

CỐ ĐỊNH CELLULASE TỪ NẤM *TRICHODERMA* SP. TRÊN HẠT COMPOSIT TẠO BỞI CHITOSAN VÀ CAO-LANH HOẠT HÓA

**Đỗ Hữu Nghị^{1*}, Vũ Đình Giáp¹, Đỗ Hữu Chi²,
Trần Thị Như Hằng¹, Trần Thị Hồng Hà¹, Lê Mai Hương¹**

¹*Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên,*

²*Viện Công nghệ sinh học,*

Viện Hàn lâm KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: nghi@inpc.vast.vn

Đến Tòa soạn: 19/12/2013; Chấp nhận đăng: 24/4/2014

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, hạt composit được tạo thành công từ chitosan và cao-lanh hoạt hóa có đường kính khoảng 4,5 mm và kích thước lỗ hạt 10÷50 μm . Hiệu quả cố định, độ bền hạt, độ bền enzyme sau khi cố định và khả năng tái sử dụng của enzyme cố định cũng được đánh giá. Cellulase được tinh sạch từ môi trường nuôi cấy nấm *Trichoderma* sp. sử dụng sắc kí trao đổi ion DEAE-cellulose và sắc kí lọc gel Sephadex G100, sau đó được cố định trên hạt composit với hiệu suất 78,7 %. Enzyme cố định có độ bền nhiệt và pH cao hơn đáng kể so với dạng tự do (hoạt tính còn lại tăng 35 % khi enzyme ở nhiệt độ 60 °C và 22 % ở pH 9,0). Enzyme cố định có thể tái sử dụng ít nhất 4 lần và vẫn duy trì trên 50 % sau 12 lần sử dụng.

Từ khóa: cellulase, *Trichoderma*, cố định enzyme, chitosan, hạt composit.

1. MỞ ĐẦU

Với đặc tính ưu việt, các quá trình sử dụng enzyme đã được đưa vào áp dụng trong nhiều ngành công nghiệp như công nghiệp thực phẩm, công nghiệp dược, hóa nông nghiệp và xử lý môi trường. Tuy vậy, ngoài những ưu điểm trên vẫn tồn tại những vấn đề trong quá trình sử dụng enzyme: giá thành để phân lập, tinh sạch enzyme còn cao, cấu trúc và hoạt tính enzyme kém bền khi chúng được phân lập từ môi trường tự nhiên. Hơn nữa, phần lớn các enzyme sẽ phân tán trong ở các hệ xúc tác dạng lỏng do vậy chúng làm "nhiễm bẩn" sản phẩm phản ứng và không thể phục hồi hoạt tính để tái sử dụng. Một số phương pháp đã được quan tâm nghiên cứu để khắc phục hạn chế này, trong đó cố định enzyme là phương pháp thành công nhất. Enzyme cố định là enzyme được định vị hóa - lí vào một vài vùng xác định trên chất mang mà vẫn giữ được hoạt tính và có thể sử dụng lặp lại nhiều lần. Các polymer có thể được sử dụng cho việc cố định enzyme bởi chúng có các nhóm chức thích hợp và dễ biến đổi về mặt hóa học. Một trong những chất mang quan trọng nhất cho mục đích này là các polymer tự nhiên như agarose và chitosan (Vd. cho enzyme β - và α -amylase; [1, 2]. Chitosan là một polymer sinh học có bản chất hóa học là polysaccharide mạch thẳng gồm các đơn vị D-glucosamine và N-acetyl-D-glucosamine liên

kết với nhau theo kiểu β -(1-4)-glycoside. Chitosan là một nguyên liệu tương đối rẻ, có tính trơ, ưa nước và tương thích về mặt sinh học nên là một vật liệu phù hợp cho việc cố định enzyme. Hơn nữa, sự có mặt của các nhóm amin của chitosan và protein enzyme dễ dàng tạo liên kết cộng hóa trị với các chất cầu nối, ví dụ như các gốc aldehyde [3].

