

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG NẤM MỐC CÓ HOẠT TÍNH CELLULASE MẠNH VÀ THỬ NGHIỆM XỬ LÝ NGUYÊN LIỆU TRƯỚC KHI CHIẾT RÚT TINH DẦU

Phạm Thị Ngọc Lan*, Lê Thị Mai

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

*Email: ngoclanz@yahoo.com

Ngày nhận bài: 10/6/2017; ngày hoàn thành phản biện: 8/9/2017; ngày duyệt đăng: 27/10/2017

TÓM TẮT

Để có cơ sở tạo chế phẩm enzyme cellulase có hoạt tính ứng dụng trong xử lý thành tế bào thực vật trước khi chiết xuất tinh dầu, các chủng nấm mốc phân giải cellulose đã được phân lập và tuyển chọn. Kết quả nghiên cứu cho thấy, số lượng nấm mốc phân giải cellulose trong các mẫu mùn thải trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế đạt từ $7,39 \times 10^3$ - $27,70 \times 10^3$ CFU/g đất khô. Từ 155 chủng nấm mốc phân lập, tuyển chọn được hai chủng M22 và M80 có hoạt tính cellulase mạnh. Khi xử lý dịch enzyme của chủng nấm mốc M22 trên lá trà, hiệu suất chiết rút tinh dầu tăng 33% so với đối chứng, tinh dầu có mùi thơm và trong suốt hơn. Xử lý sả trước khi chưng cất tinh dầu bằng dịch enzyme cellulase từ môi trường nuôi cấy dịch thể và bán rắn của chủng M80 cho hiệu quả xử lý cao, hàm lượng cellulose giảm lần lượt 45,57% và 44,39% so với đối chứng.

Từ khóa: nấm mốc phân giải cellulose, phân lập, tuyển chọn.

1. MỞ ĐẦU

Tinh dầu là nguyên liệu sản xuất của nhiều ngành như dược phẩm và mỹ phẩm. Nó còn được ứng dụng rất nhiều trong đời sống, đặc biệt là dịch vụ làm đẹp và chăm sóc sức khỏe. Nhu cầu sử dụng tinh dầu của thế giới nói chung và của Việt Nam nói riêng ngày càng tăng, trong đó phải kể đến là tinh dầu trà và tinh dầu sả. Đây là hai loại tinh dầu được ưa chuộng và chiếm tỉ lệ sản xuất lớn ở Việt Nam. Tuy nhiên, do hạn chế của phương pháp chưng cất truyền thống hiện nay cùng với nguyên liệu đầu vào không ổn định nên việc sản xuất tinh dầu đạt hiệu quả chưa cao cũng như chưa đáp ứng đủ nhu cầu trong nước và xuất khẩu. Trước tình hình cạn kiệt lá trà do khai thác quá mức và sự thiếu ổn định trong cung ứng nguồn nguyên liệu sản xuất tinh dầu sả, việc tìm ra giải pháp để tăng hiệu suất chiết rút tinh dầu trong các quy trình thủ công sẽ có giá trị cao về mặt kinh tế. Trong khuôn khổ bài báo này chúng tôi đề cập

Phân lập và tuyển chọn chủng nấm mốc có hoạt tính cellulase mạnh và thử nghiệm xử lý nguyên liệu ...

đến các nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng nấm mốc có khả năng phân giải cellulose với mong muốn phát hiện nguồn gen vi sinh vật có hoạt tính enzyme cellulase mạnh và thử nghiệm ứng dụng chế phẩm enzyme này để xử lý nguyên liệu trước khi chưng cất tinh dầu nhằm nâng cao hiệu suất chiết rút.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng nấm mốc được phân lập từ mùn rác và các mẫu đất khác nhau trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế.

Lá sả (*Cymbopogon nardus*) và lá trà gió (*Melaleuca cajuputi*) được thu hái từ vùng đồi thuộc địa phận thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phân lập và đếm số lượng tế bào: sử dụng phương pháp Koch để phân lập nấm mốc phân giải cellulose trên môi trường Czapek. Đếm số lượng tế bào nấm mốc bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa [1].

