

NGHIÊN CỨU BỔ SUNG PROTEASE TỪ *BACILLUS SUBTILIS* VÀO QUÁ TRÌNH TỰ PHÂN CỦA TRùn QUẾ ĐỂ NÂNG CAO HIỆU QUẢ THU NHẬN ĐẠM HÒA TAN

Trần Ngọc Hùng, Vũ Thị Linh, Nguyễn Trường Nam,
Lê Văn Tài, Huỳnh Thị Kim Trang, Lê Thị Ánh Trúc

Trường Đại học Thủ Dầu Một

TÓM TẮT

Trùn quế có hàm lượng đạm cao, đầy đủ các amino acid thiết yếu. Chúng được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như trồng trọt, chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, việc sử dụng trùn tươi gây ra nhiều trở ngại cho việc thương mại hóa cũng như quá trình sử dụng. Trong một nghiên cứu nhằm nâng cao khả năng thu nhận dịch đạm hòa tan từ trùn quế, chúng tôi đã bổ sung vào quá trình tự phân của trùn quế enzyme protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Hiệu suất thu nhận đạm hòa tan trong dịch trùn cao nhất khi bổ sung protease với hoạt độ 2.5 UI/100ml dịch tự phân, thủy phân ở 35°C trong thời gian 8 giờ, đạt 81.96%, tăng 12.13 % so với khi không có bổ sung protease. Kết quả đề tài sẽ giúp cho quá trình sản xuất chế phẩm dịch trùn quế đạt hiệu quả cao hơn.

Từ khóa: trùn quế, tự phân, bổ sung, enzyme protease, hiệu suất, thu nhận, đạm hòa tan

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trùn quế (*Peryonix excavatus*) có hàm lượng protein rất cao, chiếm đến 68 - 70% vật chất khô, lipid 7-8%, hydratcarbon 12-14% và tro 11-12%^[5,6,8]. Do có hàm lượng đạm cao và chứa đầy đủ các acid amin thiết yếu nên trùn quế được xem là nguồn dinh dưỡng bổ sung quý giá cho gia súc, gia cầm và tôm. Việc bổ sung trùn quế vào khẩu phần ăn của gà sẽ giúp kích thích thèm ăn, tăng trọng nhanh, rút ngắn được thời gian nuôi^[1,10,11]. Các kết quả tương tự cũng thu được khi bổ sung vào khẩu phần ăn của các loại gia súc khác như heo, bò...^[8,9] Đối với tôm, đặc biệt ở giai đoạn ấu trùng, trùn quế tự phân được xem là loại thức ăn chất lượng cao, giúp tôm phát triển nhanh và tăng sức đề

kháng^[6]. Ở lĩnh vực trồng trọt, dịch trùn quế được sử dụng như thành phần chính của phân bón lá, giúp cây trồng sinh trưởng và phát triển tốt^[2]. Đạm trùn quế còn được sử dụng trong các môi trường nuôi cấy vi sinh vật, các loại nấm dược liệu quý hiếm^[3]. Tuy nhiên, việc sử dụng trùn quế tươi không chỉ gây khó khăn trong quá trình bảo quản, vận chuyển mà còn gặp nhiều trở ngại trong quá trình sử dụng. Do đó, trùn quế thường được sấy khô thành dạng bột hoặc thủy phân thành dạng dịch đạm hòa tan.

Trùn quế là đối tượng có khả năng tự phân, nhưng quá trình tự phân nhờ hệ protease nội tại thường kéo dài, mùi hôi khó chịu và hiệu suất không cao^[4]. Trong khi đó, hệ enzyme protease từ *Bacillus subtilis* có

khả năng thủy phân được nhiều loại protein khác nhau, hoạt động tốt trong giới hạn nhiệt độ và pH rộng. Bổ sung protease vào dịch tự phân trùn quế có thể rút ngắn được thời gian tự phân và gia tăng hàm lượng đạm trong dịch tự phân. Do đó, chúng tôi thực hiện đề tài: Nghiên cứu bổ sung protease từ *Bacillus subtilis* vào quá trình tự phân của trùn quế (*Peryonix excavatus*) để nâng cao hiệu quả thu nhận đạm hòa tan.

