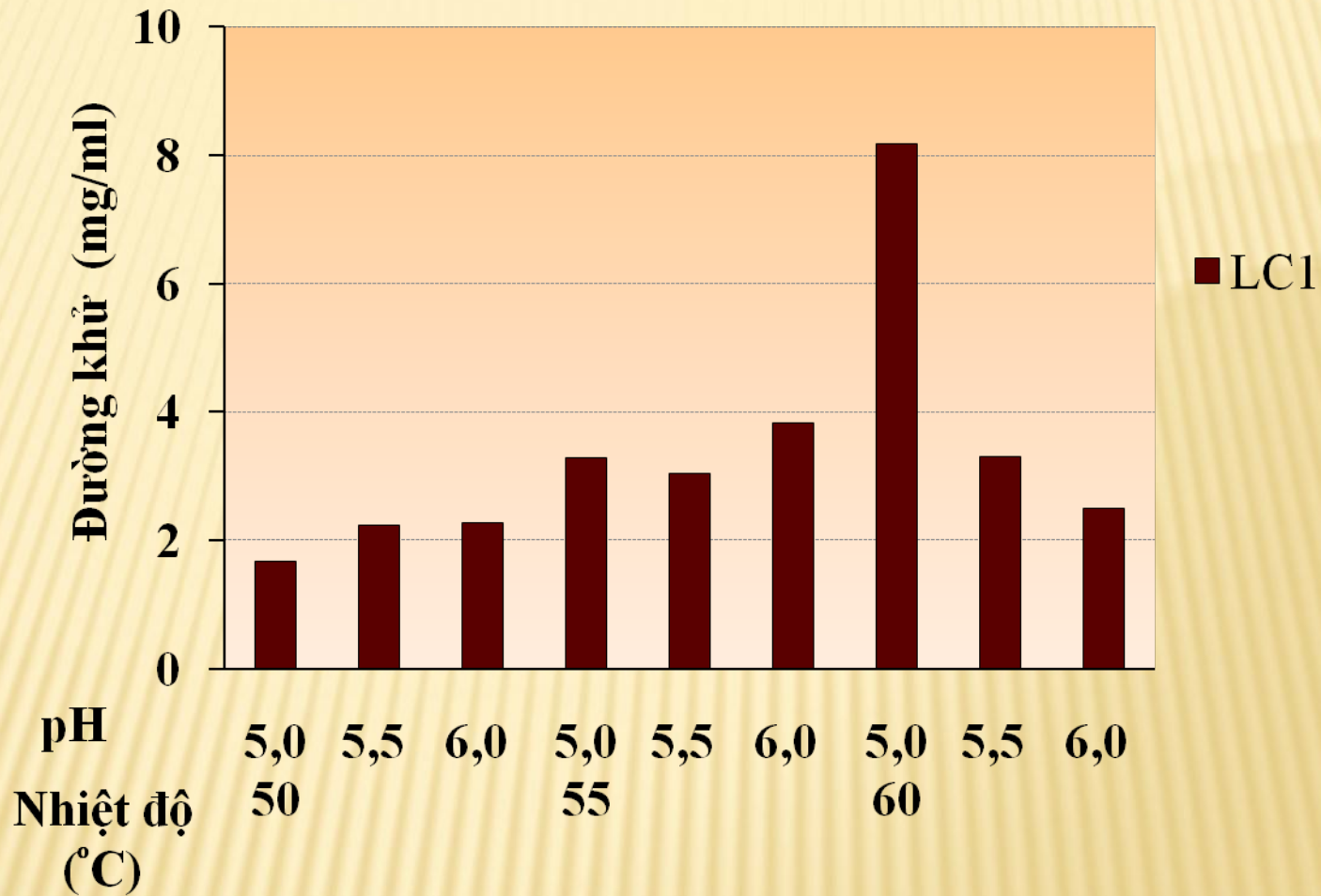
Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng thủy phân rơm rạ của BT3



Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng thủy phân rơm rạ của BN1



Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng thủy phân rơm rạ của BX1



Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng thủy phân rơm rạ của LC1

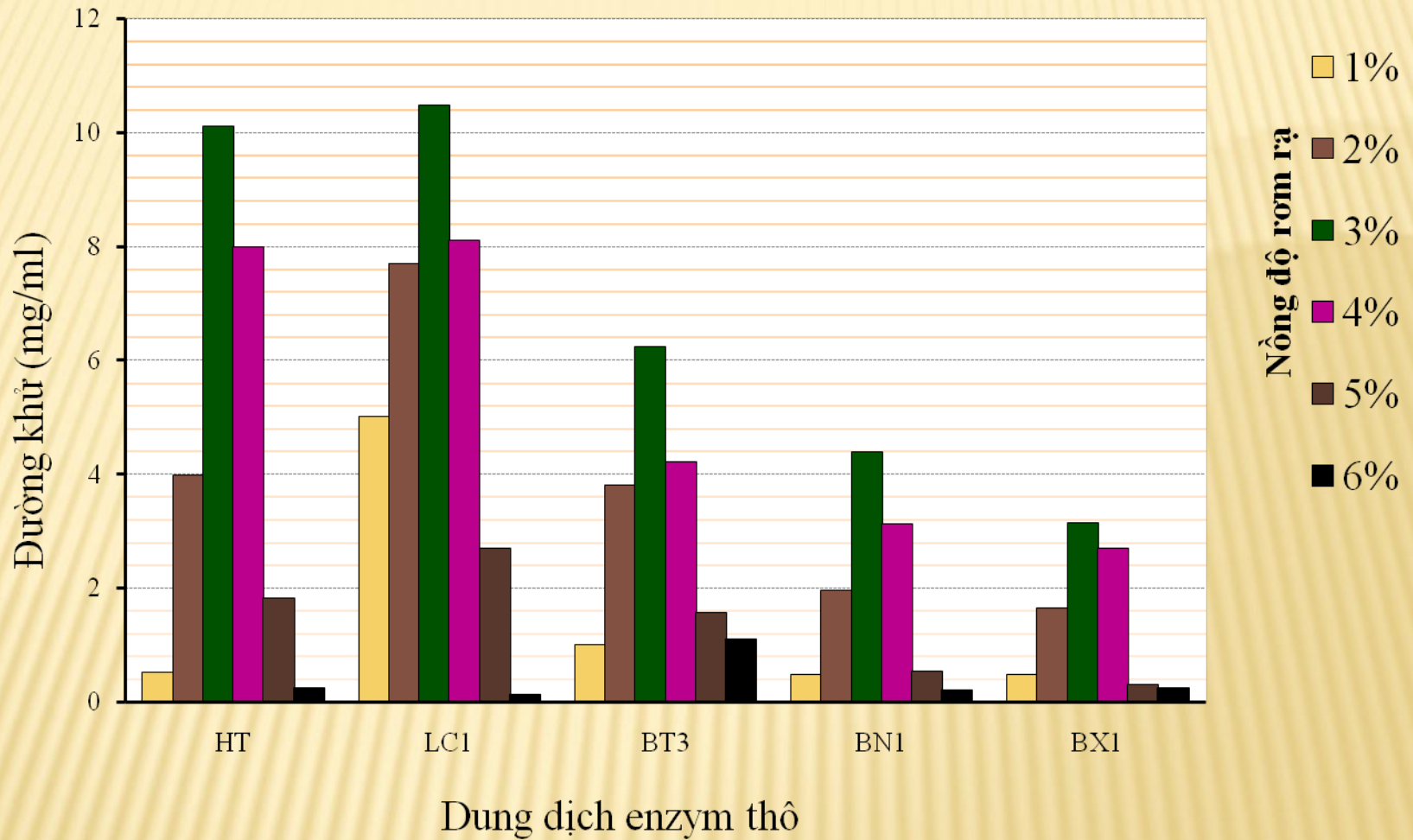
4.6. Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của nồng độ rơm rạ đến hàm lượng đường khử giải phóng trong quá trình thủy phân