- Sàng lọc nấm mốc có hoạt tính cellulase: tiến hành nuôi cấy trực tiếp nấm mốc trên môi trường Czapek – CMC (carboxymethyl cellulose) thạch đĩa ở nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 4 - 5 ngày, sau đó đánh giá mức độ sinh trưởng phát triển của khuẩn lạc trên thạch đĩa dựa vào đường kính và bề dày khuẩn lạc [1].

- Tuyển chọn chủng nấm mốc có hoạt tính cellulase mạnh: nuôi cấy lắc (120 vòng/phút) chủng nấm mốc trong môi trường dịch thể Czapek - CMC ở nhiệt độ 30°C. Sau 4 ngày, thu dịch nuôi cấy, xác định hoạt tính enzyme cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch đĩa [2]. Phần cặn được sấy khô để xác định sinh khối nấm mốc [1].

- Thăm dò điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp enzyme cellulase của nấm mốc trong môi trường dịch thể bao gồm thời gian nuôi cấy, pH môi trường, nguồn nitrogen và nguồn carbon. Quá trình thăm dò được thực hiện theo nguyên tắc một lúc một biến [3].

- Thí nghiệm khả năng phân giải cellulose của lá trà gió và lá sả:

+ Xử lý lá trà gió: ủ 100 kg lá trà gió tươi với 8 L dịch enzyme cellulase trong 12 giờ ở nhiệt độ thường, chưng cất và so sánh với mẫu đối chứng (mẫu chưng cất không ủ enzyme) về thể tích, hiệu suất và các chỉ tiêu cảm quan của tinh dầu trà.

+ Xử lý sả: ủ 1 g mẫu sả tươi (bao gồm cả thân và lá cắt nhỏ), 1 ml dịch enzyme cellulase trong 12 giờ ở nhiệt độ thường với 5 công thức (CT) thí nghiệm được

thiết lập: CT1 - đối chứng (mẫu bổ sung nước cất vô trùng), CT2 - mẫu bổ sung dịch enzyme nuôi cấy bán rắn của chủng M22, CT3 - mẫu bổ sung dịch enzyme nuôi cấy bán rắn của chủng M80, CT4 - mẫu bổ sung dịch enzyme nuôi cấy dịch thể của chủng M22, CT5 - mẫu bổ sung dịch enzyme nuôi cấy dịch thể của chủng M80. Tiến hành phân tích hàm lượng cellulose còn lại trong mẫu sau khi xử lý bởi dịch enzyme bằng phương pháp xử lý acid [4].

- Xử lý số liệu: các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Số liệu được tính giá trị trung bình và phân tích ANOVA (Duncan's test $p < 0,05$) bằng chương trình SPSS 22.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và xác định số lượng nấm mốc phân giải cellulose

Đã phân lập được 155 chủng nấm mốc có khả năng phân hủy cellulose trên môi trường Czapek - CMC thạch đĩa từ 5 đợt thu mẫu đất và mùn thải ở địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế. Kết quả xác định số lượng nấm mốc được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Số lượng nấm mốc phân giải cellulose trong các mẫu phân lập

STT	Đợt phân lập	Địa điểm thu mẫu	Ký hiệu mẫu	CFU/gam mẫu ($\times 10^3$)
1	Đợt 1	Đất vườn	MA1	19,33
2	10/02/2014	phường An Đông	MA2	18,00
3			MA3	21,14
4	Đợt 2	Đất canh tác	MA4	19,01
5	06/03/2014	phường Hương Sơ	MA5	23,81
6			MA6	27,70
7	Đợt 3	Lá mục	MA7	8,12
8	28/03/2014	Rơm mục	MA8	13,25
9		phường An Hòa	MA9	14,25
10	Đợt 4	Đất trồng trà	MA10	14,48
11	22/04/2014	Lá trà mục	MA11	11,07
12		xã Phong Hiền, huyện Phong Điền	MA12	9,01
13	Đợt 5	Mùn cưa mục	MA13	13,08
14	26/05/2014	Thân cây mục	MA14	8,05
15		xã Bình Điền, thị xã Hương Trà	MA15	7,39

Từ kết quả trên cho thấy, số lượng nấm mốc có khả năng phân giải cellulose sống tự do trong các mẫu phân lập tương đối thấp và mật độ phân bố không đồng đều. Nhìn chung, số lượng nấm mốc ở đất, mùn cưa mục cao hơn so với các mẫu rơm mục, lá mục, thân cây mục.