2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Trùn quế tươi được mua tại trại trùn quế ở số 1A, hẻm 29, đường Trần Tử Bình, ấp Tân Định, xã Tân Thông Hội, huyện Củ Chi, TP. HCM.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

– Thu nhận enzyme protease

Nuôi cấy chủng *Bacillus subtilis* (Trường Đại học Thủ Dầu Một) trên môi trường bán rắn. Sau 72 giờ, thu nhận và sấy khô canh trường có chứa enzyme protease.

Hoạt độ enzyme protease được xác định theo phương pháp Anson. Một đơn vị hoạt độ (UI) được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để thủy phân cơ chất tạo thành 1 μmol Tyrosine trong khoảng thời gian 1 phút, ở 35.5°C, pH 7.6^[4].

– Tự phân trùn quế^[5,6]

Trùn quế đông lạnh được rã đông, xay nhuyễn. Cân 100g trùn cho vào các bình tam giác 250ml, thêm 50g nước. Ủ ở 55°C, lắc với tốc độ 120 vòng/ phút trong 24 giờ.

– Thủy phân trùn quế có bổ sung protease

Trùn quế sau thời gian tự phân được bổ sung enzyme protease với các hoạt độ thích hợp, giữ ở nhiệt độ 40°C trong khoảng thời gian 4 giờ. Ly tâm thu dịch ở tốc độ 5000 vòng/phút, trong thời gian 10 phút. Các mẫu đối chứng sử dụng cùng lượng enzyme như mẫu thí nghiệm nhưng chế phẩm enzyme đã được bất hoạt bằng cách đun cách thủy trong thời gian 15 phút.

– Đánh giá kết quả thí nghiệm

Hiệu suất thu nhận đạm hòa tan (H) = (Hàm lượng nitơ tổng số trong dịch ly tâm/ Hàm lượng nitơ tổng số trong trùn chưa tự phân) x 100

ΔH : H mẫu thí nghiệm – H mẫu đối chứng

Hàm lượng nitơ tổng số trong cơ thể trùn chưa tự phân và trong dịch ly tâm sau khi thủy phân được xác định theo phương pháp Kjeldahl^[7].

– Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 5 lần. Xử lý thống kê các tham số SD, P-value bằng phần mềm Statgraphic Centurion 15 ở độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ

3.1. Ảnh hưởng của việc đảo trộn trong quá trình thủy phân trùn quế bằng protease

Dịch trùn quế sau khi tự phân 24 giờ được bổ sung protease với các hoạt độ 1 và 5 UI/ 100 ml dịch. Khảo sát ảnh hưởng của việc đảo trộn trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 40°C. Kết quả hiệu suất thu nhận đạm hòa tan được thể hiện trong bảng 1 và hình 1.

Bảng 1: Ảnh hưởng của việc đảo trộn lên quá trình thủy phân trùn quế

	Hoạt độ protease bổ sung (UI/100ml)		
	0	1	5
Đảo trộn	71.91 $\pm$ 1.63 ^a	78.00 $\pm$ 0.91 ^b	83.94 $\pm$ 3.79 ^c
Không đảo trộn	70.68 $\pm$ 2.86 ^a	75.02 $\pm$ 3.79 ^b	81.34 $\pm$ 2.41 ^{bc}

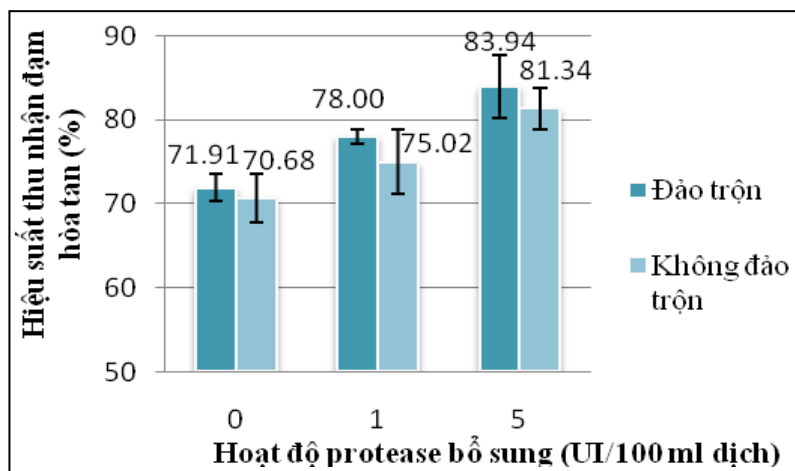
Các giá trị có các chữ cái khác nhau cho thấy sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%

