

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN PHÂN GIẢI CELLULOSE VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ PHỤ PHẨM CÂY CHUỐI

Vũ Quỳnh Hương*, Nguyễn Vĩnh Hoàng, Nguyễn Thị Huyền

Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: vqhuong@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 26.12.2023

Ngày chấp nhận đăng: 24.02.2025

TÓM TẮT

Ở Việt Nam, chuối chiếm 19% tổng diện tích cây ăn quả, cho sản lượng khoảng 1,4 triệu tấn, nhưng chỉ sử dụng được khoảng 12% khối lượng, 88% còn lại là chất thải rắn. Mục đích của nghiên cứu là phân lập và tuyển chọn được chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose, thành phần chính của chất thải rắn và bước đầu ứng dụng trong xử lý phụ phẩm cây chuối. Kết quả phân lập được vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose mạnh là chủng *Bacillus megaterium* H3 từ 12 mẫu đất và rác thải cây chuối, đồng thời lựa chọn được môi trường và điều kiện nuôi cấy vi khuẩn phù hợp để sinh enzyme cellulase hoạt lực cao. Vi khuẩn *Bacillus megaterium* H3 sinh enzyme tốt nhất ở trong môi trường có nguồn carbon là CMC, nguồn nitơ là NH_4Cl . Điều kiện nuôi cấy thích hợp cho vi khuẩn *B. megaterium* H3 sinh enzyme cellulase hoạt tính cao ở nhiệt độ 30°C, thời gian 16h, tốc độ lắc 200 vòng/phút, pH ban đầu 7,0. Phụ phẩm thân chuối bổ sung vi khuẩn *B. megaterium* H3 giúp phân giải cellulose tốt hơn 32,28% so với mẫu đối chứng. Kết quả của nghiên cứu sẽ làm tiền đề cho các nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học xử lý phụ phẩm từ cây chuối.

Từ khóa: Cây chuối, cellulose, cellulase, *Bacillus megaterium*.

Isolation and Selection of Cellulose Degrading Bacteria and Preliminary Application in Banana by-Product Treatment

ABSTRACT

In Vietnam, bananas occupy 19% of the total fruit cultivation area, yielding around 1.4 million tons but only 12% of the volume are utilized, the remaining 88% constitute organic waste. This research aimed to identify and select bacteria capable of breaking down cellulose to treating banana by-products. The *Bacillus megaterium* H3 strain from 12 soil and banana waste samples was isolated. Optimal conditions were determined for cultivating this bacterium to produce enzymes efficiently. The high-potency cellulase-producing *Bacillus megaterium* H3 bacteria was found to thrive in a medium with a CMC carbon source and NH_4Cl nitrogen source. The most suitable culture conditions for this bacterium were at a temperature of 30°C, over a period of 16 hours, with a shaking speed of 200rpm, and an initial pH of 7. Additionally, supplementing banana stem waste with *B. megaterium* H3 facilitated 32.28% more efficient cellulose decomposition compared to the control sample. These findings serve as basis for the development of organic fertilizer.

Keywords: *Musa sapientum*, cellulose, cellulase, *Bacillus megaterium*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây chuối (*Musa sapientum*) là loại cây ăn quả được trồng ở 150 quốc gia trên thế giới với diện tích 4,84 triệu hecta, cung cấp 97,5 triệu tấn quả/năm, chiếm xấp xỉ 44% sản lượng trái cây tươi (Đào Thị Thùy Dương & cs., 2022). Tại

Việt Nam, chuối chiếm 19% tổng diện tích cây ăn quả, cho sản lượng khoảng 1,4 triệu tấn/năm. Việt Nam có khoảng 200.000ha chuối, chủ yếu được trồng ở quy mô trang trại (Thanh Tâm, 2021). Với đặc tính chỉ đậu quả một lần, sau khi thu hoạch, thân cây bị chặt bỏ, tạo ra một lượng chất thải rắn vô cùng lớn. Theo Gilbert (2019),

mỗi cây chuối, người ta chỉ sử dụng khoảng 12% khối lượng, 88% còn lại chất thải rắn bao gồm thân, lá, củ chuối và những quả hỏng. Như vậy, lượng chất thải rắn từ cây thân cây chuối bị bỏ lại lên tới 10,3 triệu tấn mỗi năm, đây là con số đáng báo động vì lượng rác này hầu như là không được xử lý hợp lý.