Enzyme liên quan trong đề tài này, cellulase [endo-(1,4)- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4), exo-(1,4)- β -D-glucanase (EC 3.2.1.91) và β -glucosidase (EC 3.2.1.21)] đã được thương mại hóa và hiện diện cả trong nghiên cứu cơ bản và các nghiên cứu cho mục đích công nghiệp [4, 5]. Các kết quả nghiên cứu chứng minh tiềm năng của các enzyme này trong các ngành công nghiệp như thực phẩm, thức ăn gia súc, công nghệ đồ uống, nông nghiệp, giấy và bột giấy, công nghiệp dệt và chất tẩy rửa. Trong đề tài này, chúng tôi nghiên cứu khả năng cố định *Trichoderma cellulase* trên hạt composit tạo bởi chitosan và cao-lanh hoạt hóa qua liên kết cầu nối của một aldehyde.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Sinh tổng hợp enzyme

Chủng *Trichoderma* sp. được nuôi cấy trên môi trường lên men lỏng ở các điều kiện thích hợp (nhiệt độ 35-37 °C; pH 6,0) trong hệ lên men 2,5 L có xúc khí (0,5+1 v/v/ph) và khuấy liên tục. Thành phần môi trường nuôi cấy nấm như sau (cho 1 L môi trường): rom (cắt nhỏ 1+1,5 cm) 10 g, MgSO₄ 0,5 g, KH₂PO₄ 1,5 g, cao nấm men 2,0 g, dung dịch vi lượng (vết) 1,0 ml.

2.2. Tách chiết và tinh sạch enzyme

Dịch lên men được li tâm 10 000 v/ph, loại cặn lắng, protein trong phần dịch được kết tủa bằng axeton 60 %. Sau khi li tâm, phần cặn protein được hòa trong đệm Na-acetat 20 mM, pH 6,0. Dịch enzym được tinh sạch bằng phương pháp sắc kí trao đổi ion DEAE-cellulose, và sắc kí lọc gel Sephadex G100 [6]. Lượng protein được xác định với Roti[®] - Nanoquant Kit (Roth, Karlsruhe, CHLB Đức) và protein chuẩn BSA (*bovine serum albumin*) theo phương pháp của Bradford [7].

2.3. Xác định hoạt tính enzyme

Hoạt tính cellulase được xác định sử dụng dinitrosalicylic acid theo phương pháp của Miller [8] và Pechsrichuang *et al.* [9].

2.4. Chuẩn bị hạt composit

100 g cao-lanh (kaolin) tự nhiên (C.ty TNHH Việt Trung, Gia Lâm, Hà Nội) đã khử oxyt sắt ($Fe_2O_3 \leq 0,4 + 1,5 \%$) được hoạt hóa với 200 ml H₂SO₄ 1 M ở 80 °C trong 2 giờ. Dịch được lọc qua giấy thủy tinh và rửa bằng nước cất đến trung tính rồi sấy khô ở 110 °C. Cao-lanh đã hoạt hóa ở trên được trộn với chitosan (Sigma-Aldrich, Science Park Road, Singapore) (tỉ lệ 1 : 1; w/w) trong dung dịch axit acetic 1 M. Dung dịch có độ nhớt cao được nhỏ qua xi-lanh vào hỗn hợp chứa NaOH 15 % và ethanol 95 %. Sau khi để 1 ngày, các hạt composit được rửa với nước cất đến pH 7,0, khi đó kích thước đường kính hạt khoảng 4,5 mm. Cho 0,1 g hạt composit vào bình tam giác chứa glutaraldehyde [0,1 % (w/v) CH₂(CH₂CHO)₂; Meck, CHLB Đức]. Lắc 100 v/ph trong 2 giờ trên máy lắc ngang ở 30 °C, đổ hết phần dịch, rửa nhẹ với nước cất và lưu giữ đến khi dùng.

2.5. Ảnh hiển vi điện tử quét (scanning electron microscope, SEM)

Mẫu được lấy ra từ dung dịch, rửa sơ qua bằng nước cất 2 lần rồi để khô trong không khí. Sau đó, gắn mẫu lên trên đế mẫu và hút chân không sơ bộ trong 1 giờ. Sau khi hút chân, mẫu được phun xạ (ion sputtering) một lớp mỏng Platin trước khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (Model S4800, Hitachi, Nhật Bản).

