

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI MỘT SỐ HỢP CHẤT HỮU CƠ VÀ PHÂN HỦY BÃ BIA CỦA BỐN CHỦNG NẤM *TRICHODERMA*

NGUYỄN THỊ THU THỦY, HOÀNG THỊ KIM HỒNG

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Trong thời điểm hiện nay, phương pháp xử lý tiết kiệm chi phí và có hiệu quả nhất đối với các loại rác thải hữu cơ trong các ngành thực phẩm nói chung và các phế phẩm trong ngành sản xuất nước uống lên men nói riêng như các loại bia, thì phương pháp xử lý nhờ vi sinh vật tỏ ra là tối ưu. Bên cạnh việc xử lý được ô nhiễm thì các sản phẩm sau khi xử lý bằng phương pháp này cũng có thể sử dụng làm thức ăn cho gia súc hay làm phân bón. Một trong những đối tượng vi sinh vật được dùng trong phương pháp xử lý nói trên là nấm mốc hay còn gọi là nấm sợi. Loại nấm này có khả năng phát triển rất nhanh trên nhiều nguồn hữu cơ khác nhau khi gặp khí hậu nóng ẩm, tuy nhiên trong tự nhiên nấm mốc phân bố rộng rãi và tham gia tích cực vào vòng tuần hoàn vật chất, nhất là quá trình phân giải chất hữu cơ và hình thành chất mùn. Nó là một đối tượng vi sinh vật có sức sống mạnh, có thể chịu được những điều kiện sống khắc nghiệt như pH thấp, nhiệt độ cao... và có khả năng sống được trên nhiều loại môi trường sống khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các chủng nấm mốc *Trichoderma* đã được phân lập ở Viện Tài nguyên Môi trường và Công nghệ Sinh học – Đại học Huế. Các chủng này có khả năng phân giải cellulose mạnh đồng thời có khả năng sản sinh ra các chất kháng sinh như glyotoxin (được tạo thành bởi nấm *Trichoderma viride*), chất kháng sinh này có thể ức chế sự sinh trưởng của nhiều loại vi khuẩn và nấm gây hại ở cây trồng.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu nghiên cứu: Bốn chủng nấm mốc *Trichoderma* ký hiệu: T01, T16, T28, T42 được nhận từ Viện Tài nguyên Môi trường và Công nghệ Sinh học – Đại học Huế. Đối tượng thử nghiệm: bã bia được lấy từ nhà máy bia Huê.

2. Phương pháp nghiên cứu

+ *Phương pháp nhân giống nấm mốc:* Sử dụng môi trường Czapeck đặc và dịch thể để nhân giống 4 chủng nấm *Trichoderma* (Bảng 1).

Bảng 1

Thành phần môi trường Czapeck

Hóa chất	Nồng độ sử dụng (g/l)	Hóa chất	Nồng độ sử dụng (g/l)
Glucose	20	NaNO ₃	3
MgSO ₄	0.5	KH ₂ PO ₄	1
FeSO ₄	0.01	H ₂ O	1000 ml
Agar – agar	20	pH	6

Đối với môi trường Czapeck đặc: ta nhân giống trong các ống thạch nghiêng bằng cách dùng que cấy, cấy chắm giống lên mặt thạch. Đối với môi trường Czapeck dịch thể ta tiến hành cho 50ml môi trường vào các bình tam giác 100ml, sau đó khử trùng môi trường và tiến hành phối một thể tích giống bằng nhau vào các bình tam giác rồi đem nuôi cấy lắc trên máy lắc ở tốc độ 120 vòng/phút.

+ *Xác định một số thành phần của bã bia trước và sau khi cho nấm *Trichoderma* phân giải:* Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Lowry. Hàm lượng tinh bột được xác định theo phương pháp thủy phân bằng acid. Hàm lượng cellulose xác định theo phương pháp cân.

+ Tiến hành xác định khả năng phân giải tinh bột, protein, cellulose của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma* theo nguyên tắc: enzyme tác động lên cơ chất trong môi trường thạch, cơ chất bị phân huỷ, độ đục môi trường bị giảm và trở nên trong suốt. Độ lớn của vòng phân giải phản ánh hoạt độ của enzyme.