Phụ phẩm cây chuối chứa chủ yếu là cellulose (13,2%), là thành phần chính của thành tế bào thực vật, cùng với hemicellulose (14,8%) và lignin (14%) (Monsalve, 2006). Cellulose được cấu tạo từ đường D-glucose nhờ các liên kết β -1,4 glycoside, có cấu trúc mạch thẳng dạng sợi dài rất bền, khó bị phân hủy (Gupta & cs., 2012). Hiện nay, phụ phẩm từ cây chuối chủ yếu được tận dụng làm thực phẩm, thức ăn cho gia súc, gia cầm, hay sản xuất giấy, sợi dệt, làm đồ thủ công mỹ nghệ, cũng có thể được xử lý bằng cách ủ phân hữu cơ một cách tự nhiên, hoặc lên men kỵ khí để tạo biogas. Nhiều nhà khoa học gần đây sử dụng enzyme cellulase từ vi sinh vật để phân giải cellulose cho thấy nhiều ưu điểm hơn về mặt kỹ thuật, kinh tế cũng như môi trường. Thật vậy, thủy phân cellulose bằng enzyme có tính đặc hiệu cao và tạo ra hiệu suất glucose cao, chi phí sử dụng thấp hơn và quá trình thủy phân xảy ra trong điều kiện phản ứng nhẹ hơn phương pháp sử dụng kiềm hay axit (Khan & cs., 2016). Hệ vi sinh vật phân giải cellulose rất phong phú và đa dạng trong tự nhiên, bao gồm cả vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm. Theo tổng hợp của Nguyễn Xuân Thành & cs. (2003), vi khuẩn như *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Archomobacter*... được chỉ ra là có khả năng phân giải mạnh cellulose. Vi khuẩn thể hiện nhiều ưu thế trong quá trình phân giải chất hữu cơ của đồng ủ như phân giải các chất dinh dưỡng sớm hơn và nhanh hơn, chiếm mật độ nhiều nhất trong cả tầng đáy và bề mặt đồng ủ (Walke, 1975). Theo Haug (2018), trong quá trình ủ chất hữu cơ, khi nhiệt độ trong đồng ủ ở mức dưới 40°C thì số lượng vi khuẩn ưa ấm chiếm 10^8 CFU/g, nhiều hơn 100 đến 10.000 lần so với số lượng xạ khuẩn và nấm, khi nhiệt độ đồng ủ đạt 40-70°C thì số lượng vi khuẩn ưa nóng là 10^9 CFU/g, trong khi xạ khuẩn và nấm ưa nhiệt lần lượt là 10^7 và

10^2 CFU/g. Chính vì thế, mà việc tuyển chọn vi khuẩn để đẩy nhanh quá trình phân giải phụ phẩm thân chuối là rất cần thiết.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose từ rơm rạ, mùn cưa (Nguyễn Thị Thu Thủy & cs., 2018), chất thải nhà máy giấy (Vũ Thị Dinh & cs., 2018), phụ phẩm sau thu hoạch quả vải (Đinh Hồng Duyên & cs., 2017), nhưng chưa có nghiên cứu công bố về việc xử lý cho phụ phẩm của cây chuối. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính cellulase cao để bước đầu thử nghiệm phân giải phụ phẩm từ cây chuối, góp phần đa dạng hoá nguồn vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose và tạo nguồn giống để sản xuất chế phẩm sinh học xử lý phụ phẩm cây chuối nói riêng và nông nghiệp nói chung.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mười hai mẫu đất và phụ phẩm cây chuối hoại mục tự nhiên tại huyện Gia Lâm và Phú Xuyên, Hà Nội được thu thập để phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose.

Các môi trường sử dụng bao gồm: môi trường Hans (thành phần (g/l): K_2HPO_4 0,5; KH_2PO_4 0,5; $(NH_4)_2SO_4$ 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1; $CaCl_2$ 0,1; NaCl 6,0; Cao nấm men 0,1; CMC 10; Agar 12); môi trường CMC (Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt) (thành phần (g/l): peptone 0,2; $NaNO_3$ 2; KCl 0,5; K_2HPO_4 1; $MgSO_4$ 0,5; CMC 10).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Bố trí thí nghiệm xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp để vi khuẩn tuyển chọn sinh enzyme cellulase hoạt tính cao

Để tìm được điều kiện nuôi cấy thích hợp nhất cho vi khuẩn tạo enzyme cellulase hoạt tính cao, các yếu tố ảnh hưởng bao gồm nguồn carbon, nitơ, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy, pH ban đầu và tốc độ lắc được nghiên cứu.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon: Chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi lắc ở tốc độ 180 vòng/phút, nhiệt độ 30°C, trong 24h, pH 7 trong các môi trường có nguồn carbon gồm CMC (10 g/l), cám gạo (10 g/l), CMC (5 g/l) + cám gạo (5 g/l), sau đó thu dịch để xác định hoạt tính cellulase.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitơ: Chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi lắc ở tốc độ 180 vòng/phút, nhiệt độ 30°C, trong 24h, pH 7,0 trong các môi trường chứa nguồn nitơ gồm NH_4Cl , NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 (nồng độ 5 g/l), sau đó thu dịch để xác định hoạt tính cellulase.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy: Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường thích hợp đã lựa chọn, lắc ở 180 vòng/phút, pH 7,0 trong dải nhiệt độ từ 25°C, 30°C, 35°C, 40°C. Dịch nuôi cấy được thu nhận sau 24h để định lượng hoạt tính cellulase.

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy: Vi khuẩn sẽ được nuôi cấy trong môi trường thích hợp ở nhiệt độ đã lựa chọn, lắc ở 180 vòng/phút, pH 7. Sau các thời gian 12h, 16h, 20h, 24h, xác định hoạt tính cellulase.

