

# NGHIÊN CỨU CHUYỂN HÓA SINH KHỐI LIGNOCELLULOSE TỪ MÙN GỖ SỬ DỤNG HỖN HỢP ENZYME THỦY PHÂN TỪ NẤM THU NHẬN CÁC HỢP CHẤT CARBOHYDRATE VÀ AXÍT HYDROXYCINNAMIC

STUDY ON THE CONVERSION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS FROM SAWDUST USING A MIXTURE OF HYDROLYTIC ENZYMES FROM FUNGI TO PRODUCE CARBOHYDRATE AND HYDROXYCINNAMIC ACID

Vũ Đình Giáp<sup>1,\*</sup>

DOI: <http://doi.org/10.57001/huih5804.2024.105>

## TÓM TẮT

Lignocellulose có vai trò quan trọng về mặt kinh tế khi được sử dụng như vật liệu thô cho các ứng dụng trong công nghệ sinh học và công nghiệp. Các loài nấm sợi được biết là có hệ enzyme thủy phân xúc tác hiệu quả giúp chúng phân hủy tốt lignocellulose. Trong nghiên cứu này, sử dụng hỗn hợp enzyme thủy phân tác dụng hiệp đồng để chuyển hóa mùn gỗ thành các sản phẩm có phân tử lượng nhỏ như axit hydroxycinnamic hay các hợp chất carbohydrate là những sản phẩm có giá trị được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực. Các enzyme sử dụng gồm, Celluclast<sup>®</sup> 1.5L (hoạt tính riêng 700U/g), feruloyl esterase (AltFAE, 11,2U/mg) và acetyl esterase (XpoAE, 13,1U/mg). Quá trình chuyển hóa mùn gỗ giải phóng 0,55mg/g axit ferulic và 0,49mg/g p-coumaric (axit hydroxycinnamic) và 14,97mg/g carbohydrate (galactose, glucose và xylose) sử dụng hỗn hợp enzyme (Celluclast<sup>®</sup> 1.5L; 5U/gds, AltFAE; 10 U/gds và XpoAE; 10U/gds) sau khi ủ 8 giờ ở 40°C. Đồng thời, chúng minh được hoạt tính chống oxi hóa của axit hydroxycinnamic trên bản mỏng khi thử trên hệ thạch rắn-DPPH.

**Từ khóa:** Feruloyl esterase, acetyl esterase, carbohydrate, lignocellulose, hydrolytic enzymes, hydroxycinnamic acid.

## ABSTRACT

Lignocellulose is economically important when used as a raw material for applications in biotechnology and industry. Fungi are known to possess an efficient catalytic hydrolytic enzyme system that helps them to effectively decompose lignocellulose. In this study, a hydrolytic enzyme mixture was used to convert sawdust into products that included low molecular weight compounds such as hydroxycinnamic acids and carbohydrate compounds, which are valuable and applicable in various fields such as pharmaceuticals and the food industry. The enzymes used included Celluclast<sup>®</sup> 1.5L (specific activity of 700U/g) purified from *Trichoderma reesei*, feruloyl esterase from *Alternaria tenuissima* (AltFAE, 11.2U/mg), and acetyl esterase from *Xylaria polymorpha* (XpoAE, 13.1U/mg). The process of converting sawdust released 0.55mg/g ferulic acid and 0.49mg/g p-coumaric acid, as well as 14.97mg/g total carbohydrates (galactose, glucose, and xylose) using the enzymes (Celluclast<sup>®</sup> 1.5L; 5U/gds, AltFAE; 10U/gds, and XpoAE; 10U/gds) after 8 hours of incubation at 40°C. The study also demonstrated the antioxidant activity of the hydroxycinnamic acid compounds on thin-layer chromatography when tested in a solid-phase DPPH assay.

**Keywords:** Cellulase/xylanase, feruloyl esterase, acetyl esterase, carbohydrate, lignocellulose, hydrolytic enzymes, hydroxycinnamic acid.