Ở cả 3 nghiệm thức, không bổ sung, bổ sung 1 hoặc 5 UI và dịch tự phân trộn, việc đảo trộn trong quá trình thủy phân đều cho hiệu suất thu nhận đạm hòa tan cao hơn so với khi thủy phân tĩnh. Việc lắc đảo sẽ giúp cho enzyme protease tiếp xúc tốt hơn với cơ chất, thúc đẩy quá trình phân cắt các phân tử protein. Tuy nhiên, phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt này là không rõ ràng. Khi thủy phân trộn trên quy mô sản xuất, khối lượng

3.2. Ảnh hưởng của hoạt độ protease bổ sung lên hiệu suất thu nhận đạm hòa tan

Trong điều kiện thủy phân tĩnh, chúng tôi bổ sung enzyme protease vào dịch tự

mỗi mẻ thủy phân lớn, việc đảo trộn có thể sẽ đem lại hiệu quả rõ ràng hơn. Để tiết kiệm chi phí vận hành, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo trong điều kiện thủy phân tĩnh.



Biểu đồ 1: Ảnh hưởng của việc đảo trộn đến hiệu suất thu nhận đạm hòa tan

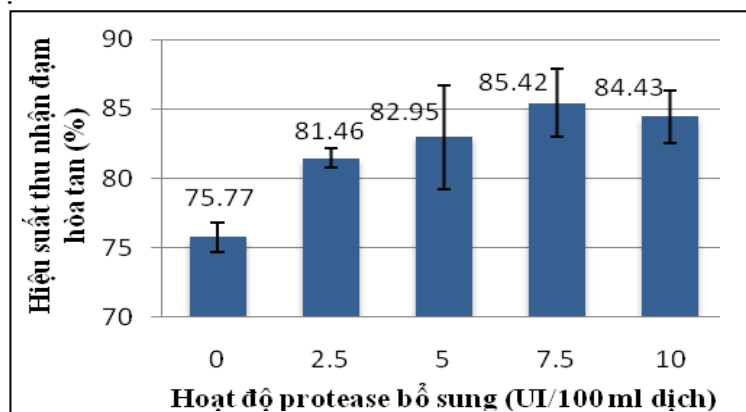
phân trộn quế với các hoạt độ: 2.5; 5.0; 7.5 và 10 UI/ 100 ml dịch tự phân. Giữ ở nhiệt độ 40°C, sau 4 giờ, đánh giá hiệu suất thu nhận đạm hòa tan. Kết quả được thể hiện trong bảng 2 và hình 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của hoạt độ protease bổ sung lên quá trình thủy phân trộn quế

	Hoạt độ protease bổ sung (UI/100ml)				
	0	2.5	5	7.5	10
Hiệu suất thu nhận đạm hòa tan (%)	75.77 ± 1.05 ^a	81.46 ± 0.70 ^b	82.95 ± 3.71 ^b	85.42 ± 2.43 ^b	84.43 ± 1.85 ^b

Các giá trị có các chữ cái khác nhau cho thấy sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% phân lại có chiều hướng giảm, đạt hiệu suất thu nhận đạm hòa tan 84.43%.