Kết quả được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2003.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Khả năng phân giải tinh bột của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma*

Để đánh giá khả năng phân giải tinh bột của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma*, chúng tôi tiến hành nuôi cấy lắc bốn chủng nấm mốc *Trichoderma* trên môi trường Czapeck dịch thể với nguồn carbon là tinh bột trong 72 giờ. Sau đó thu dịch lọc và xác định hoạt tính của enzyme amylase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Vòng phân giải được phát hiện bằng thuốc nhuộm Lugol. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2

Kích thước vòng phân giải tinh bột và sinh khối khô của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma*

Tên chủng	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/ml)
T01	Không xác định	2,730 ± 0,030
T16	7,75 ± 0,25	2,183 ± 0,027
T28	7,50 ± 0,19	4,286 ± 0,037
T42	Không xác định	1,708 ± 0,043

Qua kết quả ở Bảng 2 ta thấy hai chủng nấm mốc T01 và T42 có hoạt tính amylase rất yếu, không thể xác định được vòng phân giải mặc dù ở trong môi trường nuôi cấy các chủng này vẫn sinh trưởng phát triển và tạo được sinh khối, trong đó chủng T01 tạo được một lượng sinh khối khá lớn là 2,73 mg/ml. Hai chủng T16 và T28 có vòng phân giải tinh bột nhưng không lớn. Đường kính vòng phân giải là 7,75mm đối với chủng T16 và 7,5mm đối với chủng T28. Theo kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Huyền (2009), hai chủng nấm mốc phân giải tinh bột mạnh là M12 và M23 có đường kính vòng phân giải tinh bột lên đến 15,25mm đối với chủng M12 và 14,5mm đối với chủng M23. Như vậy, kết quả phân giải tinh bột của 4 chủng nấm mốc mà chúng tôi nghiên cứu thấp hơn nhiều. Nguyên nhân có lẽ là do đặc tính của 4 chủng nấm mốc này không có khả năng tạo nhiều amylase.

2. Khả năng phân giải protein của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma*

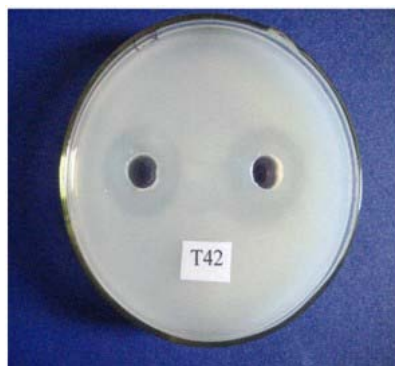
Bảng 3

Kích thước vòng phân giải protein và sinh khối khô của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma*

Tên chủng	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/ml)
T01	5,75 ± 0,25	3,923 ± 0,017
T16	10,25 ± 0,25	7,220 ± 0,020
T28	11,75 ± 0,25	5,610 ± 0,010
T42	13,50 ± 0,50	6,510 ± 0,290

Để đánh giá khả năng phân giải protein của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma*, chúng tôi tiến hành nuôi cấy lắc bốn chủng nấm mốc trên môi trường Czapeck trong đó thay nguồn nitrogen bằng bột đậu nành trong 72 giờ. Sau đó thu dịch lọc và xác định hoạt tính của enzyme protease bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Vòng phân giải được phát hiện bằng thuốc nhuộm Frazie. Kết quả về khả năng phân giải protein của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma* được trình bày ở Bảng 3. Kết quả thí nghiệm ở Bảng 3 cho thấy các chủng nấm mốc

Trichoderma đều có khả năng tích lũy sinh khối mạnh nhưng hoạt tính enzyme protease lại có sự chênh lệch lớn.



Hình 1: Vòng phân giải gelatin của dịch enzyme thu từ nuôi cấy lắc chủng T42 trong môi trường Czapeck pH

Đường kính vòng phân giải của bốn chủng dao động trong khoảng từ 5,75 đến 13,50 mm, trong đó chủng T42 có đường kính vòng phân giải lớn nhất đạt 13,50 mm, tiếp đến là chủng T28 (11,75 mm), chủng T16 (10,25 mm), và nhỏ nhất là chủng T01 (chỉ đạt 5,75 mm). Theo kết quả sơ tuyển của Nguyễn Thị Thanh Huyền (2007), hai chủng vi khuẩn phân giải protein được tuyển chọn có kích thước vòng phân giải là 21,5 mm đối với chủng P38 và 25,5 mm đối với chủng P66, thì khả năng phân giải protein của các chủng nấm mốc mà chúng tôi nghiên cứu là yếu hơn nhiều.

3. Khả năng phân giải cellulose của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma*

Để đánh giá khả năng phân giải cellulose của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma*, chúng tôi tiến hành nuôi cấy lắc bốn chủng nấm mốc *Trichoderma* trên môi trường Czapeck với nguồn carbon là CMC trong 72 giờ. Sau đó thu dịch lọc và xác định hoạt tính của enzyme cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Vòng phân giải được phát hiện bằng thuốc nhuộm Lugol. Kết quả về khả năng phân giải cellulose của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma* được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4

Kích thước vòng phân giải cellulose và sinh khối khô của bốn chủng nấm mốc *Trichoderma*

Tên chủng	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/ml)
T01	12,67 ± 0,33	0,083 ± 0,002
T16	10,75 ± 0,63	0,150 ± 0,024
T28	11,13 ± 0,52	0,340 ± 0,018
T42	10,05 ± 0,65	0,026 ± 0,001