Ảnh hưởng của nồng độ rơm rạ trong quá trình thủy phân đến lượng đường khử giải phóng trong dịch thủy phân của các mẫu thí nghiệm

Mẫu	Đường khử sinh ra trong quá trình thủy phân ^a (mg/ml)					
	Nồng độ rơm rạ (%)					
	1	2	3	4	5	6
HT	0,523 e	3,982 c	10,117 a	7,990 b	1,820 d	0,252 f
LC1	5,018 d	7,703 c	10,486 a	8,117 b	2,703 e	0,135 f
BT3	1,009 e	2,378 c	4,649 a	3,595 b	1,577 d	1,108 e
BN1	0,486 d	0,883 c	2,775 a	1,279 b	0,541 d	0,216 e
BX1	0,495 d	1,658 a	1,261 b	0,937 c	0,315 e	0,243 e

^aTrung bình của ba lần lặp lại.

Các trung bình được theo sau bởi một chữ giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

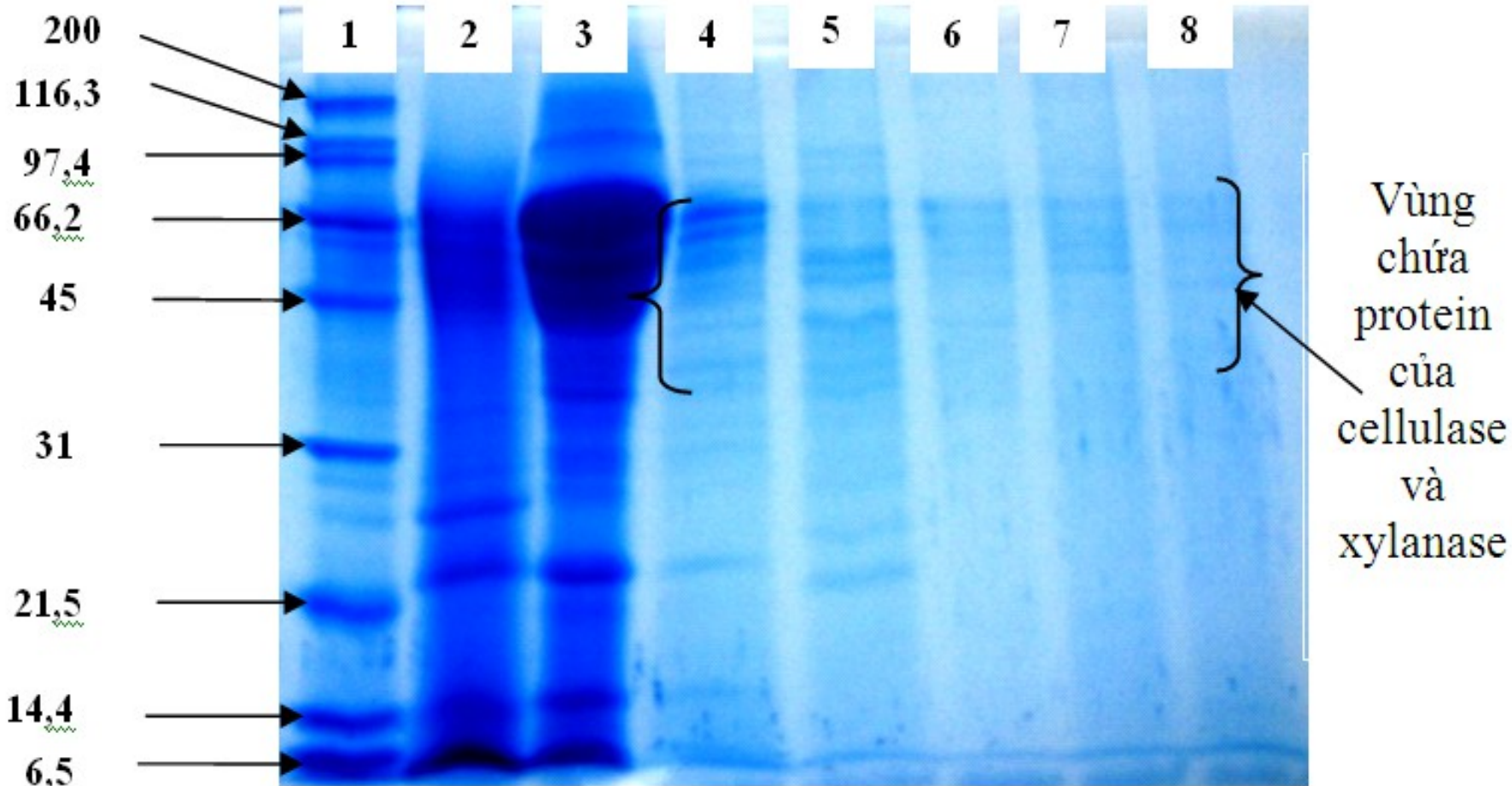


Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ rơm rạ đến khả năng thủy phân của enzym thí nghiệm