2.6. Cố định enzyme lên chất mang

Bổ sung dịch enzyme vào chất mang ở các tỉ lệ enzyme khác nhau (tương ứng 1:0,1-4:0,1; w/w) trong đệm phosphate (pH 7,0; 100 mM). Để ở nhiệt độ 4 °C trong 18 giờ, sau đó phân kết tủa được lọc và phần enzyme không gắn kết sẽ được rửa loại bằng đệm tương ứng. Mẫu được bảo quản ở 4 °C tới khi sử dụng. Lượng enzyme cố định được tính qua lượng enzyme cellulase ban đầu trừ đi lượng protein còn lại trong dung dịch rửa.

2.7. Độ bền hạt và enzyme cố định

Độ bền của hạt được đánh giá theo % hạt còn lại trong dung dịch với dải pH khác nhau (pH 5 ÷ 9) sau khi ủ hạt ở 25 °C trong đệm phosphate 100 mM qua đêm trên máy lắc ngang 100 v/ph.

Độ bền của enzyme dạng tự do và sau khi cố định trên hạt được xác định ở dải pH và nhiệt độ trong khoảng thời gian khác nhau. Đối với độ bền pH, mẫu được ủ ở 25 °C trong đệm phosphate 100 mM, pH 5,0; 7,0; và 9,0. Để xác định độ bền nhiệt mẫu được ủ ở 25 °C, 37 °C và 60 °C trong đệm phosphate 100 mM pH 7,0. Sau khoảng 2, 4, 6 và 8 giờ mẫu được lấy để xác định hoạt tính còn lại của enzyme so với hoạt tính ban đầu.

2.8. Đánh giá khả năng tái sử dụng của enzyme cố định

Để đánh giá khả năng tái sử dụng của cellulase sau khi cố định, hạt composit có gắn enzyme được rửa với nước cất và đệm sau mỗi phản ứng enzyme, sau đó tiếp tục được sử dụng cho phản ứng tiếp theo. Hoạt tính enzyme được xác định và so sánh với hoạt tính sau khi xúc tác phản ứng lần thứ nhất.

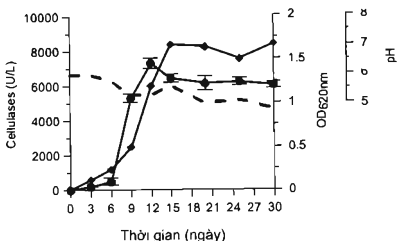
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sinh tổng hợp cellulase bởi *Trichoderma* sp. trên môi trường dịch thể

Đề thu được lượng enzyme đủ lớn cho các nghiên cứu tiếp theo khi enzyme được sinh tổng hợp ở lượng tối đa, động học quá trình lên men enzyme cellulase bởi *Trichoderma* sp. được nghiên cứu trên môi trường lên men lỏng, quy mô 2,5 L/mẻ dưới điều kiện khuấy và xúc khí liên tục.

Kết quả thể hiện trên Hình 1 cho thấy pha lag (pha lũy thừa) kết thúc ngay sau khoảng 15 ngày nuôi cấy, pha cân bằng không kéo dài và kết thúc sau khoảng 18 ngày. Trong khi đó, sinh tổng hợp enzyme bắt đầu mạnh ngay sau ngày thứ 9 và 12 với hoạt tính cellulase tương ứng từ 6100 U/L đến 7300 U/L. Như vậy, đề thu được enzyme với hoạt tính cao quá trình lên men có thể kết thúc trong khoảng 2 tuần nuôi cấy. pH môi trường có sự thay đổi từ pH ban đầu 6,0 đến pH 4,8 sau 30 ngày nuôi cấy.

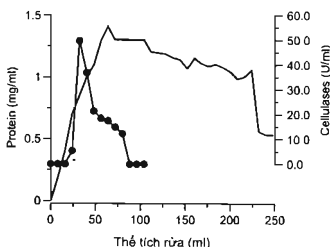
Sinh tổng hợp enzyme thủy phân cellulose bởi *Trichoderma* sp. bắt đầu sau khoảng 3 ngày (= 72 giờ) phù hợp với các nghiên cứu trước đây trên môi trường cơ chất bã ngô [10, 11]. Cơ chất giàu cellulose (bã ngô, rơm...) được biết là cơ chất cảm ứng tốt cho quá trình lên men sinh enzyme cellulase. Hơn nữa, khi sử dụng các cơ chất dạng thô hoạt tính enzyme thường tăng cùng với sự phát triển của nấm, trong khi đó hoạt tính enzyme chỉ duy trì hoặc tăng nhẹ khi sử dụng các cơ chất đã xử lý trước. Trong nghiên cứu này, sự phát triển mạnh của nấm (15 ngày) diễn ra ngay sau khi hoạt tính enzyme đạt tối đa (12 ngày).