Với 15 mẫu phân lập, số lượng nấm đạt $7,39 \times 10^3$ - $27,70 \times 10^3$ CFU/g, khi so

Phân lập và tuyển chọn chủng nấm mốc có hoạt tính cellulase mạnh và thử nghiệm xử lý nguyên liệu ...

sánh với kết quả của một số nghiên cứu thì số lượng nấm mốc trong các mẫu phân lập của chúng tôi là khá thấp. Theo nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Trúc Ngân và Phạm Thị Ngọc Lan (2014) trên khối ủ chất thải rắn từ nhà máy sản xuất tinh bột sắn (Thừa Thiên Huế) cũng cho thấy số lượng nấm mốc dao động trong khoảng khá cao từ $2,43 \times 10^6$ đến $34,78 \times 10^6$ CFU/g mẫu khô [5].

3.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm mốc phân giải cellulose

Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm mốc phân lập được thể hiện trên môi trường Czapek - CMC thạch đĩa. Các chủng nấm mốc muốn sinh trưởng và phát triển được thì bắt buộc phải phân giải được CMC vì đây là nguồn cung cấp carbon và năng lượng. Đường kính và bề dày khuẩn lạc phản ánh sơ bộ khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm mốc. Kết quả sàng lọc được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm mốc phân lập

STT	Năng lực sinh trưởng, phát triển	Kí hiệu	Số chủng	Tỷ lệ (%)
1	Yếu	+	21	13,55
2	Trung bình	++	80	51,61
3	Mạnh	+++	35	22,58
4	Rất mạnh	++++	7	4,50
5	Mọc loang	++	12	7,74

Qua bảng 2 chúng tôi nhận thấy, khả năng sinh trưởng phát triển của các chủng nấm mốc trên môi trường thạch đĩa là không đều. Số chủng nấm mốc có khả năng sinh trưởng phát triển trung bình và mạnh chiếm tỷ lệ cao, còn các chủng rất mạnh chỉ chiếm tỷ lệ khá thấp (4,50%).

Theo nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và Nguyễn Thị Thu Thủy (1999), các chủng nấm mốc phân lập từ đất trồng và mùn rác có khả năng phân giải CMC mạnh chiếm 33,33%, rất mạnh (> 20 mm) chiếm 18,10% [6]. Theo nghiên cứu của Nguyễn Lê Anh Đào và cs (2013) trên các chủng nấm mốc thuộc *Aspergillus* spp. phân lập từ đất ruộng, rơm mục, bã mía thì số chủng tạo đường kính vùng phân giải trên 20 mm chiếm 15,38% [7].

3.3. Tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng phân giải cellulose mạnh

Để tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng phân giải cellulose mạnh, 10 chủng nấm mốc có đường kính và bề dày khuẩn lạc lớn được nuôi cấy lắc trong môi trường Czapek - CMC dịch thể. Sau 4 ngày, xác định sinh khối khô và hoạt tính enzyme cellulase bằng phương pháp khuếch tán thạch đĩa. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Kết quả phân tích cho thấy, trong số 10 chủng nấm mốc nghiên cứu có hai chủng có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh ở môi trường Czapek – CMC dịch thể

là M22 và M80. Trong đó, chủng M22 tích lũy sinh khối mạnh (0,48 mg/mL) và có đường kính vòng phân giải CMC khá lớn (29,2 mm). Chủng M80 cũng có khả năng tạo sinh khối khá lớn (0,43 mg/mL) và có đường kính vòng phân giải CMC cao nhất (30,7 mm).

