

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT CHẾ PHẨM *Aspergillus oryzae* KZ3 KẾT HỢP
Streptomyces rochei HDM03 CÓ HOẠT ĐỘ CELLULASE CAO
VÀ THỬ NGHIỆM TÁCH NHỚT HẠT CÀ PHÊ**

Nguyễn Hiền Trang^{1*}, Nguyễn Thị Thủy Tiên¹, Nguyễn Thị Đan Huyền¹, Lê Thị Chung²

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế;

²Trung tâm Y tế thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai.

*Tác giả liên hệ: nguyenhientrang@huaf.edu.vn

Nhận bài: 22/04/2023 Hoàn thành phản biện: 20/06/2023 Chấp nhận bài: 01/07/2023

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là khảo sát một số yếu tố (tỷ lệ giống, thành phần môi trường cơ chất, độ ẩm ban đầu của cơ chất, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy và nhiệt độ sấy của chế phẩm) ảnh hưởng đến quá trình sản xuất chế phẩm *Aspergillus oryzae* KZ3 kết hợp *Streptomyces rochei* HDM03 có khả năng sinh tổng hợp cellulase cao trên môi trường bán rắn và ứng dụng chế phẩm này trong xử lý tách nhớt hạt cà phê ở quy mô phòng thí nghiệm và pilot. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trên môi trường bán rắn gồm 70% cám gạo và 30% trấu, độ ẩm ban đầu 55%, tỷ lệ *A. oryzae* KZ3 và xạ khuẩn *S. rochei* HDM03 nuôi cấy là 0,3% và 6%, sau 4 ngày ủ ở 30°C, hoạt độ cellulase và mật độ tế bào thu được là cao nhất, đạt tương ứng 971,038 UI/g chất khô và 8,463 logtb/g. Khi bổ sung chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 với tỷ lệ 6% trong quy trình chế biến cà phê nhân ở quy mô phòng thí nghiệm và pilot, hiệu suất tách nhớt hạt cà phê đạt lần lượt là 99,29% và 98,83%.

Từ khóa: *Aspergillus oryzae*, Cellulase, *Streptomyces rochei*, Tách nhớt hạt cà phê

**CELLULASE-PRODUCING FORMULATIONS OF *Aspergillus oryzae* KZ3
AND *Streptomyces rochei* HDM03 AND IT'S APPLICATION TO REMOVE
VISCIOUS LAYER FROM COFFEE BEANS**

Nguyen Hien Trang^{1*}, Nguyen Thi Thuy Tien¹, Nguyen Thy Dan Huyen¹, Le Thi Chung²

¹University of Agriculture and Forestry;

²Health Center of Pleiku City, Gia Lai Province.

ABSTRACT

This study aimed to investigate some factors (inoculum ratio, medium composition, initial moisture content of the substrate, temperature, incubation time and drying temperature of the preparation) effects on the production process of *Aspergillus oryzae* KZ3 combined with *Streptomyces rochei* HDM03 preparation possessing high cellulase production ability on semi-solid medium and to apply the application of this preparation in the treatment of viscous separation of coffee beans at laboratory and pilot scale. The cell density of the preparation was determined by colony counting on Gause I and PDA medium. Cellulase activity was determined based on a colorimetric method with DNS reagents. The results showed that, on semi-solid medium consisting of 70% rice bran and 30% rice husk, 55% initial moisture content, starter culture including 0.3% of *A. oryzae* KZ3 and 6% of *S. rochei* HDM03, 4 days of incubation at 30°C, cellulase activity and cell density were highest, reaching 971.038 UI/g dry matter and 8.463 logcell/g, respectively. Adding preparation of *A. oryzae* KZ3 and *S. rochei* HDM03 at the rate of 6% into coffee bean processing procedure in the laboratory and pilot scales, the viscous separation efficiency of coffee beans was 99.29% and 98.83%, respectively.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, Cellulase, *Streptomyces rochei*, Viscous separation of coffee beans

1. MỞ ĐẦU

Aspergillus oryzae và *Streptomyces rochei* là một trong số các loài nấm mốc và xạ khuẩn có khả năng sản sinh các loại enzyme như protease, amylase, cellulase,... có hoạt tính cao theo phương pháp nuôi cấy bề mặt trên môi trường bán rắn (Lương Đức Phẩm, 1998). Các chủng vi sinh vật khác nhau trong một số trường hợp lại có thể kết hợp, hợp tác cùng nhau để sinh tổng hợp các loại enzyme khác nhau. Một số loài nấm và vi khuẩn có khả năng sản sinh nhiều nhóm enzyme, chúng hỗ trợ lẫn nhau để thủy phân mối liên kết β -1,4-D-glucoside trong phân tử cellulose (Muhsin và cs., 2014). Grover và cs. (2013) đã nghiên cứu sản xuất amylase và cellulase thông qua quá trình lên men môi trường bán rắn (môi trường xốp) bằng cách sử dụng kết hợp loài *A. oryzae* và *Trichoderma reesei*. Wu và cs. (2015) đã sử dụng kết hợp nuôi cấy đồng thời *Aspergillus-Streptomyces* trong cùng môi trường để tạo ra các hoạt chất sinh học. Việc sản xuất cellulase từ các đơn chủng đã được tiến hành như Hoa và Hung (2013) nghiên cứu *A. oryzae* có khả năng sản xuất cellulase (hoạt độ enzyme 6,01 FPU/gds) trong quá trình lên men ở trạng thái rắn bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (response surface methodology). Nguyen và cs. (2016) đã nghiên cứu sản xuất chế phẩm cellulase từ loài nấm mốc *A. oryzae* trên mật ri cho hoạt độ cellulase cao nhất là 27,99 U/mL. Nguyễn Thế Trang và Phạm Thị Thu Hương (2015) đã nghiên cứu một số chủng thuộc *Streptomyces* sp. có khả năng sinh cellulase. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi cũng đã xác định loài *Streptomyces rochei* có khả năng sinh cellulase cao trên môi trường bán rắn (Lê Thị Chung và cs., 2020). Tuy nhiên, việc kết hợp *A. oryzae* và *Streptomyces* để sinh cellulase chưa được nghiên cứu đầy đủ ở trong và ngoài nước.