Hình 1. Động học quá trình sinh tổng hợp enzyme của chủng *Trichoderma* sp. trên môi trường dịch thể. (●): Sự phát triển của nấm qua OD môi trường ($\lambda = 620$ nm); (○): Hoạt tính cellulase trên cơ chất CMC (U/L); (—): pH môi trường.

3.2. Tách chiết và tinh sạch protein có hoạt tính cellulase

Dịch nuôi cấy *Trichoderma* sp. (tổng thể tích 4 L) được lọc chân không và li tâm 6000 v/ph trong 10 ph, loại cặn. Protein tổng được tủa với axeton 60 %, loại dung môi và hòa thành 50 ml trong đệm phosphate 10 mM, pH 6,0. Sau khi tinh sạch ở bước đầu tiên sử dụng sắc kí trao đổi anion qua cột DEAE-cellulose, đệm Na-acetat 100 mM, pH 4,0 thu được 2 phân đoạn có hoạt tính cellulase (hoạt tính tổng 287,3 U). Các phân đoạn này được thu và tinh sạch tiếp qua cột sắc kí lọc gel Sephadex G100. Kết quả thu được phân đoạn có hoạt tính (phân đoạn 8÷20, tương đương thể tích rửa 30 ÷ 80 ml) với hoạt tính cellulase tổng là 176,1 U trên cơ chất CMC (Hình 2). Sử dụng phương pháp sắc kí trao đổi ion và sắc kí lọc gel Sephadex, Wang *et al.* [12] cũng đã tinh sạch thành công cellulase từ chủng *Salinivibrio* sp. NTU-05 (hoạt tính tổng 71,3 U). Tương tự, với các bước tinh sạch này Li & Yu [13] thu được cellulase từ chủng *Bacillus* sp. (157.8 U) sau khi tủa protein bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Phương pháp phổ biến để phân tách cellulase từ môi trường nuôi cấy *Trichoderma* là sử dụng sắc kí trao đổi ion cột thường cho thấy tương đối hiệu quả và rẻ tiền, trong khi đó sử dụng hệ sắc kí FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) quá trình tinh sạch nhanh hơn, đơn giản hơn nhưng đòi hỏi thiết bị đắt tiền [14].

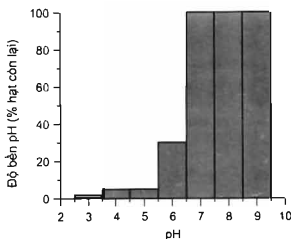


Hình 2. Tinh sạch cellulase từ nấm *Trichoderma sp.* trên cột Sephadex G100.

(●): Hoạt tính cellulase trên cơ chất CMC (U/ml); (—): Protein (mg/ml).

3.3. Tạo hạt composit và cố định enzyme cellulase

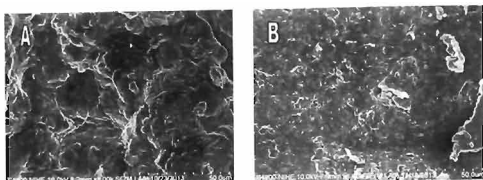
Hạt composit được tạo thành công từ chitosan và cao-lanh hoạt hóa (tỉ lệ 1 : 1) có đường kính ~ 4,5 mm, kích thước lỗ trên bề mặt hạt 10 ÷ 50 µm. Hạt có độ bền cao (không bị tan hay trương nở) với điều kiện pH ≥ 6,5 (~100 % hạt còn lại dưới điều kiện lắc 100 v/ph qua đêm ở 25 °C), trong khi đó trong dung dịch pH 3,0 ÷ 6,0 hạt nhanh bị tan sau khoảng 10 phút (Hình 3).



Hình 3. Độ bền pH của hạt composit theo % hạt còn lại trong dung dịch có pH khác nhau (pH 3÷9) dưới điều kiện lắc 100 v/ph qua đêm.