<sup>1</sup>Viện Công nghệ HaUI, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

\*Email: [giapvd@hau1.edu.vn](mailto:giapvd@hau1.edu.vn)

Ngày nhận bài: 10/10/2023

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 15/12/2023

Ngày chấp nhận đăng: 25/3/2024

## 1. GIỚI THIỆU

Lignocellulose là thành phần phổ biến nhất trong số các phụ phẩm công - nông nghiệp của Việt Nam. Chúng ngày càng có vai trò quan trọng về mặt kinh tế khi được sử dụng như vật liệu thô cho các ứng dụng trong công nghệ sinh học và công nghiệp. Hơn nữa việc tận dụng vật liệu này là cơ sở để thúc đẩy các mô hình sản xuất tinh chế và chiến lược cho sự phát triển bền vững [1]. Lignocellulose có nguồn gốc từ cây gỗ cứng và gỗ mềm cũng như các vật liệu từ cây trồng nông-lâm nghiệp. Đây là thành phần chính cấu tạo nên thành tế bào ở thực vật, bao gồm các polymer carbohydrate (cellulose, hemicellulose) và một polymer thơm (lignin) [2]. Các loài nấm sợi được biết là có hệ enzyme xúc tác hiệu quả giúp chúng phân hủy tốt lignocellulose. Nấm bao gồm nhiều hệ enzyme trong đó có hệ enzyme thủy phân với vai trò thủy phân polysaccharide và hệ enzyme oxi hóa để phân hủy lignin và xúc tác phản ứng mở vòng phenyl [3]. Một số enzyme từ

nấm tham gia chuyển hóa lignocellulose như: acetyl esterase (AE), feruloyl esterase (FAE), cellulase, xylanase, laccase,... Chúng hoạt động phối hợp với các enzyme tấn công mạch chính (cellulase/xylanase) và mạch nhánh [feruloyl esterase (FAE), acetyl esterase (AE)] của cấu trúc polymer này. Trong đó, hai enzyme AE và FAE hoạt động trên các chuỗi nhánh của cấu trúc polysaccharide thành tế bào để phân cắt liên kết cầu nối giữa các chuỗi xylan và giữa xylan với lignin để tách riêng phần lignin ra khỏi cấu trúc lignocelluloses [4]. Chúng kết hợp tương tác với cellulase/xylanase trong việc phá vỡ cấu trúc lignocellulose tạo thành các sản phẩm có phân tử lượng nhỏ như các hợp chất carbohydrate (glucose, galactose, xylose, mannose,...) và axit hydroxycinnamic, là những sản phẩm có giá trị được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực Y - Dược và công nghiệp thực phẩm. Hợp chất phenolic được chia thành hai nhóm: dẫn xuất của axit benzoic như axit galic và các dẫn xuất của axit hydroxycinnamic như p-coumaric, caffeic và axit ferulic [5]. Các axit hydroxycinnamic có một hay nhiều vòng thơm với một hoặc nhiều nhóm hydroxyl, được phân bố rộng rãi trong giới thực vật và là các sản phẩm trao đổi chất của chúng. Các sản phẩm này đóng một vai trò quan trọng trong việc chống viêm, có khả năng gây độc tế bào ung thư bằng cách điều tiết sự trao đổi chất của tế bào ung thư, ức chế DNA ngăn chặn việc nhân lên của chúng và giảm khả năng di căn [6]. Ngoài ra, chúng có hoạt tính chống oxi hóa mạnh do trong cấu trúc chứa các nhóm hydroxyl và vòng thơm [7].

Trong nghiên cứu này, tác giả trình bày một số kết quả nhằm đánh giá khả năng chuyển hóa các vật liệu giàu lignocellulose (mùn gỗ) bằng hỗn hợp enzyme thủy phân (feruloyl esterase, acetyl esterase và Celluclast® 1.5L) thành axit hydroxycinnamic và các hợp chất carbohydrate phân tử nhỏ mà không cần tiền xử lý hóa học và đánh giá hoạt tính sinh học của chúng.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

#### Sinh khối giàu lignocellulose

Vật liệu giàu lignocellulose như mùn gỗ (MG) được thu gom tại xưởng sản xuất gỗ huyện Hoài Đức, Hà Nội. Tất cả các nguyên liệu trên để chuyển hóa được sấy khô và xử lý bằng cách nghiền đồng thể đến kích thước hạt khoảng 40x40µm bằng hệ thống nghiền bi (thiết bị Fritsch, Oberstein, CHLB Đức).



Hình 1. Mùn gỗ trước khi nghiền đồng thể

### Enzyme thủy phân

Các enzyme thủy phân đã được tinh sạch từ các loại nấm khác nhau trong các nghiên cứu trước đây:

- Enzyme Celluclast® 1.5L thương mại từ *Trichoderma reesei* (Celluclast® 1.5L, hoạt độ riêng 700U/g, Novozymes, Đan Mạch), nhiệt độ và pH tối ưu ở 40 - 45°C và pH 5,5.