Việc sử dụng chế phẩm sinh học trong xử lý tách nhớt hạt cà phê tại Việt Nam đã được quan tâm nhưng chưa phổ biến. Hiện nay, các chế phẩm sử dụng trong xử lý tách nhớt đa phần là ngoại nhập, giá thành tương đối cao, các chế phẩm enzyme trong nước chưa được sản xuất rộng rãi và thương mại hóa còn hạn chế (Lê Hồng Phú, 2012). Vì vậy, với mục đích nâng cao hiệu quả sinh tổng hợp cellulase, tăng khả năng thương mại hóa và ứng dụng trong thực tiễn, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sản xuất chế phẩm *Aspergillus oryzae* KZ3 kết hợp *Streptomyces rochei* HDM03 có khả năng sinh cellulase cao trên môi trường bán rắn (cám gạo - trấu) và ứng dụng trong xử lý tách nhớt hạt cà phê.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Aspergillus oryzae KZ3 và *S. rochei* HDM03 sử dụng trong nghiên cứu được phân lập từ mẫu ngô và đất thu thập tại tỉnh Thừa Thiên Huế. Các chủng này được định danh bằng giải trình tự gene 28S rRNA của nấm và 16S rRNA của xạ khuẩn. So sánh trình tự gene thu được với ngân hàng gene bằng công cụ BLASTn trên National Center for Biotechnology Information (NCBI) để định danh loài. Các chủng được nuôi cấy và lưu giữ tại phòng thí nghiệm Vi sinh, Khoa Cơ khí và Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Chủng *A. oryzae* KZ3 sử dụng trong nghiên cứu này ở dạng sinh khối khô và *S. rochei* HDM03 sử dụng ở dạng sinh khối tươi.

Hạt cà phê sử dụng cho thử nghiệm là hạt cà phê vối (*Coffea robusta*) đạt độ chín được thu hái thủ công bằng tay tại vườn cà phê của nông dân tỉnh Gia Lai.

Cám gạo và trấu được thu mua trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế.

2.2. Bố trí thí nghiệm

- Khảo sát ở quy mô phòng thí nghiệm: Để xác định ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh cellulase ngoại bào của *A. oryzae* KZ3 kết hợp với *S. rochei* HDM03, chúng tôi tiến hành thực hiện thay đổi tuần tự từng yếu tố và cố định các yếu tố còn lại. Để thực hiện thí nghiệm này, chúng tôi đã khảo sát sơ bộ ban đầu việc sử dụng chủng *A. oryzae* KZ3 riêng lẻ đến hoạt tính cellulase trên môi trường cám - trấu (tỷ lệ 7:3) với các tỷ lệ tiếp giống ở dạng sinh khối khô là 0,1; 0,2; 0,3 và 0,4% nhằm xác định tỷ lệ giống nấm mốc bổ sung tốt nhất để thu được chế phẩm có hoạt tính cellulase cao.

Sau khi đã lựa chọn được tỷ lệ giống *A. oryzae* KZ3 thích hợp, chúng tôi khảo sát kết hợp *A. oryzae* KZ3 với *S. rochei* HDM03, *S. rochei* HDM03 được thay đổi ở các tỷ lệ tiếp giống ở dạng sinh khối tươi (2, 4, 6 và 8%), so sánh với các mẫu đối chứng gồm ĐC1 (chỉ sử dụng *S. rochei* HDM03 với tỷ lệ 8%); ĐC2 (chỉ sử dụng *A. oryzae* KZ3 với tỷ lệ 0,3%); các mức tỷ lệ thành phần môi trường (cám gạo - trấu) là 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 và 9:1; độ ẩm cơ chất được khảo sát ở 40, 45, 50, 55 và 60%; nhiệt độ nuôi cấy ở 25, 28, 30, 35 và 40°C. Sau khi xác định được các thông số thích hợp ở trên, khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào của chủng này được khảo sát theo thời gian nuôi cấy là 1, 2, 3, 4 và 5 ngày. Chế phẩm sau khi nuôi cấy được khảo sát chế độ sấy ở các mức nhiệt độ 40, 45, 50, 55°C để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến chất lượng chế phẩm.