Bảng 3. Sinh khối và đường kính vòng phân giải CMC của các chủng nấm mốc

STT	Chủng nấm mốc	Sinh khối (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải (mm)
1	M2	0,37 ^e	19,7 ^f
2	M10	0,53 ^a	18,5 ^g
3	M13	0,08 ^f	22,7 ^e
4	M22	0,48 ^b	29,2 ^b
5	M39	0,40 ^{de}	17,7 ^h
6	M40	0,32 ^{ef}	22,5 ^{ef}
7	M45	0,33 ^{ef}	18,8 ^{fg}
8	M53	0,36 ^e	26,8 ^c
9	M78	0,41 ^d	24,5 ^d
10	M80	0,43 ^c	30,7 ^a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test)

3.4. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến sinh khối và hoạt tính enzyme cellulase của nấm mốc trong môi trường nuôi cấy dịch thể

3.4.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

2 chủng nấm mốc M22 và M80 được nuôi cấy trong môi trường Czapek dịch thể. Sau những khoảng thời gian nhất định (24 giờ) thu dịch lọc và xác định hoạt tính cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả cho thấy, khi tăng thời gian nuôi cấy thì hoạt tính cellulase và sinh khối của 2 chủng nấm mốc đều tăng, nhưng khi vượt quá thời gian thích hợp thì hoạt tính bắt đầu giảm. Cả hai chủng M22 và M80 đều có hoạt tính cellulase đạt cực đại sau 96 giờ nuôi cấy.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự tích lũy sinh khối và hoạt tính cellulase của chủng nấm mốc M22 và M80

Chủng nấm mốc	Thời gian nuôi cấy (giờ)	Sinh khối (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải CMC (mm)
M22	24	0,10 ^d	15,3 ^d
	48	0,01 ^e	23,2 ^c
	72	0,17 ^c	21,3 ^{cd}
	96	0,27 ^b	30,7 ^a
	120	0,29 ^a	26,3 ^b

	24	0,06 ^e	17,3 ^d
	48	0,18 ^d	27,6 ^{bc}
M80	72	0,21 ^c	28,8 ^b
	96	0,44 ^b	32,8 ^a
	120	0,55 ^a	26,5 ^{cd}

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ($p < 0,05$)

3.4.2. Ảnh hưởng của pH môi trường

Các giá trị pH môi trường thí nghiệm được thiết lập là 3, 4, 5, 6, 7, 8. Sau 96 giờ nuôi cấy, hoạt tính cellulase của cả hai chủng nấm mốc M22 và M80 đều khá cao ở pH môi trường từ acid yếu đến trung tính. Ở pH 3, cả hai chủng đều cho enzyme cellulase có hoạt tính yếu, nguyên nhân có thể do ở điều kiện này, do môi trường quá acid đã hạn chế sự sinh tổng hợp enzyme của các chủng nấm mốc và lượng enzyme tiết ra rất ít có thể cũng bị mất hoạt tính. Vòng phân giải CMC của 2 chủng nấm có kích thước lớn nhất ở pH 7, với chủng M22 là 31,4 mm và chủng M80 là 28,2 mm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự tích lũy sinh khối và hoạt tính cellulase của chủng M22 và M80

Chủng nấm mốc	pH môi trường	Sinh khối (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải CMC (mm)
M22	3	0,48 ^b	21,7 ^e
	4	0,41 ^{bc}	27,4 ^d
	5	0,28 ^d	28,6 ^c
	6	0,43 ^{bc}	29,4 ^b
	7	0,95 ^a	31,4 ^a
	8	0,39 ^c	27,6 ^{cd}
M80	3	0,50 ^a	21,5 ^d
	4	0,31 ^c	23,0 ^{cd}
	5	0,29 ^d	24,3 ^c
	6	0,19 ^e	28,2 ^b
	7	0,45 ^b	30,3 ^a
	8	0,282 ^d	27,0 ^b

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ($p < 0,05$)