- Feruloyl esterase tinh sạch từ nấm *Alternaria tenuissima* (AltFAE, hoạt độ riêng 11,2U/mg), nhiệt độ và pH tối ưu ở 42°C và pH 7.0.

- Acetyl esterase tinh sạch từ nấm *Xylaria polymorpha* (XpoAE, hoạt độ riêng 13,1U/mg), nhiệt độ và pH tối ưu ở 42°C và pH 5.0.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### Xác định hoạt độ acetyl esterase (EC 3.1.1.6)

Hoạt độ acetyl esterase được xác định bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 405nm dựa trên sự tạo thành p-nitrophenol từ p-nitrophenyl acetate. Nồng độ cuối của cơ chất là 1mM trong đệm phosphate (100mM). Phản ứng diễn ra ở 42°C trên diện vi lượng 96 giếng trong 10 phút [8].

#### Xác định hoạt độ feruloyl esterase (EC 3.1.1.73)

Dưới các điều kiện vô trùng, khoanh thạch (Ø 1cm) được cắt từ môi trường nuôi cấy đã có sự phát triển của các sợi nấm và cấy chuyển lên đĩa thạch có môi trường Kirk bổ sung cơ chất chỉ thị ethyl ferulate (0,1%; w/v) cho hoạt tính feruloyl esterase, thời gian nuôi cấy từ 3 - 7 ngày. Hoạt độ của esterase được xác định dựa trên vòng phân giải được tạo thành [4].

#### Sắc ký bản mỏng (TLC)

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufoalien 60 F<sub>254</sub> (Merck 1,05715). Sử dụng hệ dung môi: n-hexan:etyl acetat:axit formic (20:19:1). Phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254nm hoặc dùng thuốc nhuộm màu FeCl<sub>3</sub> (1,5%) [9].

Chất chuẩn axit hydroxycinnamic (axit ferulic, axit p-coumaric và axit sinapic) được mua tại hãng Sigma Aldrich và pha trong methanol với nồng độ 1mg/ml. Mỗi chất được chấm lên một điểm hoặc theo đường được đánh dấu vị trí trên bản sắc ký mỏng TLC để xác định vị trí R<sub>f</sub>.

#### Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Phương pháp HPLC (LC-10AD, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) được sử dụng để phân tích các hợp chất vòng thơm (axit hydroxycinnamic) và carbohydrate trong sản phẩm chuyển hóa bằng enzyme. Mẫu sau khi ly tâm (12.000 v/ph) được chuyển vào các ống mẫu HPLC loại 1,5ml. Các hợp chất phenolic được rửa giải sử dụng cột sắc ký pha đảo C<sub>18</sub> (Synergi Fusion-RP 80A, 4,6 x 125mm, Phenomenex®, Aschaffenburg, Đức) sử dụng hệ Agilent HPLC (1200 series) với đầu dò DAD ở λ = 323nm. Sản phẩm carbohydrate (các đường đơn) được phân tích sử dụng cột sắc ký Rezex™ [RPM-Monosaccharide Pb<sup>+2</sup> (8%), 7,8mm x 300mm, Phenomenex®] với đầu dò phổ hồng ngoại (IR). Quá trình được thực hiện ở nhiệt độ cột 40°C, pha động sử dụng axit sunfuric 1,25mM với tốc độ dòng 0,6ml/ph trong khoảng thời gian thích hợp.

**Xác định hoạt tính chống oxi hóa của hydroxycinnamic trên hệ thạch rắn - DPPH**

Sắc kí bản mỏng kết hợp với dung dịch DPPH (TLC-DPPH) là một phương pháp cải tiến sắc kí bản mỏng thông thường cho phép định tính khả năng chống oxi hóa của một lớp chất bất kỳ. Phương pháp này có thể sử dụng cho cả bản mỏng pha thường và cả pha đảo. Ưu điểm của phương pháp này là cho phép định tính nhanh các chất có khả năng chống oxi hóa sau khi phân tách trong hệ dung môi trên bản mỏng TLC. Đây là phương pháp đã được công nhận để xác định nhanh hoạt tính chống oxi hóa dựa trên khả năng bắt các gốc tự do tạo bởi DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Chuẩn bị dung dịch DPPH pha trong ethanol (EtOH) 96% với nồng độ 400mg/l. Sau đó, hòa tan 5ml dung dịch DPPH trong 15ml thạch agar (7%), đổ một lớp mỏng hỗn hợp trên lên trên bề mặt bản mỏng TLC đã chạy hệ dung môi phân tách hydroxycinnamic khi chưa nhuộm màu bằng FeCl<sub>3</sub> (1,5%), ủ đĩa thạch ở 37°C trong 20 phút. Các phân đoạn sau khi phân tách bằng TLC, nếu mẫu có hoạt tính chống oxi hóa sẽ xuất hiện các vòng bắt DPPH làm mất màu tím của DPPH dễ dàng quan sát bằng mắt thường.