Hình 2: Vòng phân giải CMC của dịch enzyme thu từ nuôi cấy lắc chủng T01 trong môi trường Czapeck với nguồn nitroge là urea

Kết quả trình bày ở Bảng 4 cho thấy, cả bốn chủng nấm mốc *Trichoderma* đều có khả năng phân giải cellulose khá mạnh và tương đương nhau, tuy nhiên sự tích lũy sinh khối của các chủng nấm trong môi trường với cơ chất cellulose khá thấp. Trong bốn chủng thì chủng T01 có hoạt tính phân giải cellulose lớn nhất với đường kính vòng phân giải là 12,67 mm và sinh khối khô đạt 0,083 mg/ml; chủng T42 có đường kính vòng phân giải nhỏ nhất (10,05 mm) với sinh khối khô đạt 0,026 mg/ml; chủng T16 có đường kính vòng phân giải đạt 10,75 mm và chủng T28 có đường kính vòng phân giải là 11,13 mm.

Theo Nguyễn Thị Kim Trâm (2007), hai chủng xạ khuẩn X62 và X73 có đường kính vòng phân giải CMC lần lượt là: 23mm và 24,5mm, thì kết quả thu được của chúng tôi là thấp hơn

nhiều. Qua 3 bảng kết quả được trình bày ở trên ta thấy rằng các chủng nấm mốc chúng tôi nghiên cứu có hoạt tính cellulase và protease trội hơn so với hoạt tính amylase. Do đó chúng tôi tiến hành chọn chủng có hoạt tính protease mạnh là chủng T42 và chủng có hoạt tính cellulase mạnh là chủng T01 để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

4. Kết quả thử nghiệm khả năng phân hủy bã bia của hai chủng nấm mốc *Trichoderma*

Để thử nghiệm khả năng phân giải bã bia của chủng nấm mốc T01 và T42, chúng tôi tiến hành phối trộn hai chủng này với bã bia ở các tỷ lệ khác nhau. Sau 3 ngày cho phối trộn sẽ tiến hành xác định khả năng phân giải một số thành phần có trong bã bia của hai chủng nấm mốc bằng cách xác định hàm lượng của tinh bột, protein, cellulase có trong bã bia trước và sau khi phối trộn. Trước khi phối trộn chúng tôi tiến hành nhân giống hai chủng T01 và T42 trong môi trường Czapeck dịch thể ở điều kiện tối ưu đã tìm ra ở trên đối với hai chủng. Bã bia được xử lý trước khi phối trộn bằng cách phơi khô sau đó điều chỉnh về độ pH thích hợp cho mỗi chủng nấm rồi đem hấp ở nồi hấp áp lực ở 1atm trong 20 phút. Kết quả thử nghiệm phân hủy bã bia của hai chủng nấm mốc T01 và T42 được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5

Kết quả thử nghiệm khả năng phân giải một số hợp chất hữu cơ có trong bã bia của hai chủng nấm mốc T01 và T42

Mẫu Thành phần	Hàm lượng trong mẫu đối chứng (%)	Hàm lượng (%)	Hiệu suất phân giải (%)	Hàm lượng (%)	Hiệu suất phân giải (%)
		Phối trộn T01 (g/g bã bia) Tỷ lệ phối trộn: 1/50		Phối trộn T01 (g/g bã bia) Tỷ lệ phối trộn: 1/100	
Tinh bột	14,70 ± 0,30	14,56 ± 0,69	0,95	14,59 ± 0,85	0,74
Protein	6,11 ± 0,03	5,95 ± 0,03	2,62	5,25 ± 0,05	14,10
Cellulose	19,43 ± 0,59	18,53 ± 0,08	4,63	18,90 ± 0,15	2,72
		Phối trộn T42 (g/g bã bia) Tỷ lệ phối trộn: 1/50		Phối trộn T42 (g/g bã bia) Tỷ lệ phối trộn: 1/100	
Tinh bột	14,70 ± 0,30	14,54 ± 0,95	1,09	14,57 ± 0,84	0,88
Protein	6,11 ± 0,03	5,14 ± 0,02	15,8	5,49 ± 0,02	10,15
Cellulose	19,43 ± 0,59	18,85 ± 0,05	2,99	18,93 ± 0,68	2,57