Việc cố định enzyme lên chất mang polymer trong nghiên cứu công nghệ enzyme là cần thiết để ứng dụng chúng trong các quá trình công nghiệp, xử lí môi trường. Nhiều enzyme đã được cố định thành công với hiệu suất cao [2, 3, 15, 16, 17]. Việc lựa chọn vật liệu mang và phương pháp cố định enzyme rất quan trọng để có thể thực hiện hiệu quả phản ứng enzyme mong muốn. Sử dụng các chất có gốc aldehyde như glyoxyl [18] và glutaraldehyde [19] được biết là có thể tạo được các sản phẩm bền do khả năng liên kết cộng hóa trị đa điểm. Hình ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) trên Hình 4-A cho thấy bề mặt hạt có dạng vẩy nhưng sau khi cố định

protein enzyme (cellulase) qua liên kết cầu nối glutaraldehyde bề mặt hạt trở nên nhẵn mịn hơn rõ rệt như quan sát ở Hình 4-B chứng tỏ enzyme đã được gắn trên bề mặt hạt. Bảng 1 cho thấy hiệu suất cố định enzyme (H_{cd}) theo lượng protein là 78,7 % nhưng hoạt tính còn lại tương đối thấp (51,6 %) điều này có thể giải thích có thể do độc tính của glutaraldehyde đối với enzyme (ít nhất ở nồng độ thí nghiệm 0,1 % (w/v)).



Hình 4. Hình ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) bề mặt hạt composit trước (A) và sau khi cố định protein enzyme (cellulase; B).

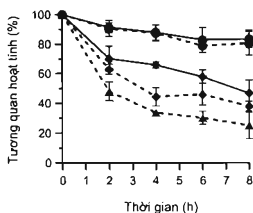
Bảng 1. Hiệu suất và hoạt tính enzyme cố định trên hạt composit.

Thông số (*)	Protein enzyme	Hoạt tính
$\sum P_{td}$ (mg)	1,5	-
$\sum P_{cd}$ (mg)	1,18	-
H_{cd} (%)	78,7	-
$\sum E_{td}$ (U)	-	43,2
$\sum E_{cd}$ (U)	-	22,3
$\sum E_{cl}$ (%)	-	51,6

(*) E_{td} - Hoạt tính enzyme dạng tự do; E_{cd} - Hoạt tính enzyme sau khi cố định; E_{cl} - % Hoạt tính enzyme còn lại; P_{td} - Lượng protein enzyme dạng tự do; P_{cd} - Lượng protein enzyme cố định; H_{cd} - Hiệu suất cố định enzyme.

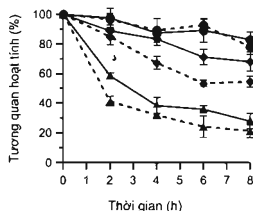
3.4. Độ bền của enzyme cố định

Độ bền pH và nhiệt của enzyme cố định trên chitosan và cao-lanh hoạt hóa được so sánh với độ bền enzyme ở dạng tự do với pH 5,0; 7,0 và 9,0 và nhiệt độ ở 25 °C; 40 °C và 60 °C. Trên Hình 5 cho thấy cellulase từ chủng *Trichoderma* sp. bền ở pH trung tính (pH 7,0), kém bền nhất ở pH kiềm và 50 % hoạt tính giảm sau 4 h ủ trong đệm phosphat pH 9,0. Ở pH này độ bền của enzyme tăng lên rõ rệt sau khi cố định (độ bền tăng 39 % sau 4 h ủ và 19 % sau 8 giờ; trung bình độ bền pH tăng 22 %). Ở pH 7,0 độ bền enzyme trước và sau khi cố định khác nhau không đáng kể. Vì hạt không bền (tan) ở pH 5,0 nên không so sánh với enzyme cố định ở pH này.



Hình 5. Đồ bền pH của enzyme trước (---) và sau khi cố định (—) trên chất mang.
(▲): pH 5; (●): pH 7 và (◆): pH 9.