**Bố trí thí nghiệm:**

Xúc tác chuyển hóa sinh học các vật liệu giàu lignocellulose được thực hiện với sự có mặt của đơn enzyme (*XpoAE*, Celluclast<sup>®</sup> 1.5L hoặc *AltFAE*) và phối hợp với hai enzyme hoặc tất cả các enzyme thủy phân. Các enzyme sử dụng gồm *XpoAE* (13,1U/mg), *AltFAE* (11,2U/mg) và Celluclast<sup>®</sup> 1.5L (700U/g). Sinh khối được ủ với các enzyme trong 8 giờ ở 40°C và phản ứng trong đệm 100mM MOPS (pH 5,0 - 5,5), so sánh với mẫu đối chứng được bất hoạt enzyme bằng cách đun sôi ở 95°C trong 30 phút. Sản phẩm chuyển hóa là axit hydroxycinnamic và các đường đơn được phân tích bằng phương pháp sắc lỏng hiệu năng cao (HPLC). Xúc tác đơn enzyme hoặc hỗn hợp enzyme được nghiên cứu với mùn gỗ (MG).

Bảng 1. Hỗn hợp enzyme thủy phân sử dụng thủy phân mùn gỗ

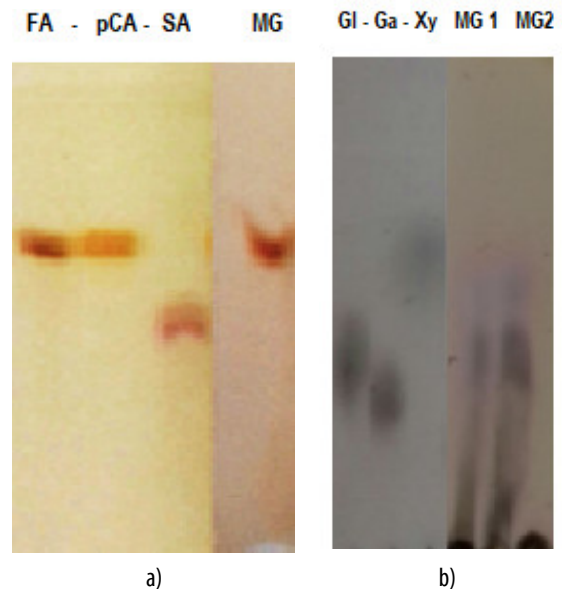
| Enzyme                       | Hoạt tính đặc hiệu (U/mg) | Nhiệt độ tối ưu (°C) | Hoạt độ enzyme/gram mùn gỗ khô (U/gds) |
|------------------------------|---------------------------|----------------------|--|
| Acetyl esterase              | 13,1                      | 42                   | 10                                     |
| Feruloyl esterase            | 11,2                      | 42                   | 10                                     |
| Celluclast <sup>®</sup> 1.5L | 0,7                       | 40 - 45              | 5                                      |

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

**Đánh giá sản phẩm axit hydroxycinnamic và carbohydrat trên bản mỏng TLC**

Khả năng chuyển hóa mùn gỗ giàu lignocellulose bởi enzyme tinh sạch *XpoAE* và *AltFAE* cũng như bởi hỗn hợp các enzyme thủy phân được đánh giá bằng sắc kí bản mỏng TLC. Kết quả thể hiện ở TN1 (*XpoAE* và mùn gỗ), TN2 (*AltFAE* và mùn gỗ), TN3 (hỗn hợp *XpoAE*, *AltFAE* và mùn gỗ) trên sắc kí bản mỏng không xuất hiện vết chất với các công thức enzyme xúc tác đơn lẻ khi hiện màu với FeCl<sub>3</sub> (1,5%). Trong khi đó, ở TN4 khi kết hợp xử lý với hỗn hợp enzyme thủy

phân, bao gồm: *AltFAE*, Celluclast<sup>®</sup> 1.5L và *XpoAE* trên bản mỏng xuất hiện hai vết chất đều ở R<sub>f</sub> = 0,63 tương ứng với R<sub>f</sub> của axit ferulic (FA) và *p*-coumaric (*p*-CA). Mặc dù cùng giá trị R<sub>f</sub> trên TLC nhưng có thể phân biệt FA và *p*-CA khi so sánh hiện màu bằng FeCl<sub>3</sub> (1,5%) và UV ở bước sóng 254nm (hình 2a). Mặt khác, các hợp chất carbohydrat cũng xuất hiện trên bản mỏng biểu hiện thông qua các vết chất đường đơn xuất hiện khá đậm với R<sub>f</sub> = 0,34 tương ứng R<sub>f</sub> của chất chuẩn glucose, các vết chất mờ hơn có R<sub>f</sub> lần lượt là 0,28; 0,32; 0,48 tương ứng với galactose, mannose, xylose (hình 2b).