- Khảo sát quy mô phòng thí nghiệm và quy mô pilot: Chế phẩm được sử dụng để xử lý tách nhót hạt cà phê ở quy mô phòng thí nghiệm với tỷ lệ bổ sung 6% ở nhiệt độ phòng trong 10 giờ để đánh giá hiệu lực chế phẩm. Ứng dụng chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 ở quy mô pilot tại

Công ty Trách nhiệm Hữu hạn Thương mại & Dịch vụ Nông Nghiệp Xanh Thiên Hưng, địa chỉ xã Ia Kênh, thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai để tách nhót, sản xuất cà phê nhân. Khối lượng nguyên liệu 50 kg/mẻ, chế phẩm được bổ sung ở tỷ lệ 6%, lên men ở nhiệt độ phòng trong thời gian 10 giờ.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định mật độ tế bào và hoạt độ cellulase của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

Chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 sau khi nuôi cấy được xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) và Gause I (Trần Linh Thuốc, 2006). Hoạt độ cellulase của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 được xác định dựa vào sự thủy phân cơ chất carboxymethyl cellulose (CMC) bởi carboxymethyl cellulase. Kết quả của phản ứng thủy phân tạo ra một lượng đường khử phản ứng với acid 3,5 - dinitrosalicylic (DNS), màu sắc sau phản ứng được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm (Hankin và Anagnostakis, 1975).

2.3.2. Thu nhận enzyme thô từ canh trường nuôi cấy

Enzyme thô được thu nhận từ canh trường nuôi cấy bằng cách hòa tan 5 g canh trường trong 50 ml nước cất vô trùng, sau đó, cho vào máy lắc trong 30 phút với tốc độ 130 vòng/phút. Sau khi lắc, canh trường được ly tâm ở 4°C trong 20 phút với tốc độ 5.000 vòng/phút. Phần dịch bên trên được lọc qua giấy lọc và dịch thu được chính là dịch enzyme thô (Lê Như Cương và cs., 2015).

2.3.3. Đánh giá hiệu lực của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 trong xử lý tách nhót hạt cà phê

Đánh giá hiệu lực của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 trong xử lý tách nhót hạt cà phê dựa trên nghiên cứu của Lê Hồng Phú (2012), cân 100 g hạt cà phê đã tách lớp vỏ cứng, bổ sung chế phẩm khô và tiến hành ủ trong 10 giờ ở nhiệt độ phòng trong điều kiện hiếu khí. Enzyme được sinh tổng hợp bởi chế phẩm sẽ thủy phân lớp nhót hạt cà phê. Sau đó, cà phê được rửa sạch và sấy ở 50°C trong 12 giờ. Đo độ ẩm và cân cà phê sau khi tách nhót để tính hiệu suất tách nhót. Hiệu suất tách nhót thể hiện hiệu quả của chế phẩm.

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được phân tích phương sai một nhân tố ANOVA (Anova single factor) và so sánh các giá trị trung bình bằng thử nghiệm DUNCAN (Duncan's Multiple Range Test) trên phần mềm thống kê SPSS (phiên bản 22) với mức ý nghĩa $p < 0.05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống *A. oryzae* KZ3 đến hoạt độ cellulase của chế phẩm

Bảng 1 cho thấy hoạt độ cellulase ở những tỷ lệ giống bổ sung khác nhau có sự khác nhau. Với tỷ lệ 0,1% hoạt độ cellulase đạt cực tiểu với giá trị tương ứng 214,32 UI/g. Hoạt độ cellulase tăng mạnh và đạt giá trị cực đại ở 308,31 UI/g khi tỷ lệ nấm mốc tăng từ 0,1% đến 0,3%. Khi tiếp tục tăng sinh khối lên 0,4% thì hoạt độ cellulase của chế phẩm có chiều hướng giảm nhưng không có sự sai khác ($p < 0,05$) so với mẫu 0,3% (294,18 UI/g).

Bảng 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống *A. oryzae* KZ3 đến hoạt độ cellulase của chế phẩm

Tỷ lệ giống <i>A. oryzae</i> KZ3 (%)	Hoạt độ cellulase (UI/g)
0,1	214,32 ^c
0,2	245,75 ^b
0,3	308,31 ^a
0,4	294,18 ^a

Số liệu trong cùng một cột có các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Qua kết quả này tỷ lệ tiếp giống 0,3% được lựa chọn để thực hiện cho các thí nghiệm tiếp theo.

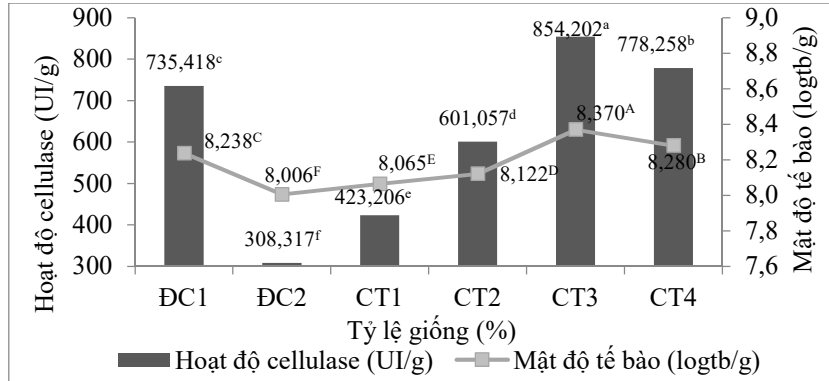
3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm

Hình 1 cho thấy khi bổ sung kết hợp cả hai chủng *A. oryzae* KZ3 và *S. rochei* HDM03 theo 4 công thức, hoạt độ cellulase và mật độ tế bào đạt giá trị cao nhất ở tỷ lệ 0,3% *A. oryzae* KZ3 và 6% *S. rochei* HDM03, đạt 854,202 UI/g và 8,374 logtb/g. Tuy nhiên, nếu tăng tỷ lệ *S. rochei* HDM03

lên 8%, hoạt độ cellulase và mật độ tế bào có xu hướng giảm (chỉ đạt 778,258 UI/g và 8,280 logtb/g). Điều này có thể do khi tăng tỷ lệ *S. rochei* HDM03 cao, cơ chất môi trường không đủ để đáp ứng cho sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, dẫn đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào giảm. So sánh với các mẫu đối chứng cho thấy, khi phối hợp *S. rochei* HDM03 và *A. oryzae* KZ3 cho hoạt độ cellulase và mật độ tế bào cao hơn khi sử dụng riêng lẻ các chủng trên (kết quả có sự sai khác có ý nghĩa thống kê). Kết quả này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Võ Thị Xuyên và cs. (2006) trong việc khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ giống

Streptomyces sp. bổ sung đến khả năng tổng hợp cellulase trên môi trường bã mía: cám mỳ, tác giả đã sử dụng *Streptomyces* sp. ở

dạng huyền phù bào tử với tỷ lệ giống 10⁷ bt/g với giá trị hoạt độ CMCase là 308,8 UI/g.



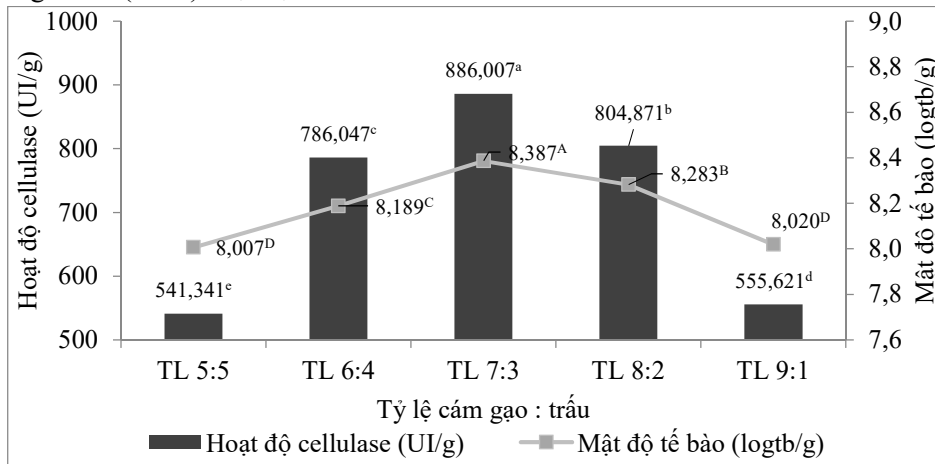
Hình 1. Hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 ở các tỷ lệ giống khác nhau

(ĐC1: *S. rochei* HDM03 8%; ĐC2: *A. oryzae* KZ3 0,3%; các mẫu CT1, CT2, CT3, CT4 có tỷ lệ *A. oryzae* KZ3 0,3% và *S. rochei* HDM03 lần lượt là 2, 4, 6 và 8%)

3.3. Ảnh hưởng của thành phần môi trường cơ chất (cám gạo - trấu) ở các tỷ lệ khác nhau đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

Theo kết quả ở Hình 2 khi nuôi cấy ở môi trường có tỷ lệ 7 cám gạo: 3 trấu, hoạt độ cellulase và mật độ tế bào đạt giá trị cao nhất tương ứng 886,007 UI/g và 8,387 logtb/g. So sánh với nghiên cứu của Trần Thanh Phong và cs. (2007) hoạt độ cellulase

cao nhất đạt 280,63 UI/g khi nuôi cấy chủng *T. reesei* VTT-D-80133 trên môi trường bán rắn với tỷ lệ cơ chất bã mía: cám mỳ là 7:3, như vậy chế phẩm của chúng tôi thu được có hoạt độ cellulase cao hơn 3,16 lần. Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của Phan Thị Bé và cs. (2016) khi thu nhận chế phẩm cellulase của *T. harzianum* T25 trên môi trường cám gạo: trấu (7:3) cho hoạt độ cellulase cao là 947,15 UI/g.

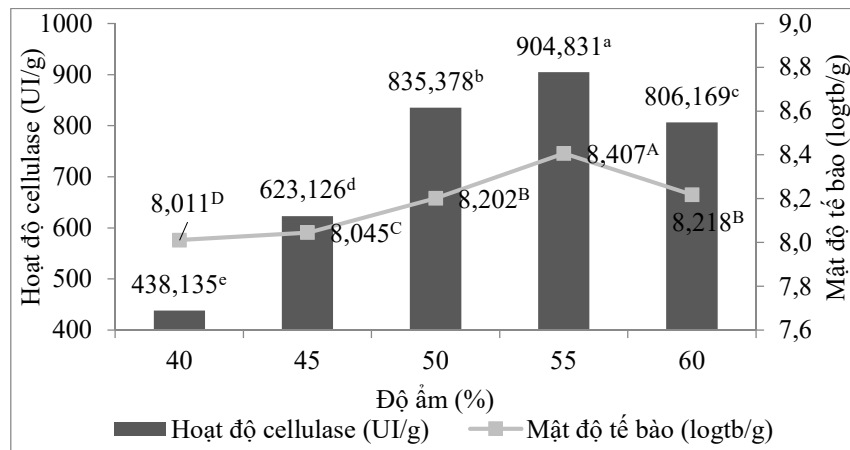


Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ cám gạo : trấu đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