4.7. Kết quả phân tách protein trên Gel

Kết quả điện di biến tính các mẫu enzyme thí nghiệm

kDa



1: Thang chuẩn

2: Dịch cellulase thương mại

3: Dịch xylanase thương mại

4: Dịch enzym BT3

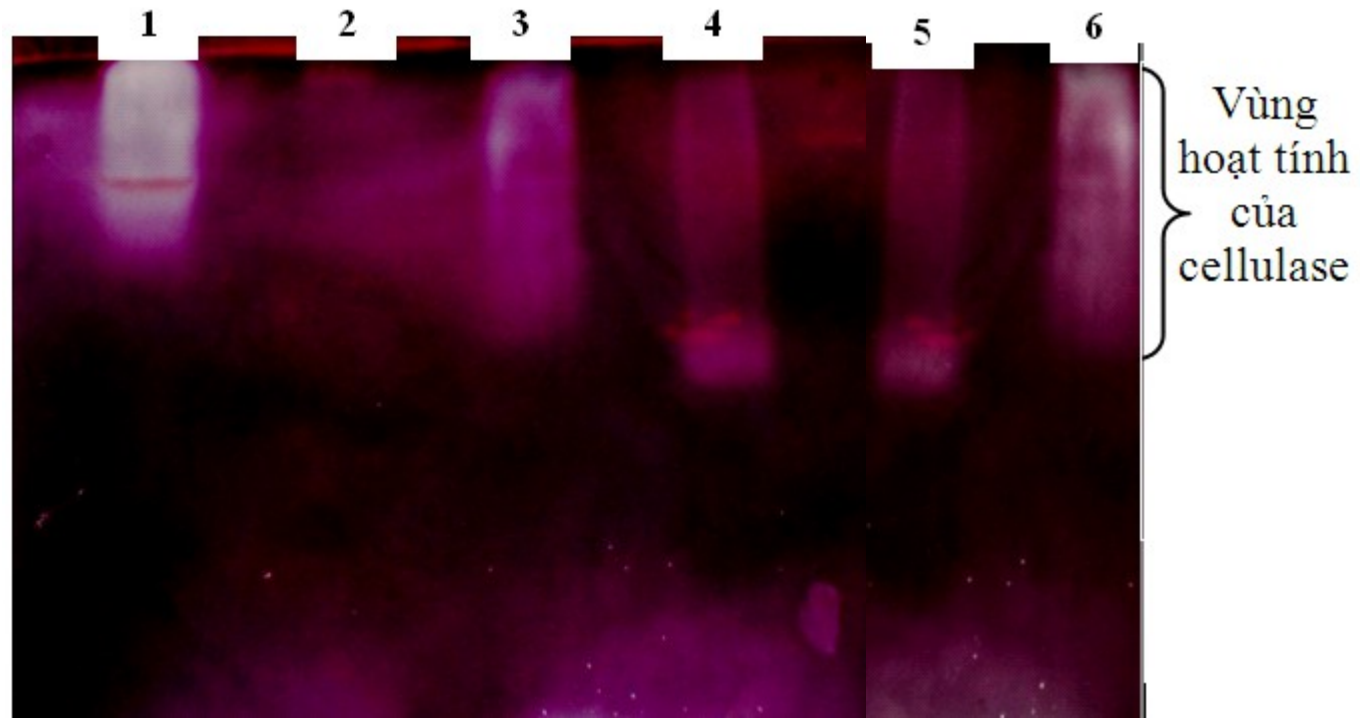
5: Dịch enzyme LC1

6: Dịch enzym HT

7: Dịch enzym BN1

8: Dịch enzym BX1

Kết quả điện di không biến tính mẫu enzym cellulase



1: Dịch cellulase thương mại

2: Dịch enzym BT3

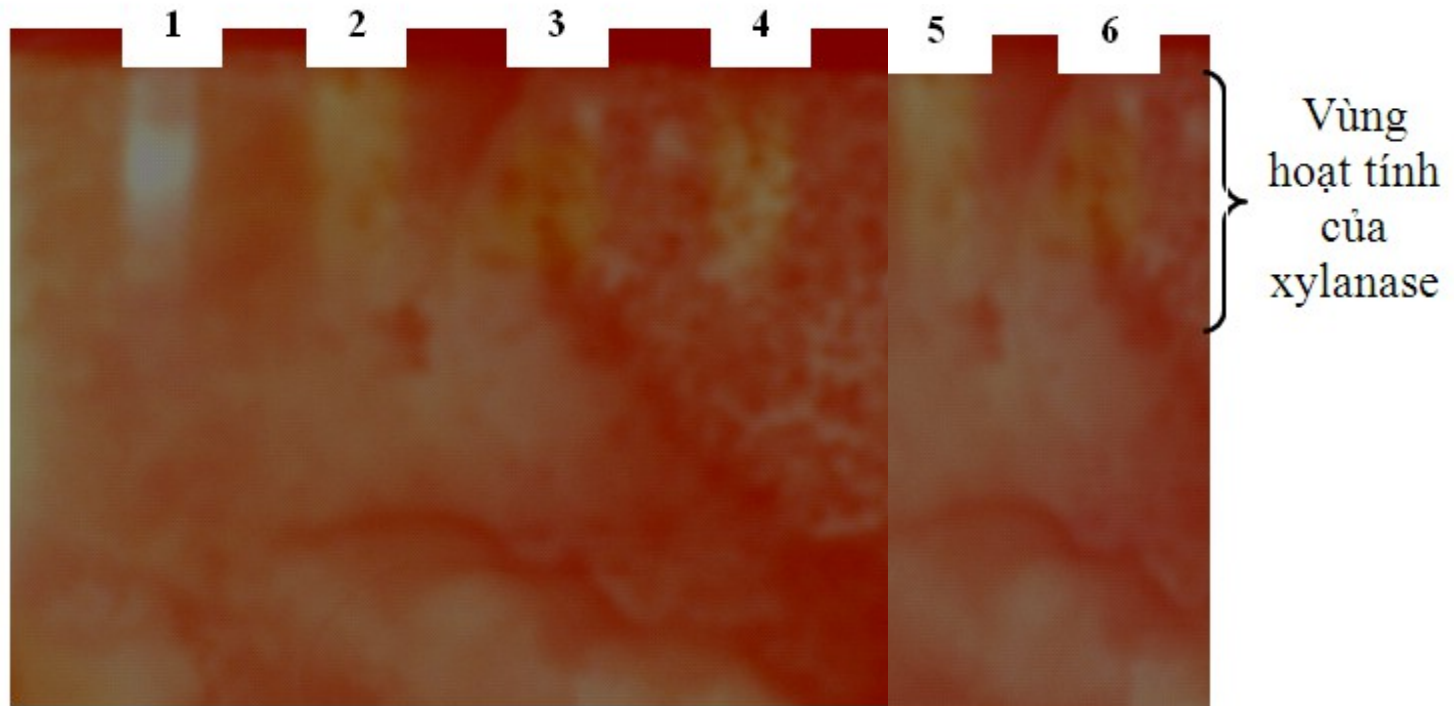
3: Dịch enzyme LC1

4: Dịch enzym HT

5: Dịch enzym BN1

6: Dịch enzym BX1

Kết quả điện di không biến tính các mẫu enzym xylanase



1: Dịch xylanase thương mại

2: Dịch enzym BT3

3: Dịch enzyme LC1

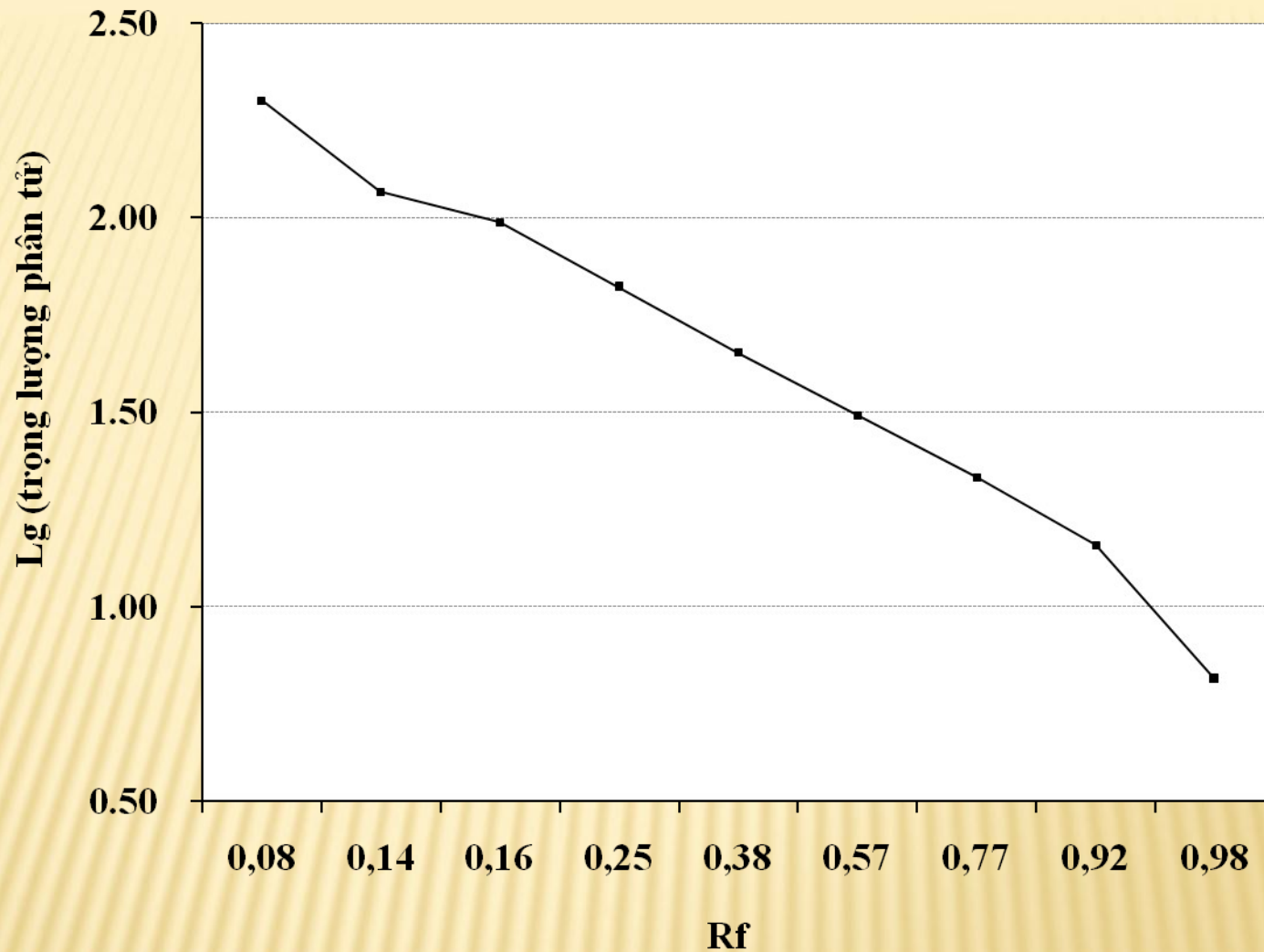
4: Dịch enzym HT

5: Dịch enzym BN1