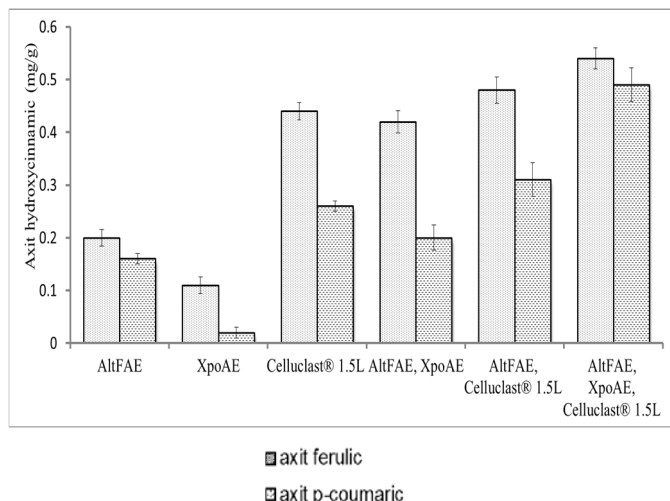


Hình 2. Sản phẩm Axit hydroxycinnamic (a) và carbohydrat (b) trên bản mỏng TLC sau chuyển hóa sinh khối mùn gỗ (MG) bởi hỗn hợp enzyme

Chất chuẩn: axit ferulic R<sub>f(FA)</sub> = 0,63; *p*-coumaric R<sub>f(p-CA)</sub> = 0,63; axit sinapic R<sub>f(SA)</sub> = 0,48; glucose R<sub>f(Gl)</sub> = 0,34; galactose R<sub>f(Ga)</sub> = 0,28 và xylose R<sub>f(Xy)</sub> = 0,48

**Hàm lượng axit hydroxycinnamic sau chuyển hóa**

Khả năng thủy phân cơ chất giàu lignocellulose bởi các enzyme esterase xúc tác đơn lẻ hay phối hợp với các enzyme thủy phân một lần nữa được khẳng định qua kết quả phân tích bằng thiết bị sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPCL). Kết quả cho thấy, có sự giải phóng sản phẩm axit ferulic (thuộc nhóm axit hydroxycinnamic) khi ủ cơ chất với đơn enzyme *XpoAE* nhưng lượng không đáng kể và không phát hiện sản phẩm axit *p*-coumaric. Trong khi đó *AltFAE* xúc tác giải phóng axit ferulic (0,21mg/g) và *p*-coumaric (0,18mg/g) từ cơ chất mùn gỗ mà không cần xử lý trước bằng phương pháp hóa-lý hay enzyme khác (hình 3). Tuy nhiên, sự phối hợp xúc tác của các enzyme esterase tinh sạch từ nấm với Celluclast<sup>®</sup> 1.5L giúp tăng đáng kể hiệu suất chuyển hóa sinh khối lignocellulose. Khi đó, lượng axit ferulic và *p*-coumaric thu được lần lượt là 0,55mg/g và 0,49mg/g sau 8h xúc tác thủy phân mùn gỗ. Kết quả cho thấy, các axit hydroxycinnamic thu được trong nghiên cứu này cao hơn đáng kể so với nghiên cứu trước đây cũng sử dụng enzyme FAE từ nấm *X. polymorpha* đối với cơ chất rơm và arbinoxylan ở cùng thời gian ủ 8h (axit ferulic và *p*-coumaric 0,2 - 0,3 đối với cơ chất rơm và axit ferulic 0,45 đối với arbinoxylan [11]).