3.4.3. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen

Nguồn nitrogen trong môi trường Czapek dịch thể được thay thế lần lượt bằng urea, cao thịt, gelatine, NaNO₃, KNO₃, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄. Dịch enzyme cellulase được thu sau 96 giờ nuôi cấy ở điều kiện pH môi trường là 7.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, nguồn nitrogen có ảnh hưởng đến khả năng phân giải CMC của hai chủng nấm mốc. Chủng M22 thích hợp với nhiều nguồn nitrogen khác nhau, thể hiện qua đường kính vòng phân giải của enzyme khá lớn (trên 30 mm), nhưng cao nhất là khi nuôi cấy trong môi trường chứa gelatine (49,8 mm). Sinh khối cũng đạt cực đại ở nguồn nitrogen này. Đối với chủng M80 thì hoạt tính enzyme không đồng đều ở các môi trường chứa nguồn nitrogen khác nhau, kích thước vòng phân giải cao vượt trội ở các môi trường chứa urea hoặc NaNO_3 . Muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là không thích hợp cho cả 2 chủng nấm mốc.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến sự tích lũy sinh khối và hoạt tính cellulase của chủng nấm mốc M22 và M80

Chủng nấm mốc	Nguồn nitrogen	Sinh khối (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải (mm)
M22	Urea	0,61 ^c	37,1 ^{cd}
	Cao thịt	0,65 ^c	44,7 ^b
	Gelatine	1,70 ^a	49,8 ^a
	NaNO_3	0,78 ^b	37,1 ^d
	KNO_3	0,24 ^e	38,3 ^c
	NH_4NO_3	0,02 ^f	37,2 ^{cd}
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,47 ^d	26,1 ^e
M80	Urea	1,11 ^a	45,3 ^a
	Cao thịt	0,50 ^c	36,6 ^e
	Gelatine	0,93 ^b	38,3 ^d
	NaNO_3	0,42 ^d	42,6 ^b
	KNO_3	0,45 ^{cd}	40,8 ^c
	NH_4NO_3	0,32 ^{ef}	32,1 ^f
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,39 ^e	23,2 ^g

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ($p < 0,05$)

3.4.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Ảnh hưởng của các nguồn carbon đến sinh tổng hợp enzyme cellulase và tích lũy sinh khối của nấm mốc được nêu ở bảng 7.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, nguồn carbon có ảnh hưởng rất khác nhau đến sự tích lũy sinh khối và hoạt tính enzyme cellulase của hai chủng nấm mốc. Chủng M22 có hoạt tính enzyme không đồng đều ở các môi trường chứa các nguồn carbon khác nhau. Kích thước vòng phân giải CMC cao ở các môi trường có nguồn carbon là saccharose, lactose, manitol, CMC. Sinh khối khô và hoạt tính enzyme đạt cực đại ở môi trường saccharose. Trong khi đó, chủng M80 lại thích hợp với nhiều nguồn carbon khác nhau, thể hiện qua đường kính vòng phân giải CMC khá lớn, từ 20,0 mm trở lên,

Phân lập và tuyển chọn chủng nấm mốc có hoạt tính cellulase mạnh và thử nghiệm xử lý nguyên liệu ...

cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường có nguồn carbon là ri đường (35,0 mm), sinh khối khô đạt 2,93 mg/mL với nguồn glucose.

Bảng 7. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sự tích lũy sinh khối và hoạt tính cellulase của chủng nấm mốc M22 và M80

Chủng nấm mốc	Nguồn carbohydrate	Sinh khối khô (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải (mm)
M22	Pectine	0,55 ^c	10,3 ^f
	Glucose	2,66 ^b	13,3 ^e
	Saccharose	3,99 ^a	26,3 ^a
	Ri đường	2,55 ^b	9,3 ⁱ
	Lactose	0,34 ^c	24,3 ^b
	Manitol	2,23 ^b	24,7 ^b
M80	CMC	0,44 ^c	22,3 ^c
	Pectine	0,65 ^d	33,3 ^b
	Glucose	2,93 ^a	26,7 ^c
	Saccharose	2,10 ^b	34,3 ^{ab}
	Ri đường	1,92 ^c	35,0 ^a
	Lactose	0,31 ^e	23,0 ^d
	Manitol	0,32 ^e	24,7 ^c
	CMC	0,15 ^f	22,0 ^d

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ($p < 0,05$)

3.5. Thí nghiệm khả năng phân giải cellulose của dịch enzyme từ nấm mốc

3.5.1. Thí nghiệm xử lý lá trà trà gió

Kết quả thí nghiệm khả năng phân giải cellulose ở lá cây trà trà gió để chưng cất tinh dầu của chủng M22 được thể hiện qua bảng 8.