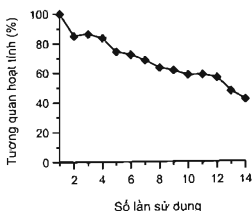
Hình 6 cho thấy cellulase tương đối bền ở 40 °C với > 50 % hoạt tính còn lại sau 8 h ở nhiệt độ này, nhưng ở 60 °C enzyme giảm trên 50 % hoạt tính chỉ sau 2 giờ. Ở cả hai mức nhiệt độ này độ bền enzyme sau khi cố định tăng lên đáng kể, trung bình hoạt tính enzyme còn lại tăng 35 % so với enzyme dạng tự do.



Hình 6. Đồ bền nhiệt của enzyme trước (---) và sau khi cố định (—) trên chất mang.
(●): 25 °C; (◆): 40 °C và (▲): 60 °C.

3.4. Khả năng tái sử dụng của enzyme cố định

Đánh giá khả năng tái sử dụng của enzyme cố định là rất quan trọng cho các ứng dụng xúc tác sinh học trong sản xuất theo mẻ liên tục. Cellulase cố định được sử dụng lặp lại nhiều lần cho phản ứng xúc tác thủy phân CMC. Kết quả thử nghiệm thể hiện trên Hình 7 cho thấy enzyme cố định có độ bền khá cao khi hoạt tính giảm không đáng kể sau 4 lần tái sử dụng (hoạt tính còn lại >80 %) và vẫn duy trì trên 50 % hoạt tính sau 12 lần. Kết quả nghiên cứu ở đây cho thấy cellulase được cố định trên hạt composit chitosan có độ bền cao hơn hoặc tương đương so với một số enzyme khác cố định trên vật liệu này như carbonic anhydrase [20], pepsin [21], lipase [22], tyrosinase [23], nhưng thấp hơn so với catalase [3], pectinase [22], phosphatase [16, 24].



Hình 7. Khả năng tái sử dụng của cellulase cố định trên hạt composit (♦).

4. KẾT LUẬN

Đã thu được enzyme tinh sạch có hoạt tính cellulase từ sinh khối môi trường nuôi cấy *Trichoderma* sp. (hoạt tính cao nhất ở 12 ngày nuôi cấy).

Tạo thành công hạt composit từ chitosan và cao-lanh hoạt hóa (tỉ lệ 1 : 1; w/w), đường kính hạt ~ 4,5 mm, kích thước lỗ hạt 10÷50 μm . Protein enzyme (cellulase) được cố định trên hạt qua liên kết cầu nối sử dụng glutaraldehyde với hiệu suất 78,7%.

Enzyme cố định trên chitosan và cao-lanh hoạt hóa có ưu điểm về độ bền nhiệt, pH và khả năng tái sử dụng cao (hoạt tính còn lại >80 % sau 4 lần sử dụng).

Lời cảm ơn. Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ về tài chính của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam thông qua Đề tài hỗ trợ cán bộ trẻ (2013) và Đề tài độc lập trẻ (VAST.ĐTL.01/14-15).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abd El-Ghaffar, M. A., Atia, K., and Dessouki, A. - Immobilisation of β -amylase on activated natural and synthetic polymers, Cairo-Hurghada (2003).
2. Abd El-Ghaffar M. A. and Hashem M. S. - Immobilisation of α -amylase onto chitosan and its amino acid condensation adducts, *J. Appl. Polym. Sci.* **112** (2009) 805-814.
3. Centinus A. and Oztop H. - Immobilisation of catalase into chemically crosslinked chitosan beads, *Enzym. Microb. Technol.* **26** (2003) 497-501.
4. Singh A. - Engineering enzyme properties, *Indian J. Microbiol.* **39** (1999) 65-77.
5. Singh A., Kubad R. C., and Ward O. P. - Industrial application of microbial cellulases. *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, (Kubad RC and Singh A, eds.), New Delhi, India. I. K. Inter Publ House, 2007, pp. 345-358.
6. Cao J., Guo D., Zeng S., and Wang C. H. - Study on Purification and Characteristics of *Trichoderma reesei* Cellulase, *Food Sci.* **24** (2003) 72-75.
7. Bradford M. M. - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254.