Hình 3. Sản phẩm axit hydroxycinnamic (axit ferulic, p-coumaric) sau chuyển hóa mùn gỗ (MG) bởi các đơn enzyme và đa enzyme

Kết quả này chứng minh cho vai trò của các enzyme liên quan trong quá trình tấn công mạch lignocellulose bởi nấm, cũng như hiệu quả hoạt động phối hợp của hỗn hợp enzyme xúc tác chuyển hóa các vật liệu giàu lignocellulose để giải phóng các đường đơn so với thí nghiệm sử dụng các enzyme đơn lẻ. Như vậy, việc sử dụng hỗn hợp enzyme có tác dụng hiệp đồng tốt hơn so với đơn enzyme trong chuyển hóa lignocellulose giải phóng carbohydrate và axit hydroxycinnamic. Khả năng xúc tác chuyển hóa vật liệu giàu lignocellulose bởi các carbohydrate esterase khi sử dụng các enzyme đơn lẻ cũng như phối hợp với các enzyme thủy phân khác (Celluclast® 1.5L, XpoAE, AltFAE) được chứng minh bởi các sản phẩm tạo thành sau phản ứng là các đường khử và các axit ferulic hay p-coumaric.



Hình 4. Hoạt tính chống oxi hóa của axit hydroxycinnamic (axit ferulic và p-coumaric) từ mùn gỗ sau 20 phút ủ trên hệ agar-DPPH

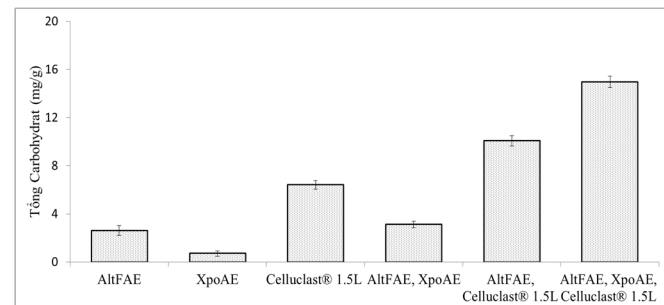
Các vết chất của axit ferulic và p-coumaric hiển thị trên bản mỏng TLC là sản phẩm chuyển hóa của mùn gỗ bằng hỗn hợp enzyme thủy phân được đánh giá hoạt tính chống oxi hóa trên hệ agar-DPPH. Kết quả thể hiện, khả năng bắt gốc tự do tạo bởi DPPH trên đĩa thạch sau thời gian ủ ở 37°C trong 20 phút. Các phân đoạn sau khi phân tách bằng TLC có hoạt tính chống oxi hóa xuất hiện các vòng bẫy DPPH hình tròn màu trắng làm nhạt màu tím của DPPH trên đĩa thạch dễ dàng quan sát bằng mắt thường (hình 4).

### Hàm lượng carbohydrate sau chuyển hóa sinh học

Carbohydrate là sản phẩm xúc tác bởi enzyme được phân tích trên HPLC sử dụng cột RPM-Monosaccharide Pb<sup>2+</sup> (8%) và đầu dò phổ hồng ngoại (IR). Các đường đơn galactose (0,67mg/g), glucose (1,08mg/g) và xylose (0,86 mg/g) thu được sau 8 giờ ủ với enzyme AltFAE (bảng 2). Đặc biệt lượng carbohydrate tổng số tăng đáng kể khi sử dụng phối hợp tất cả các enzyme. Lượng glucose tăng mạnh khi ủ cơ chất với hỗn hợp enzyme thủy phân, khi đó hàm lượng glucose giải phóng đạt 4,52mg/g mùn gỗ khi ủ XpoAE với Celluclast® 1.5L, và đạt 5,58mg/g khi ủ AltFAE với Celluclast® 1.5L. Hàm lượng glucose tăng mạnh nhất đạt 6,89mg/g khi ủ với hỗn hợp enzyme (XpoAE, AltFAE với Celluclast® 1.5L). Hoạt động xúc tác phối hợp của các enzyme nghiên cứu cho thấy lượng các đường đơn khác cũng đều tăng đáng kể. Đường xylose tăng từ 0,19mg/g (XpoAE) lên 3,9mg/g và galactose tăng từ 0,32mg/g (XpoAE) lên 4,18mg/g với thí nghiệm bổ sung hỗn hợp enzyme thủy phân.