3.4. Ảnh hưởng của độ ẩm cơ chất ban đầu đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

Hình 3 cho thấy ở môi trường có độ ẩm 55% cho hoạt độ cellulase và mật độ tế bào thu được cao nhất (904,831 UI/g và 8,407 logtb/g), trong khi ở môi trường có độ ẩm 40% cho hoạt độ cellulase và mật độ tế bào thấp nhất (438,135 UI/g và 8,011 logtb/g). Hoạt độ cellulase và mật độ tế bào có xu hướng giảm khi tăng độ ẩm lên 60°C. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Bedan và cs. (2014) khi kết luận độ ẩm có vai trò quan trọng trong việc sinh tổng hợp enzyme. Nước làm cơ chất trương lên và tăng khả năng sử dụng cơ chất của vi sinh vật. Tuy nhiên, môi trường cơ chất sẽ giảm

độ xốp nếu độ ẩm tăng cao, làm giảm sự lưu thông oxy trong môi trường, dẫn đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme của vi sinh vật giảm. Với kết quả của chúng tôi chế phẩm cho hoạt độ cellulase cao hơn nghiên cứu của Trần Thị Thanh Thuận và Nguyễn Đức Lượng (2009) khi sử dụng kết hợp *T. viride* và *A. niger* nhằm xử lý nhanh vỏ cà phê thu được hoạt độ cellulase cao nhất đạt 550 UI/g ở độ ẩm môi trường 62%. Hoạt độ cellulase trong chế phẩm của chúng tôi cũng cao hơn so với nghiên cứu gần đây của Lê Thị Chung và cs. (2020) khi khảo sát khả năng sinh tổng hợp cellulase từ chủng *S. rochei* GDM03 trên môi trường cám gạo - trấu ở độ ẩm cơ chất ban đầu là 55% và giá trị hoạt độ cellulase tương ứng là 898,99 UI/g.

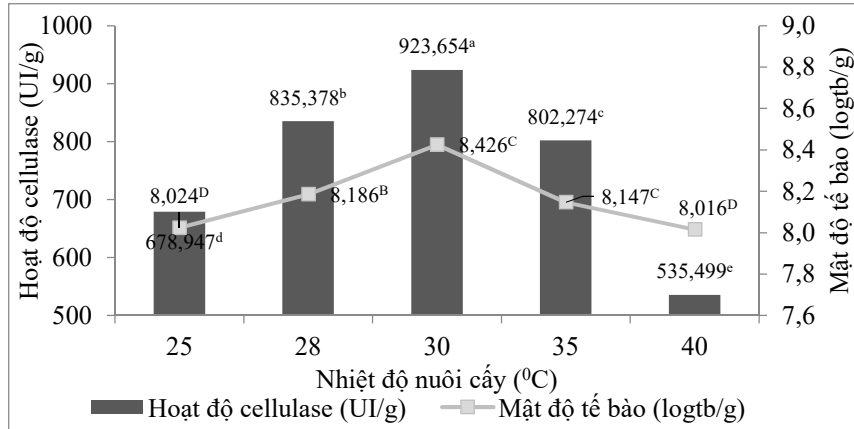


Hình 3. Ảnh hưởng của độ ẩm cơ chất ban đầu đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

Hình 4 cho thấy hoạt độ cellulase và mật độ tế bào đạt giá trị cực đại ở nhiệt độ nuôi cấy 30°C là 923,654 UI/g và 8,426 logtb/g. Tuy nhiên, hoạt độ cellulase và mật độ tế bào có xu hướng giảm với giá trị tương ứng là 535,499 UI/g và 8,016 logtb/g khi tiếp tục tăng nhiệt độ lên đến 40°C. Kết

quả này phù hợp với nghiên cứu của Mrudula và Murugammal (2011) khi sử dụng lên men rắn để sản xuất cellulase từ loài *A. niger* trên môi trường xơ dừa cho hoạt độ cellulase cao ở nhiệt độ nuôi cấy là 30°C. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của Grover và cs. (2013) đã sản xuất amylase và cellulase khi lên men ở trạng thái bán rắn trên môi trường cám gạo của loài *A. oryzae* và *T. reesei* có hoạt độ enzyme cao ở nhiệt độ 30°C.