Bảng 8. Một số chỉ tiêu của tinh dầu trà

STT	Chỉ tiêu	Mẫu đối chứng	Mẫu thí nghiệm
1	Màu sắc, độ trong	Màu vàng nhạt	Xanh lục nhạt, trong suốt hơn
2	Mùi	Mùi thơm của tinh dầu	Mùi thơm hơn
3	Vị	Vị cay và dịu của tinh dầu	Vị cay và dịu của tinh dầu
4	Thể tích	150 mL/ mẻ chưng cất	200 mL/ mẻ chưng cất
5	Hiệu suất	100%	133,33%

Từ kết quả thí nghiệm cho thấy, cùng một lượng nguyên liệu, thời gian và điều kiện chưng cất như nhau, mẫu thí nghiệm có bổ sung dịch enzyme nuôi cấy chủng M22, ủ trong 12 giờ cho lượng tinh dầu nhiều hơn 50 mL/ mẻ (tăng 33,33%), tinh dầu chưng cất có mùi thơm và trong suốt hơn.

3.5.2. Thí nghiệm xử lý lá sả

Sau 12 giờ xử lý sả bằng dịch enzyme nuôi cấy của chủng M22 và M80, tiến hành định lượng cellulose, kết quả được trình bày ở bảng 9.

Bảng 9. Hàm lượng cellulose của các công thức thí nghiệm sau khi xử lý

Công thức	Hàm lượng cellulose (%)	(%) so với đối chứng
1	47,71 ^a	100,00
2	33,09 ^b	69,36
3	26,53 ^c	55,61
4	32,05 ^b	67,18
5	25,97 ^c	54,43

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ($p < 0,05$).

Kết quả cho thấy, hàm lượng cellulose trong các công thức thí nghiệm sau 12 giờ xử lý dịch enzyme đều giảm so với công thức đối chứng. Ở CT5 (bổ sung dịch enzyme nuôi cấy dịch thể của chủng M80) hàm lượng cellulose giảm mạnh nhất (giảm 45,57% so với đối chứng) và sự chênh lệch này có ý nghĩa thống kê; tiếp đến là CT3 (bổ sung dịch enzyme nuôi cấy xốp của chủng M80), hàm lượng cellulose giảm 44,39% so với đối chứng. Với CT2 và CT4, độ giảm so với đối chứng cũng tương đối cao 32,83% và 30,64%.

Như vậy, với sự tác động của enzyme cellulase đến thành tế bào của nguyên liệu trước khi chưng cất sẽ giúp phá vỡ tế bào tạo điều kiện chiết xuất tinh dầu được dễ hơn và nâng cao hiệu suất thu hồi.

4. KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Đã phân lập được 155 chủng nấm mốc có khả năng phân giải CMC từ 15 mẫu đất và mùn thải. Số lượng nấm mốc phân giải cellulose trong mẫu dao động trong khoảng $7,39 \times 10^3$ - $27,70 \times 10^3$ CFU/g. Tuyển chọn được 2 chủng nấm mốc M22 và M80 có khả năng phân giải cellulose mạnh.

2. Trong môi trường dịch thể pH = 7, thời gian nuôi cấy 96 giờ, chủng M22 có sinh khối và hoạt tính mạnh với nguồn carbon là saccharose, nguồn nitrogen là gelatine; chủng M80 với nguồn carbon là rỉ đường, nguồn nitrogen là urea.

3. Trên lá trà gió: bổ sung dịch enzyme chủng M22, ủ trong 12 giờ cho hiệu suất chiết rút tinh dầu tăng 33% so với đối chứng.

Phân lập và tuyển chọn chủng nấm mốc có hoạt tính cellulase mạnh và thử nghiệm xử lý nguyên liệu ...