Bổ sung protease vào dịch trộn quế sau khi tự phân 24 giờ giúp cho việc thu nhận dịch đạm đạt hiệu quả cao hơn. Hoạt độ protease bổ sung tăng từ 2.5 đến 7.5 UI giúp hiệu suất thu nhận đạm hòa tan gia tăng tương ứng từ 81.46% đến 85.42%. Khi tiếp tục tăng hoạt độ protease bổ sung lên 10 UI, hiệu quả thủy



Biểu đồ 2: Ảnh hưởng của hoạt độ protease bổ sung đến hiệu suất thu nhận đạm hòa tan

Tuy nhiên, kết quả phân tích thống kê cho thấy không có sự khác biệt rõ ràng giữa các nghiệm thức. Bổ sung 2.5 UI vào dịch tự phân trùn quế sẽ giúp tăng hiệu quả thu đạm hòa tan và tiết kiệm được enzyme so với các nghiệm thức khác. Do đó, chúng tôi chọn hoạt độ 2.5 UI bổ sung vào dịch tự phân cho các thí nghiệm tiếp theo.

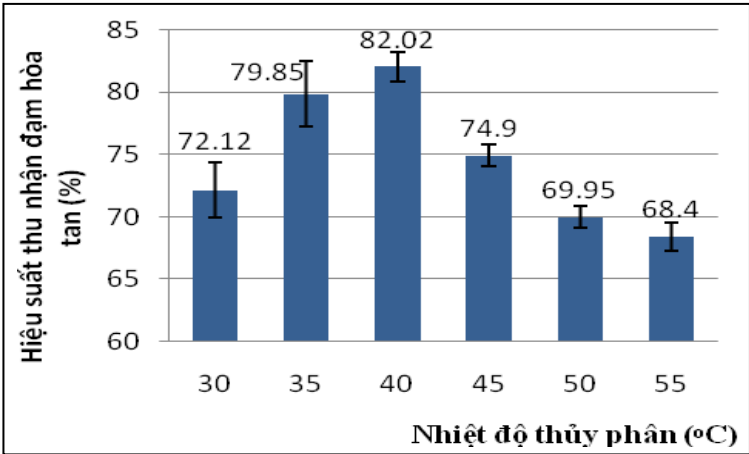
Bảng 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hiệu suất thu nhận đạm hòa tan

	Nhiệt độ thủy phân (°C)					
	30	35	40	45	50	55
Hiệu suất thu nhận đạm hòa tan (%)	72.12 ± 2.19 ^a	79.85 ± 2.63 ^b	82.02 ± 1.16 ^b	74.9 ± 0.88 ^{ac}	69.95 ± 0.88 ^{ad}	68.4 ± 1.16 ^d

Các giá trị có các chữ cái khác nhau cho thấy sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%

Nhiệt độ quá trình thủy phân có ảnh hưởng lớn đến hoạt động xúc tác của enzyme protease. Khi tăng nhiệt độ thủy phân từ 30°C đến 40°C, hiệu suất thu nhận đạm hòa tan cũng tăng dần, đạt giá trị cao nhất là 82.02%. Khi nhiệt độ thủy phân vượt quá 40°C, khả năng xúc tác của protease giảm dần. Ở 55°C, hiệu suất thu nhận đạm hòa tan chỉ đạt 68.4%. Mặc dù hiệu suất thu nhận đạm đạt cao nhất tại 40°C, nhưng kết quả

này không khác biệt nhiều so với khi thủy phân ở 35°C. Do đó, để tiết kiệm năng lượng, chúng tôi chọn nhiệt độ thủy phân 35°C để tiến hành thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3: Biểu đồ ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất thu nhận đạm hòa tan

3.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân lên hiệu suất thu nhận đạm hòa tan.

Trùn quế sau thời gian tự phân 24 giờ, bổ sung enzyme protease vào môi trường với các điều kiện thủy phân đã chọn từ các

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân lên hiệu suất thu nhận đạm hòa tan

Bổ sung một lượng enzyme protease có hoạt độ 2.5 UI vào 100 ml dịch tự phân trùn quế. Nhiệt độ của quá trình thủy phân được thay đổi từ 30°C đến 55°C, mỗi nghiệm thức cách nhau 5°C. Sau 4 giờ, đánh giá hiệu suất thu nhận đạm hòa tan (bảng 3 và hình 3).