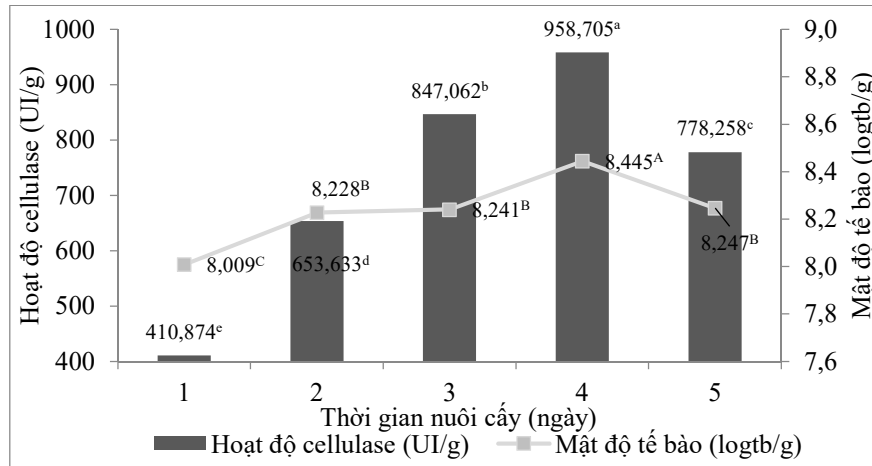


Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

3.6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

Hình 5 cho thấy vào giai đoạn đầu (1 ngày sau khi cấy giống) hoạt độ cellulase và mật độ tế bào thấp (410,874 UI/g và 8,009

logtb/g). Nhưng những ngày tiếp theo, lượng enzyme được sinh ra tăng cao dẫn đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào đạt cực đại ở 4 ngày nuôi cấy là 958,705 UI/g và 8,445 logtb/g. Tuy nhiên hoạt độ enzyme và mật độ tế bào bắt đầu giảm mạnh ở ngày thứ 5 với giá trị tương ứng là 778,258 UI/g và 8,247 logtb/g.



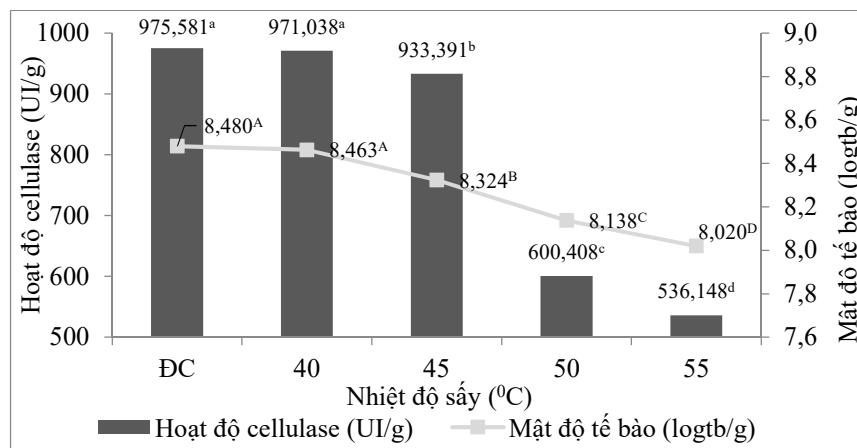
Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Phan Thị Bé và cs. (2016) thu nhận chế phẩm cellulase cao ở *T. harzianum* T25 trên môi trường cám gạo: trấu (7:3), thời gian nuôi cấy 4 đến 5 ngày cho hoạt độ cellulase cao là 947,15 IU/g. Tương tự, kết quả nghiên cứu khác của chúng tôi khi nuôi cấy chủng *S. rochei* HDM03 riêng lẻ trên môi trường cám gạo - trấu đều thu nhận cellulase cao nhất ở ngày thứ 4, tuy nhiên hoạt độ khi nuôi cấy kết hợp 2 chủng *A. oryzae* KZ3 và *S. rochei* HDM03 trong nghiên cứu này cho hoạt độ cao hơn so với nghiên cứu của Lê Thị Chung và cs. (2020). Ratnakomala và cs. (2018) đã thiết kế thử nghiệm Taguchi và phương pháp bề mặt đáp ứng để tối ưu hóa môi trường lên men bởi chủng *Streptomyces* sp. Bs7-9 cho hoạt độ cellulase cao nhất ở 4 ngày nuôi cấy.

3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến chất lượng của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

Hình 6 cho thấy khi sấy trong 6 giờ ở 40°C, chế phẩm thu được có hoạt độ

cellulase và mật độ tế bào giảm nhưng không đáng kể so với chế phẩm trước khi sấy (kết quả thu được có sự sai khác không có ý nghĩa thống kê). Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng nhiệt độ sấy từ 40°C lên 55°C, hoạt độ cellulase và mật độ tế bào có xu hướng giảm mạnh với giá trị tương ứng giảm từ 971,038 UI/g và 8,463 logtb/g xuống còn 536,148 UI/g và 8,020 logtb/g. Kết quả này phù hợp với công bố của Nguyễn Hiền Trang và cs. (2013) khi sử dụng nhiệt độ sấy chế phẩm koji tương ở 40 - 50°C trong 6 giờ. Như vậy 40°C là nhiệt độ thích hợp để sấy chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03. Chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 thu được khi sấy ở nhiệt độ 40°C vẫn đảm bảo mật độ tế bào theo TCVN 6168:2002 về chế phẩm vi sinh vật phân giải cellulose (mật độ vi sinh vật hữu ích lớn hơn 10^8 CFU/g đối với vi sinh vật tuyển chọn). Do đó, chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 thu được sau khi sấy được sử dụng để xử lý tách nhót hạt cà phê ở quy mô phòng thí nghiệm và thử nghiệm ở quy mô pilot.