6: Dịch enzym BX1

Giá trị Rf và lg(trọng lượng phân tử) những protein trong thang chuẩn

Rf	lg (trọng lượng phân tử)	kDa
0,08	2,30	200,0
0,14	2,07	116,3
0,16	1,99	97,4
0,25	1,82	66,2
0,38	1,65	45,0
0,57	1,49	31,0
0,77	1,33	21,5
0,92	1,16	14,4
0,98	0,81	6,5



**Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa lg (trọng lượng phân tử)
của những protein trong thang chuẩn với Rf**

Trọng lượng phân tử của các protein trong chế phẩm cellulase, xylanase thương mại và dịch enzym BT3, CL1.

CTM		XTM		BT3		LC1	
Rf	kDa	Rf	kDa	Rf	kDa	Rf	kDa
0,25	66,20	0,19	87,00	0,18	90,47	0,15	106,85
0,28	60,14	0,28	60,14	0,25	66,20	0,19	87,00
0,33	52,57	0,33	52,57	0,28	60,14	0,25	66,20
0,60	29,27	0,38	45,00	0,32	54,09	0,32	54,09
0,66	26,68	0,40	43,60	0,38	45,00	0,34	51,06
0,75	22,36	0,43	40,80	0,42	42,20	0,45	39,40
0,92	14,40	0,45	39,40	0,46	38,70	0,49	36,60
0,98	6,50	0,47	38,00	0,57	31,00	0,70	24,95
		0,51	35,20	0,74	23,23	0,75	22,36
		0,53	33,80	0,92	14,40		
		0,58	30,14				
		0,60	29,27				
		0,63	27,98				
		0,74	23,23				
		0,79	20,61				
		0,89	16,18				
		0,98	6,50				

Trọng lượng phân tử của các protein trong dịch enzym HT, BN1, BX1

HT		BN1		BX1	
Rf	kDa	Rf	kDa	Rf	kDa
0,25	66,20	0,25	66,20	0,23	73,13
0,28	60,14	0,34	51,06	0,26	63,17
0,32	54,09			0,36	48,03
				0,92	14,40

5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. KẾT LUẬN

➤ Dịch ly trích được từ môi trường trồng nấm Bào Ngư (*Pleurotus sp*), Linh Chi (*Ganoderma lucidum*), Hàu Thủ (*Hericium erinaceus*) đều có enzym cellulase và xylanase.

➤ Điều kiện tối ưu để các enzym thí nghiệm thủy phân rom rạ

+ Thời gian thủy phân trong 1 giờ.

+ pH 5,0 đối với mẫu HT, BT3, BN1, BX1 và pH 6,0 đối với mẫu LC1.

+ Nhiệt độ 50°C đối với mẫu HT, BT3, BN1, BX1 và 60°C đối với mẫu LC1.

+ Nồng độ rom rạ để thủy phân là 3%

5.2. KIẾN NGHỊ

- Khảo sát khả năng ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt tính cellulase và xylanase thí nghiệm là cần thiết.
- Nên nghiên cứu các loài nấm đa dạng dạng hơn.
- Các bịch meo nấm thu làm thí nghiệm có sự đồng nhất về thời gian trồng và kết thúc quá trình thu hoạch nấm.
- Nghiên cứu về thành phần cơ chất nuôi trồng nấm để tìm ra sự ảnh hưởng đối với hoạt tính enzym mà chúng sinh ra.

CHÂN THÀNH
CẢM ƠN!