8. Miller G. L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Anal. Chem.* **31** (1959) 426-428.
9. Pechsrichuang P., Yoohat K., and Yamabhai M. - Production of recombinant *Bacillus subtilis* chitosanase, suitable for biosynthesis of chitosan oligosaccharides; *Biores Technol.* **127** (2013) 407-414.
10. Liming, X. and Xueliang, S. - High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue, *Biores Technol.* **91** (2005) 259-262.
11. Vlaev S. D., Djejeva G., Raykovsk V., and Schuegerf K. - Cellulase production by *Trichoderma* sp. grown on corn fibre substrate, *Process. Biochem.* **32** (1997) 561-565.
12. Wang C. Y., Hsieh Y. R., Ng C. C., Chan H., Lin H. T., Tzeng W. S., and Shyu Y. T. - Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05, *Enzym. Microb. Technol.* **44** (2009) 373-379.
13. Li X., and Yu H. Y. - Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus* sp. L1, *J. Indust. Microb. Biotech.* **39** (2012) 1117-1124.
14. Medve J., Lee D., and Tjerneld F. - Ion-exchange chromatographic purification and quantitative analysis of *Trichoderma reesei* cellulases cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II by fast protein liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **808** (1998) 153-165.
15. Shakeel A. A. and Qayyum H. - Potential applications of enzymes immobilized on nano materials, *Biotechnol. Adv.* **30** (2012) 512-523.
16. Srivastava K. and Anand A. - Immobilization of Acid phosphatase from *Vigna aconitifolia* seeds on chitosan beads and its characterization, *Inter. J. Biolog. Macromol.* **64** (2014) 150-154.
17. Tavanoa O. L., Fernandez-Lafuenteb R., José Goulartc A. J., and Montic R. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support, Characterization of the immobilized enzyme, *Proc. Biochem.* **48** (2013) 1054-1058.
18. Mateo C., Palomo J. M., Fuentes M., Betancor L., Grazu V., López-Gallego F., and et al. - Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins, *Enzym. Microb. Technol.* **39** (2006) 274-80.
19. Betancor L., López-Gallego F., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Mateo C., and et al. - Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions, *Enzym. Microb. Technol.* **39** (2006) 877-82.
20. Wanjari S., Prabhu C., Yadav R., Satyanarayana T., Labhsetwar N., and Rayalu S. Immobilization of carbonic anhydrase on chitosan beads for enhanced carbonation reaction, *Process Biochem.* **46** (2011) 1010-1018.
21. Altun G. D. and Cctinus S. A. - Immobilization of pepsin on chitosan beads, *Food. Chem.* **100** (2007) 964-971.
22. Liu K., Zhao G., He B., Chen L., and Huang L. - Immobilization of pectinase and lipase on macroporous resin coated with chitosan for treatment of whitewater from papermaking, *Biores Technol.* **123** (2012) 616-619.

23. Dincer A., Becerik S., and Aydemir T. - Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads, *Inter. Journal Biolog Macromol* **50** (2012) 815- 820.
24. Chang M. Y. and Juang R. S. - Stability and catalytic kinetics of acid phosphatase immobilized on composite beads of chitosan and activated clay, *Proc. Biochem.* **39** (2004) 1087-1091.

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF CELLULASE FROM FUNGUS *TRICHODERMA* SP. ON COMPOSITE BEADS OF CHITOSAN AND ACTIVATED KAOLIN

Do Huu Nghi^{1,*}, Vu Dinh Giap¹, Do Huu Chi²,
Tran Thi Nhu Hang¹, Tran Thi Hong Ha¹, Le Mai Huong¹

¹*Institute of Natural Products Chemistry,*

²*Institute of Biotechnology,*

Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi

*Email: nghi@inpc.vast.vn

In the present study, the composite beads were successfully prepared using chitosan and activated kaolin, which had a diameter of approx. 4.5 mm and pore size of 10 – 50 μm. Cellulase was purified from liquid-state cultivation of *Trichoderma* sp. by using ion-exchange (DEAE-cellulose) and size-exclusion (Sephadex G100) chromatography, and was afterward immobilized on the composite beads with the yield of 78.7 %. The immobilization efficiency, stabilities of composite particle and immobilized enzyme as well as operational stability were evaluated. The pH - and thermal stabilities of immobilized enzyme were significantly higher than those of the free enzyme (remaining activity increased 35 % as incubated at 60 °C and 22 % at pH 9.0). The immobilized enzyme has a reusability of at least 4 times. It remained more than 50 % of its activity after 12 times of reuse.

Keywords: cellulase, *Trichoderma*, enzyme immobilization, chitosan, composite beads.