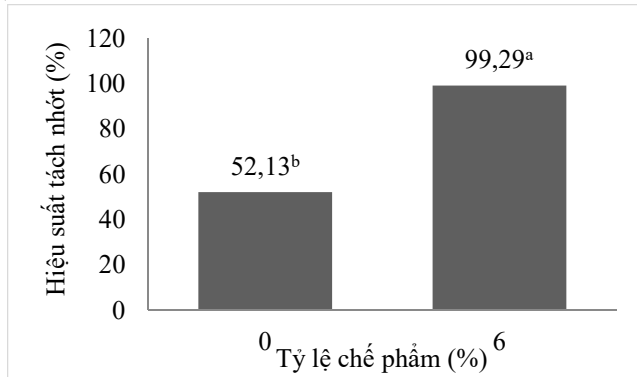
Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hoạt độ cellulase và mật độ tế bào của chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03

3.8. Thử nghiệm chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 trong xử lý tách nhót vỏ hạt cà phê ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô pilot

3.8.1. Thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm

Hình 7 cho thấy so với mẫu cà phê chế biến bằng phương pháp ươm lên men tự nhiên (không có bổ sung chế phẩm), trong cùng một thời gian ủ (10 giờ) với nhiệt độ là 35°C,

hiệu suất sạch nhót chỉ đạt 52,13%. Trong khi mẫu cà phê lên men có bổ sung thêm chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 ở tỷ lệ 6% thì cho hiệu suất tách nhót rất cao 99,29%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lê Hồng Phú (2012) đã sử dụng chế phẩm Biocoffee ở tỷ lệ 5 - 6% cho tỷ lệ tách vỏ đạt 99,88% đến 100%. Chế phẩm được sử dụng là chế phẩm sinh cellulase và pectinase từ nấm sợi.

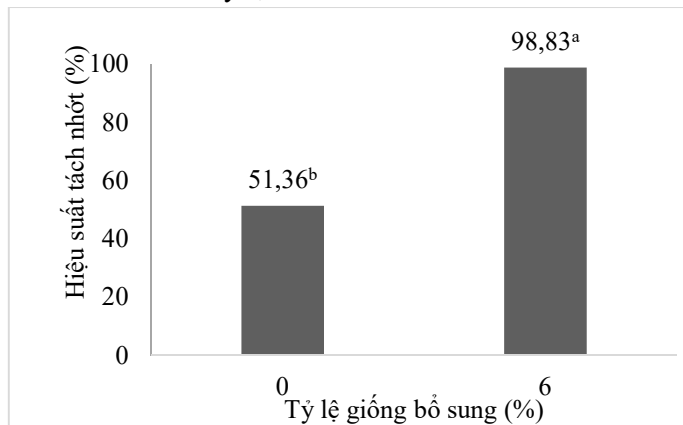


Hình 7. Hiệu suất tách nhót vỏ hạt cà phê ở quy trình chế biến cà phê bằng phương pháp lên men tự nhiên và lên men có bổ sung chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 ở quy mô phòng thí nghiệm

3.8.2. Thử nghiệm ở quy mô pilot

Hình 8 cho thấy với cùng thời gian lên men là 10 giờ thì mẻ cà phê đối chứng sử dụng phương pháp ươm lên men tự nhiên hiệu suất tách nhót đạt 51,36%. Trong khi mẻ cà phê lên men có bổ sung chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 ở tỷ lệ

6%, cho hiệu suất tách nhót đạt 98,83%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho hiệu suất tách nhót cao hơn kết quả của Phan Thị Loan (2010) cũng sử dụng chế phẩm Rohapect® 10L với nồng độ 150 ppm trong 2 giờ và 60 ppm trong 10 giờ cho mức độ sạch nhót của cà phê đạt 95%.



Hình 8. Hiệu suất tách nhót vỏ hạt cà phê ở quy trình chế biến cà phê bằng phương pháp lên men tự nhiên và lên men có bổ sung chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 ở quy mô pilot

Từ kết quả trên cho thấy, chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 có hiệu quả cao trong việc xử lý tách nhót hạt cà phê, làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo để ứng dụng chế phẩm trong công nghệ chế biến cà phê trong tương lai.

4. KẾT LUẬN

Chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 sinh tổng hợp cellulase cao nhất trên môi trường bán rắn với tỷ lệ cám gạo:trấu là 7:3; tỷ lệ nấm mốc *A. oryzae* KZ3 và xạ khuẩn *S. rochei* HDM03 nuôi cấy: 0,3% và 6%; độ ẩm cơ chất ban đầu 55%; nuôi cấy ở 30°C trong 4 ngày. Chế phẩm thu được có hoạt độ cellulase và mật độ tế bào đạt tương ứng là 971,038 UI/g và 8,463 logtb/g được sấy ở 40°C trong 6 giờ để giảm độ ẩm. Bổ sung chế phẩm *A. oryzae* KZ3 kết hợp *S. rochei* HDM03 với tỷ lệ 6% để xử lý tách nhót cà phê nhân ở quy mô 50 kg hạt cà phê với hiệu suất tách nhót đạt được 98,83%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Phan Thị Bé, Nguyễn Đắc Thiện, Nguyễn Thị Hà Trang, Trương Nữ Thùy Trang, Nguyễn Thị Trinh và Nguyễn Thị Kim Uyên. (2016). Nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy để thu nhận và tạo chế phẩm cellulase từ *Trichoderma hazainum* T25. *Tạp san Hội nghị Khoa học công nghệ tuổi trẻ các Trường Đại học và Cao đẳng khối Nông – Lâm – Ngư – Thủy lợi toàn quốc lần thứ 7*, 412-416.