Kết quả thu được ở bảng 5 cho thấy cả 2 chủng T01 và T42 đều có khả năng phân giải một số chất hữu cơ có trong bã bia ở các mức độ khác nhau. Hiệu suất phân giải protein có trong bã bia của chủng T42 mạnh hơn chủng T01 ở tỷ lệ phối trộn 1/50, nhưng ở tỷ lệ phối trộn 1/100 thì hoạt tính phân giải protein của chủng T01 lại lớn hơn chủng T42. Nguyên nhân có thể là do ở tỷ lệ phối trộn này hàm lượng protein có trong bã bia thích hợp cho sự tổng hợp enzyme protease ở chủng T01 hơn so với chủng T42. Ở tỷ lệ phối trộn 1/50 hiệu suất phân giải protein của chủng T42 đạt 15,8 %. Đối với hiệu suất phân giải cellulose thì chủng T01 lại mạnh hơn chủng T42 ở cả hai tỷ lệ phối trộn. Ở tỷ lệ phối trộn 1/50 hiệu suất phân giải cellulose của chủng T01 đạt 4,63 %, còn ở tỷ lệ phối trộn 1/100 hiệu suất phân giải cellulose của chủng T01 chỉ đạt 2,72 %. Khả năng phân giải cellulose ở trong bã bia của hai chủng này không khác nhau nhiều. Nguyên nhân là do cả hai chủng này đều là những chủng đã được phân lập và tuyển chọn cho mục đích phân giải cellulose, nên đây là những chủng khá mạnh và có hoạt tính cellulase tương đương nhau.

Hiệu suất phân giải tinh bột của cả hai chủng đều thấp hơn so với hiệu suất phân giải protein và cellulose. Điều này là dễ hiểu bởi ngay những nghiên cứu ban đầu của chúng tôi đều cho thấy những chủng nấm mốc mà chúng tôi nghiên cứu là những chủng có hoạt tính amylase không lớn. Trong 2 chủng thì chủng T42 phân giải tinh bột mạnh hơn so với chủng T01 nhưng không nhiều. Ở tỷ lệ phối trộn 1/50 hiệu suất phân giải tinh bột của chủng T42 đạt 1,09 %, còn ở tỷ lệ phối trộn 1/100 hiệu suất phân giải tinh bột của T42 đạt 0,88 % so với đối chứng.

III. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu ở trên chúng tôi rút ra một số kết luận như sau: Bốn chủng nấm mốc T01, T16, T28, T42 có hoạt tính protease và cellulase trội hơn so với hoạt tính amylase. Nuôi cấy chủng T42 trong môi trường Czapeck, bổ sung tinh bột, cao thịt, pH 6,5 và thời gian nuôi cấy lactic 72 giờ chủng T42 có hoạt tính protease mạnh nhất. Nuôi cấy chủng T01 trong môi trường Czapeck dịch thể, bổ sung CMC, urea, pH 7 và thời gian nuôi cấy lactic là 72 giờ thì chủng T01 có hoạt tính cellulase mạnh nhất. Thử nghiệm khả năng phân hủy bã bia của 2 chủng T01 và T42 cho kết quả: hiệu suất phân giải protein và cellulose lớn hơn so với hiệu suất phân giải tinh bột. Hiệu suất phân giải tinh bột của chủng T42 ở tỷ lệ phối trộn 1/50 đạt 1,09 %, hiệu suất phân giải protein của chủng T42 ở tỷ lệ phối trộn 1/50 là 15,8% và hiệu suất phân giải cellulose của chủng T01 ở tỷ lệ phối trộn 1/50 là 4,63 %.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đoàn Văn Chung, Phạm Văn Luyện, Trần Thúc Sơn, Nguyễn Văn Sứ, Trần Thị Tâm**, 1998: Sổ tay phân tích đất, nước, phân bón, cây trồng, NXB. Nông nghiệp, Hà Nội.
2. **Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Huyền, Phạm Văn Ty**, 1987: Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, NXB. KH&KT, Hà Nội, tập 3.
3. **Nguyễn Lâm Dũng**, 2002: Vi sinh vật học, NXB. Giáo dục, Hà Nội.
4. **Nguyễn Văn Mùi**, 2001: Thực hành hoá sinh, NXB. KH&KT, Hà Nội.

STUDY ON THE CAPACITY OF SUBDIVIDING THE ORGANIC COMPOUNDS AND OF DECOMPOSING BEER RESIDUE OF FOUR YEAST STRAINS OF *TRICHODERMA*

NGUYEN THI THU THUY, HOANG THI KIM HONG

SUMMARY

Residue beer is a waste product of beer industry and up to now it has been used as animal food. However, in some cases if the beer residue is not timely consumed, it can decomposed, causing the environmental pollution. Therefore, it is necessary to apply the new methods to decompose the excessive beer residue for protecting the environment. In this paper, we report the obtained results from the study on the capacity of subdividing the organic compounds and evaluate the decomposition of beer residue with four years strains of *Trichoderma*. The purpose of this study is to determine the capacity of subdividing the organic compounds in beer residue such as starch, protein, cellulose and try to evaluate the decomposition of beer residue by using four years strains of *Trichoderma*. We will further study the application of beer residue which is treated using four years strains of *Trichoderma* as fertilizer for crops or as biological pesticide.