Bảng 2. Sản phẩm carbohydrate từ mùn gỗ sau xúc tác chuyển hóa đơn và đa enzyme

| Thành phần         | Ký hiệu                         | Sản phẩm phản ứng (Carbohydrat; mg/g) |           |        |
|--------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-----------|--------|
|                    |                                 | Glucose                               | Galactose | Xylose |
| Đơn enzyme         | AltFAE                          | 1,08                                  | 0,67      | 0,86   |
| Đơn enzyme         | Celluclast® 1.5L                | 3,16                                  | 1,03      | 2,21   |
| Đơn enzyme         | XpoAE                           | 0,19                                  | 0,32      | 0,19   |
| Hỗn hợp hai enzyme | XpoAE, AltFAE                   | 1,31                                  | 0,93      | 0,88   |
| Hỗn hợp enzyme     | AltFAE, Celluclast® 1.5L        | 5,58                                  | 2,48      | 2,01   |
| Hỗn hợp enzyme     | AltFAE, Celluclast® 1.5L, XpoAE | 6,89                                  | 4,18      | 3,90   |



Hình 5. Tổng carbohydrate giải phóng sau xử lý mùn gỗ với các đơn enzyme và hỗn hợp enzyme (AltFAE, Celluclast® 1.5L và XpoAE)

So sánh tổng lượng carbohydrate giải phóng sau khi thủy phân mùn gỗ với các đơn enzyme và hỗn hợp enzyme. Khi đó, hiệu quả xử lý mùn gỗ giàu lignocellulose với đơn enzyme thủy phân từ nấm thu được carbohydrate tổng lần lượt là 2,61mg/g (AltFAE), 6,4mg/g (Celluclast® 1.5L) và 0,7mg/g (XpoAE) nhỏ hơn so với khi xử lý với thủy phân bằng hỗn hợp hai enzyme [(AltFAE, XpoAE; 3,12mg/g) và (Celluclast® 1.5L, AltFAE; 10,07mg/g)]. Đặc biệt, carbohydrate tổng tăng cao nhất đạt 14,97 mg/g khi sử dụng hỗn hợp hai enzyme thủy phân XpoAE và AltFAE kết hợp với chế phẩm Celluclast® 1.5L (hình 5).

Kết quả này chứng minh cho vai trò của các enzyme liên quan trong quá trình tấn công cơ chất gỗ bởi enzyme cũng như hiệu quả hoạt động phối hợp của enzyme thủy phân xúc tác chuyển hóa các vật liệu trên để giải phóng carbohydrate (các đường đơn) so với sử dụng các đơn enzyme.

Theo nghiên cứu của Shatalov, thủy phân cây sậy bằng axit loãng và enzyme cocktail (cellulases và  $\beta$ -glucosidases) ở các điều kiện tối ưu, hàm lượng đường glucose và xylose sinh ra khá cao, tương ứng đạt 164mg/g và 117mg/g [11]. Theo Badal và cộng sự, nghiên cứu sử dụng axit  $H_2SO_4$  loãng (0,75%, v/v) kết hợp chuyển hóa bằng enzyme cocktail (cellulase,  $\beta$ -glucosidase, xylanase và esterase) áp dụng trên đối tượng là rơm, phản ứng được thực hiện dưới điều kiện tối ưu (45°C, pH 5,0, 72 giờ), tổng hàm lượng đường khử sinh ra đạt 265mg/g. Trong điều kiện này, sản phẩm tạo thành không thấy xuất hiện furfural và hydroxymethyl furfural [12]. Cũng liên quan đến hướng nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu của Rossana Liguori sử dụng quy hoạch thực nghiệm để xác định các điều kiện tối ưu cho hỗn hợp gồm hai enzyme (cellulases, xylanases) tinh sạch từ *T. reesei* ATCC26921 sử dụng chuyển hóa cây sậy. Kết quả thí nghiệm đã xác định được điều kiện để chuyển hóa hiệu quả diễn ra ở 45°C, pH 3,5, sau 96 giờ ủ, tổng đường khử thu được đạt 480,1mg/g [13].

Hiệu quả thủy phân các vật liệu giàu lignocellulose phụ thuộc điều kiện tối ưu (nhiệt độ, pH), lượng enzyme và cơ chất. Do đó, để nâng cao hiệu suất thu nhận các sản phẩm tạo thành cần tối ưu các yếu tố trên. Trong nghiên cứu này, cơ chất mùn gỗ không cần tiền xử lý trước bằng axit hay bazơ và điều kiện xúc tác cũng ở pH và nhiệt độ thường.