Lê Thị Chung, Nguyễn Hiền Trang và Nguyễn Thị Thủy Tiên. (2020). Nghiên cứu sản xuất chế phẩm *Streptomyces rochei* GDM03 có khả năng sinh cellulase cao trên môi trường bán rắn. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, 493-498.

Lê Như Cương, Hoàng Trọng Kháng và Hồ Công Hưng. (2015). *Tuyển tập kết quả nghiên cứu khoa học cây trồng 2014-2015*. Nhà xuất bản Đại học Huế, 318-319.

Dương Thu Hương, Phạm Kim Đăng và Vũ Văn Hạnh. (2019). Nghiên cứu nâng cao sinh tổng hợp đa enzyme (cellulase, α -amylase và glucoamylase) từ chủng *Aspergillus niger*

A45.1 bằng kỹ thuật đột biến và tối ưu điều kiện lên men xốp. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 17(8), 666-678.

Phan Thị Loan. (2011). *Xác định chế phẩm enzyme và điều kiện thích hợp để xử lý tách nhót cà phê với bằng phương pháp ướt*. Tóm tắt Luận văn Thạc sĩ Kỹ thuật. Trường Đại học Đà Nẵng.

Luong Đức Phạm. (1998). *Công nghệ vi sinh vật*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.

Trần Thanh Phong, Hoàng Quốc Khánh, Võ Thị Hạnh, Lê Bích Phương, Nguyễn Duy Long, Lê Tấn Hưng và Trương Thị Hồng Vân. (2004). Thu nhận enzyme cellulase của *Trichoderma reesei* trên môi trường bán rắn. *Tạp chí Phát triển Khoa học Công nghệ*, 10(7), 1-6.

Lê Hồng Phú. (2012). *Nghiên cứu thu nhận chế phẩm vi sinh vật tổng hợp enzyme pectinase, cellulase và ứng dụng trong sản xuất cà phê nhân theo phương pháp lên men*. Luận án tiến sĩ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Trần Thị Thanh Thuận và Nguyễn Đức Lượng. (2009). Nghiên cứu enzyme cellulase và pectinase từ chủng *Trichoderma viride* và *Aspergillus niger* nhằm xử lý nhanh vỏ cà phê. *Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ*, 12(13), 50-56.

Trần Linh Thuộc. (2006). *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. Hà Nội: Nhà xuất bản Giáo dục.

Nguyễn Hiền Trang, Phạm Trần Thùy Hương và Nguyễn Thị Thủy Tiên. (2013). Ảnh hưởng của một số yếu tố tới sự thu nhận protease ngoại bào từ chủng *Aspergillus oryzae* N2 nuôi cấy trên môi trường bán rắn trong quá trình sản xuất koji tương. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 91(3), 247-256.

Nguyễn Thế Trang và Phạm Thị Thu Phương. (2015). Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của một số chủng *Streptomyces* phân lập ở Việt Nam. *Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 6*, 1744-1748.

Võ Thị Xuyên. (2006). *Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm cellulase từ một số chủng vi sinh vật và khả năng thủy phân cellulose*. Luận văn thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Bedan, D. S., Aziz, G. M., & Al-Sa'ady, A. J. (2014). Optimum conditions for α -amylase production by *Aspergillus niger* mutant isolated using solid state fermentation. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2(4), 450-456.
- Grover, A., Maninder, A. Kaur, L., & Affiliations. (2013). *Production of fungal amylase and cellulase enzymes via solid state fermentation using Aspergillus oryzae and Trichoderma reesei*. Department of Microbiology, College of Basic Sciences and Humanities, Punjab Agricultural University, India, 109-121.
- Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67(3), 597-607.
- Hoa, B. T., & Hung, P. V. (2013). Optimization of nutritional composition and fermentation conditions for cellulase and pectinase by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology. *International Food Research Journal*, 20(6), 3269-3274.
- Muhsin, A. H., Resin, M. H., & Al-Hussein, F. A. (2014). Activity *Aspergillus oryzae* to cellulase production. *Journal of Kerbala University*, 12(2), 15-27.
- Mrudula, S., & Murugammal, R. (2011). *Production of cellulase by Aspergillus niger under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate*. Department of Microbiology, M.G.R. College, India, 1119-1126.
- Nguyen, D. Q., Huynh, H. D. N., & Le, P. H. (2016). Production of Cellulase and Pectinase by Using *Aspergillus oryzae* in Molasses and Their Application for the Extraction of Soluble Solid Content from Coffee. *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER)*, 6(11), 41-45.
- Ratnakomala, S., Fahrurrozi, & Yopi. (2018). Enhancement of Cellulase (CMCase) production from marine actinomycetes *Streptomyces* sp. Bse 7-9: Optimization of fermentation medium by Response Surface Methodology. *Series: Earth and Environmental Science. International Conference on Natural Products and Bioresource Sciences*, 251 012005, 1-13.
- Wu, C., Zacchetti, B., Ram, A. F. J., van Wezel, G. P., Claessen, D., & Hae Choi, Y. (2015). Expanding the chemical space for natural products by *Aspergillus-Streptomyces* co-cultivation and biotransformation. *Scientific Reports*, 5(1), 1-10. DOI: 10.1038/srep10868.