4. Trên cây sả: dịch enzyme cellulase nuôi cấy dịch thể và bán rắn của chủng M80 cho hiệu quả xử lý cellulose mạnh nhất, hàm lượng cellulose giảm lần lượt 45,57% và 44,39% so với đối chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phạm Thị Ngọc Lan (2012). *Thực tập Vi sinh vật học*, NXB Đại học Huế.
- [2]. Khuru Phương Yến Anh (2007). “Nghiên cứu khả năng sinh enzyme cellulase của một số chủng nấm sợi phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ”, Luận văn Thạc sỹ, Đại học Sư Phạm, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- [3]. Lê Ngọc Trân (2011). “Nghiên cứu sự thay đổi hàm lượng carbon, nitrogen, phosphorus trong quá trình phân hủy Đước đôi (*Rhizophora apiculata* Bl.) tại phần rừng bị gãy đổ do tác động của bão Durian ở huyện Cần Giờ, Thành phố Hồ Chí Minh”, Luận văn Thạc sỹ, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- [4]. Đoàn văn Cung và cộng sự (1998). *Sổ tay phân tích phân bón, đất, nước và cây trồng*. NXB Nông nghiệp. Hà Nội.
- [5]. Nguyễn Ngọc Trúc Ngân, Phạm Thị Ngọc Lan (2014). Tìm hiểu khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật phân lập từ chất thải rắn của nhà máy FOCOCEV Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học Huế*, tập 1, số 1, tr. 135-142.
- [6]. Phạm Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Thu Thủy (1999). Hệ vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế, *Thông tin khoa học của các trường Đại học*, Bộ Giáo Dục và Đào Tạo, Hà Nội, tr. 117-120.
- [7]. Nguyễn Lê Anh Đào, Đỗ Thị Thanh Hương, Trần Nhân Dũng, Bùi Thị Minh Diệu (2013). Phân lập và tuyển chọn các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. có khả năng sinh tổng hợp cellulase, *Báo cáo khoa học, Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2013*, quyển 2, NXB Khoa học và Công nghệ, tr. 104 – 108.

ISOLATION AND SELECTION OF EFFICIENT CELLULOLYTIC FUNGI AND TEST FOR TREATING MATERIALS BEFORE EXTRACTING ESSENCE OIL

Phạm Thị Ngọc Lan*, Lê Thị Mai

Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University

*Email: ngoclanz@yahoo.com

ABSTRACT

For the basic of biological products contribute to treating cell wall before extracting essence oil, strains of cellulolytic fungi were isolated and selected. The research results showed that the number of fungi in the various samples of Thua Thien Hue Province ranged from 7.39×10^3 to 27.70×10^3 CFU/g. There were 155 strains of cellulolytic fungi isolated, and two strains M22 and M80 with strong cellulase activity were chosen. Tested for cellulase decomposition of M22 and M80 strains on *Melaleuca cajuputi*, the productivity of extracting essence oil increases 33% compared to the control sample, more fragrant and transparent. Treating *Cymbopogon nardus* before extracting essence oil by M80 cellulase liquid cultured in the solid and semi-solid medium had the strongest efficiency, the content of cellulose decreases 45.57% and 44.39% compared to the control sample.

Keywords: cellulolytic fungi, isolation, selection.



Phạm Thị Ngọc Lan sinh ngày 01/01/1963 tại Hà Tĩnh. Năm 1984, bà tốt nghiệp cử nhân Sinh học tại trường Đại học Tổng hợp Huế. Năm 1995, bà tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành Hóa sinh – Sinh lý thực vật tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Năm 2004, bà tốt nghiệp tiến sĩ chuyên ngành Sinh lý thực vật tại Đại học Huế. Từ năm 1984 đến nay, bà là giảng viên tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế và hiện đang giữ chức vụ Trưởng khoa Sinh học.

Lĩnh vực nghiên cứu: Sinh học.



Lê Thị Mai sinh ngày 05/08/1994 tại thành phố Huế. Năm 2017 bà tốt nghiệp cử nhân Công nghệ sinh học tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Từ năm 2017 đến nay, bà là nghiên cứu viên phòng Sinh học tại Viện Công nghệ Nano - ĐHQG TP. HCM.

Lĩnh vực nghiên cứu: Vi sinh vật học.