Bảng 4: Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất thu nhận đạm hòa tan

	Thời gian thủy phân (giờ)				
	2	4	6	8	10
Hiệu suất thu nhận đạm hòa tan (%)	70.07 ± 4.04 ^a	72.55 ± 0.93 ^a	76.51 ± 1.82 ^b	81.96 ± 1.26 ^c	83.94 ± 0.61 ^c
Hiệu suất thu nhận so với mẫu đối chứng	0.24	2.72	6.68	12.13	14.11

Các giá trị có các chữ cái khác nhau cho thấy sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%

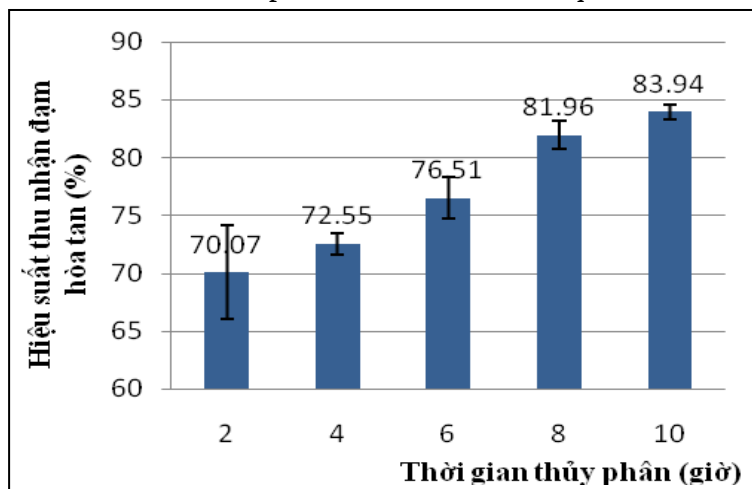
thí nghiệm trước. Sau các khoảng thời gian 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, đánh giá hiệu suất thu nhận đạm hòa tan. Kết quả được thể hiện trong bảng 4 và biểu đồ 4.

Hiệu suất thu nhận đạm hòa tan tăng dần theo thời gian thủy phân. Hiệu suất thu nhận đạm sau 10 giờ thủy phân đạt 83.94%, tăng không đáng kể so với thời điểm 8 giờ. Có thể sau thời gian 8 giờ, khả năng xúc tác của enzyme protease dùng trong nghiên cứu giảm dần, dẫn đến hiệu suất thu nhận

đạm hòa tan trong dịch trùn quế có xu hướng ổn định. Do nhiệt độ quá trình thủy phân chỉ khoảng 35°C, nên việc kéo dài thời gian thủy phân có thể gây tạp nhiễm. Do đó, chúng tôi chọn thời gian 8 giờ cho quá trình thủy phân trùn quế.

So với kết quả công bố của Phan Thị Bích Trâm (2008) tự phân trùn quế thu dịch đạm hòa tan với hiệu suất 46.2%^[5]; nghiên cứu của Nguyễn Thị Xuân Thanh (2009) thu nhận dịch đạm với hiệu suất thủy phân 76.3%^[3], kết quả nghiên cứu của chúng tôi có sự cải thiện đáng kể, hiệu suất thu nhận đạm đạt 81.96%, gia tăng 12.13% so với trường hợp không bổ sung enzyme protease.

Đây là cơ sở để chúng tôi tiến tới xây dựng hoàn chỉnh quy trình sản xuất các sản phẩm dịch đạm từ trùn quế.



Hình 4: Biểu đồ ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất thu nhận đạm hòa tan

4. KẾT LUẬN

– Việc bổ sung enzyme protease vào dịch tự phân trùn quế với hoạt độ 2.5 UI/ 100 ml dịch trùn, ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 8 giờ giúp gia tăng hiệu suất thu nhận đạm hòa tan và tiết kiệm lượng enzyme. Quá trình có thể được tiến hành trong điều kiện thủy phân tĩnh. Hiệu suất thu nhận đạm hòa tan đạt 81.96%, tăng 12.13 % so với trường hợp không bổ sung protease.