Như vậy, sử dụng hỗn hợp enzyme có tác dụng hiệp đồng trong chuyển hóa mùn gỗ giàu lignocellulose giải phóng các hợp chất carbohydrat và axit hydroxycinnamic đạt hiệu suất cao. Khả năng xúc tác chuyển hóa vật liệu lignocellulose bởi các enzyme carbohydrate esterase khi sử dụng các enzyme đơn lẻ cũng như phối hợp với các enzyme thủy phân khác (Celluclast<sup>®</sup> 1.5L, *XpoAE*, *AltFAE*) được chứng minh bởi các sản phẩm tạo thành sau phản ứng: các axit hydroxycinnamic (axit ferulic, *p*-coumaric), carbohydrate (glucose, galactose, xylose). Dựa trên kết quả trong nghiên cứu này, một lần nữa khẳng định hỗn hợp enzyme thủy phân (*AltFAE*, *XpoAE* và Celluclast<sup>®</sup> 1.5L) xúc tác thủy phân các liên kết ester giữa các thành phần chính của lignocellulose là các monolignol của lignin và cấu tử hemicellulose. Hơn thế, enzyme này giúp cho quá trình thủy phân polysaccharide thành các mono và dimer xảy ra dễ dàng hơn, trong khi đó nhờ có các enzyme tiên phong (*AltFAE* & *XpoAE*) mà enzyme chính Celluclast<sup>®</sup> 1.5L dễ dàng bẻ gãy các polymer thành những phân tử oligosaccharide có mức độ trùng hợp nhỏ hơn trước khi Celluclast<sup>®</sup> 1.5L hoàn tất quá trình chuyển hóa.

#### 4. KẾT LUẬN

Các enzyme esterase [*AltFAE* (10 U/gds), *XpoAE* (10U/gds)] có khả năng chuyển hóa hiệu quả vật liệu giàu lignocellulose (mùn gỗ) khi phối hợp xúc tác với các enzyme thủy phân

(Celluclast<sup>®</sup> 1.5L; 5 U/gds) giải phóng axit hydroxycinnamic (axit ferulic 0,55mg/g và *p*-coumaric 0,49mg/g) sau 8 giờ thủy phân ở 40°C. Vết chất axit hydroxycinnamic (axit ferulic; *p*-coumaric) chạy trên sắc ký bản mỏng biểu hiện hoạt tính chống oxi hóa được chứng minh khi thử trên hệ thạch rắn-DPPH sau 20 phút ủ ở 37°C. Ngoài ra, tổng hàm lượng carbohydrate sinh ra đạt 14,97mg/g mùn gỗ. Trong đó, nồng độ glucose và xylose tương ứng là 6,89,4mg/g và 3,9mg/g trong điều kiện như trên.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Jorgensen H., Kristensen B. J., Felby C., "Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities," *Biofuel. Bioprod. Bior.*, 1, 119-134, 2007.
- [2]. Peters D., "Raw materials," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 105, 1-30, 2007.
- [3]. Roberts P., Evans S., *The Book of Fungi: A Life-Size Guide to Six Hundred Species from around the World*. University of Chicago Press, Chicago and London, UK, 2011.
- [4]. Wong D. W., "Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 133, 87-112, 2006.
- [5]. Benoit I., Navarro D., Marnet N., "Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products," *Carbohydr. Res.*, 341, 1820-1827, 2006.
- [6]. Balasundram N., "Food Chemistry Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses," *Food Chemistry*, 99, 191-203, 2006.
- [7]. Van Dyk J. S., Pletschke B. I., "Lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes factors affecting enzymes, conversion and synergy," *Biotechnol.*, 30, 1458-1480, 2012.
- [8]. Christakopoulou P., Mamma D., Kekos D., Macris B., "Enhanced acetyl esterase production by *Fusarium oxysporum*," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 443-446, 1999.
- [9]. Leonard V. M., Tungmirai M., Brand J.M., "Determination of ferulic acid and related compounds by thin layer chromatography," *Afr. J. Biotechnol.*, 5, 13, 2006.
- [10]. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity," *LWT - Food Sci. Technol.*, 28, 1, 25-30, 1995.
- [11]. Shatalov A., Pereira H., "Xylose production from giant reed (*Arundo donax* L.): modeling and optimization of dilute acid hydrolysis," *Carbohydr. Polym.*, 87, 1, 210-217, 2012.
- [12]. Badal C. S., Loren B. I., Michael A. C., Victor W. Y., "Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol," *Process Biochemistry*, 40, 12, 3693-3700, 2005.
- [13]. Rossana L., Elena I., Loredana M., Luciana P. S. V., Francesc. L. C., Vincenza F., "Optimization of *Arundo donax* Saccharification by (Hemi)cellulolytic Enzymes from *Pleurotus ostreatus*," *Biomed Res. Int.*, 951871, 2015.

#### AUTHOR INFORMATION

##### Vu Dinh Giap

HaUI Institute of Technology, Hanoi University of Industry, Vietnam