– Trong quá trình nghiên cứu chúng tôi nhận thấy lượng bã trùn quế vẫn còn khoảng 13-15%. Vì vậy có thể nghiên cứu thêm ảnh hưởng của pH dịch thủy phân cũng như bổ sung các loại enzyme khác như chitinase, lipase... để giảm lượng bã và nâng cao hơn nữa chất lượng của dịch thủy phân trùn quế.

STUDY ON THE ADDITION OF PROTEASE FROM BACILLUS SUBTILIS ON THE REDWORM AUTOLYSIS PROCESS TO IMPROVE THE RECEIVING OF SOLUBLE PROTEIN

Tran Ngoc Hung, Vu Thi Linh, Nguyen Truong Nam,
Le Van Tai, Huynh Thi Kim Trang, Le Thi Anh Truc

ABSTRACT

The red worm contains a high content of protein, especially essential amino acid. They are applied to many fields such as cultivation, raising and aquaculture. However, using fresh

red worm causes much commercialize trouble. To improving the ability of receiving the protein solution from the red worm, we added protease from Bacillus subtilis to the red worm autolysis process. When the autolysis process added protease with the ratio of 2.5 UI/100 ml protein solution, at 35°C, in 8 hours, the productivity of receiving of soluble protein gets 81.96 percent, increase 12.13% in comparision with the control sample. The result of study will help improve the effect of protein solution production process from the red worm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Văn Bảy (2002), *Nghiên cứu sản xuất và sử dụng trùn đất (Perionyx excavatus) làm thức ăn bổ sung cho gà để góp phần nâng cao hiệu quả nuôi gà thả vườn ở hộ nông dân*, Luận án tiến sĩ khoa học nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.
 - [2] Võ Thị Hạnh và cộng sự (2009), *Sử dụng trùn quế và phân trùn để sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ nông nghiệp*, Viện Sinh học nhiệt đới TP.HCM.
 - [3] Nguyễn Thị Xuân Thanh (2009), *Nghiên cứu ứng dụng đạm thủy phân từ trùn quế (Perionyx excavatus) để nuôi cấy vi sinh*, Luận văn tốt nghiệp kỹ sư công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
 - [4] Phan Thị Bích Trâm, Dương Thị Hương Giang, Hà Thanh Toàn, Phạm Thị Ánh Hồng (2007), *Tinh sạch và khảo sát đặc điểm của các serine protease từ trùn quế (Perionyx excavatus)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, số 5(3), trang 345 – 345.
 - [5] Phan Thị Bích Trâm, Phạm Thị Quỳnh Trâm, Hà Thanh Toàn, Phạm Thị Ánh Hồng (2008), *Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tạo đạm amine của quá trình tự phân giải trùn quế (Perionyx excavatus)*, Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, số 4/08.
 - [6] Phan Thị Quỳnh Trâm (2008), *Khả năng sử dụng sản phẩm tự phân giải (autosis) của trùn quế (Perionyx excavatus) làm thức ăn cho ấu trùng tôm sú*, Luận văn thạc sĩ chuyên ngành công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
 - [7] Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN.43281986 về thức ăn chăn nuôi, Phương pháp xác định hàm lượng đạm nitơ và protein thô.
 - [8] Gerrero (1980), *The culture and use of Perionyx excavatus as a protein recourse in the Philippines*, In earthworm Ecology, ed. J.E. satchell, Chapman and Hall, London, page 309-313.
 - [9] Kale R D, Bano K and krishnamoorthy R U (1982), *Potential of Perionyx exeavatus for utilizing orangnic wastes*, Pedopiolagia, Vol. 23, Page 419-425.
 - [10] Taboga, L. (1980), *The nutritional value of earthworms for chicken*, Brit, Poult.sci.21, page 405-410.
 - [11] Yoshida, M. and Hoshii, H. (1978) *Nutritional value earthworm for poultry feed*, Jpn poult, Sci. 15, page 308-311.
- Ngày nhận bài 15/01/2016
 - Chấp nhận đăng: 30/03/2016