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH ban đầu: Vi khuẩn sẽ được nuôi cấy trong môi trường thích hợp ở nhiệt độ, thời gian và tốc độ lắc đã lựa chọn, ở pH ban đầu từ 6,5-8,0, bước nhảy 0,5, sau đó xác định hoạt tính cellulase.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ lắc: Vi khuẩn sẽ được nuôi cấy trong môi trường thích hợp ở nhiệt độ và thời gian đã lựa chọn, pH 7,0, ở các tốc độ lắc 150, 180, 200, 250 vòng/phút, sau đó xác định hoạt tính cellulase.

Bố trí thí nghiệm đánh giá khả năng phân giải phụ phẩm cây chuối

Chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trong môi trường CMC ở các điều kiện nuôi cấy phù hợp đã nghiên cứu, đến khi mật độ vi khuẩn đạt khoảng 10^7 CFU/ml thì tiến hành thu dịch. Nguyên liệu thân chuối tiêu sau thu hoạch được thái nhỏ, chia thành 2 công thức, 3 lần lặp.

Công thức đối chứng (ĐC): 4.500g nguyên liệu;

Công thức thí nghiệm (TN): 4500g nguyên liệu + 225ml dịch vi khuẩn tuyển chọn.

Các công thức được cho vào các thùng ủ kín, không có hệ thống thu nước rỉ, có kích thước 20 × 30cm, nén chặt, đậy kín nắp. Thời gian ủ 30 ngày, cách 7 ngày đảo trộn 1 lần. Sau thời gian ủ, đánh giá sự khác nhau về khối lượng, hàm lượng chất khô, lượng cellulose.

2.2.2. Phương pháp phân tích

Phân lập các chủng vi khuẩn phân giải cellulose

Mỗi mẫu lấy 10g cho vào bình tam giác chứa 90ml nước cất đã vô trùng, lắc đều, sau đó tiến hành dãy pha loãng mẫu đến nồng độ 10^{-5} . Hút 0,1ml dung dịch đã pha loãng ở hai nồng độ pha loãng cuối vào đĩa thạch chứa môi trường môi trường Hans, sau đó nuôi ủ mẫu ở 30°C trong 48h. Sau thời gian nuôi cấy, chọn các khuẩn lạc mọc riêng lẻ trên các đĩa cấy và tiến hành làm thuần (Nguyễn Lâm Dũng & cs., 2009).

Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose

Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose cao theo phương pháp đục lỗ thạch được mô tả bởi Vũ Thị Dinh & cs. (2018). Cụ thể, vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường lỏng NB bổ sung thêm CMC 1%, nuôi cấy 48h ở 30°C. Ly tâm dịch nuôi cấy ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch chiết chứa enzyme ngoại bào là lớp nước trong phía trên. Hút 100μl dịch trong thu được của mỗi chủng cho vào từng lỗ thạch có đường kính 8mm đã được tạo bằng que đục lỗ thạch vô trùng trên môi trường CMC. Sau 24h, tiến hành nhỏ thuốc nhuộm Lugol để quan sát vòng phân giải cơ chất. Khả năng phân giải cellulose được đánh giá bằng độ lớn của vòng phân giải.

$$A = D - d$$

Trong đó: A: Khả năng phân giải (mm), D: đường kính vòng phân giải (mm), d: đường kính lỗ thạch (mm).

Xác định hoạt tính cellulase

Hoạt tính cellulase được xác định dựa vào lượng đường khử tạo thành sau phản ứng. Phương pháp định lượng đường khử dựa trên cơ sở cho đường khử (sản phẩm thủy phân của cellulose) phản ứng với thuốc thử DNS có màu

vàng ở 55°C trong 5 phút tạo thành 3-amino, 5-nitro salicylic acid có màu đỏ cam và hấp thụ cực đại ở bước sóng 540nm (Miller, 1959).

Đơn vị hoạt tính (UI) của cellulase được xác định là lượng enzyme cần thiết để xúc tác cho phản ứng phân giải cellulose tạo thành 1μmol đường khử mỗi ml mỗi phút (Gupta & cs., 2012).

Định danh chủng vi khuẩn tuyển chọn bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF

Phương pháp định danh vi khuẩn bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF được tiến hành tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ sinh học Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Danh sách các loài phù hợp nhất được phân loại theo độ tương đồng của dấu vân protein, kèm theo giá trị cho biết mức độ xác định loài hoặc chi vi sinh vật. Mức độ tin cậy cao, thấp hay không xác định được của vi sinh vật được biểu thị lần lượt bằng các màu xanh, vàng và đỏ.

Xác định hàm lượng chất khô

Mẫu chuối được sấy khô đến khối lượng không đổi, sau đó cân và tính theo công thức: $X = (m_1/m) \times 100$ (FAO, 1986)

Trong đó: X: hàm lượng chất khô (%), m: khối lượng mẫu ban đầu trước khi sấy (g), m_1 : khối lượng mẫu sau khi sấy (g).

Xác định hàm lượng cellulose

Mẫu chuối sau khi sấy khô được cân và cắt thành đoạn 1-2cm, rồi dùng dung dịch NaOH 5%, đun sôi trong 1h (lượng dung dịch cho vào tính theo tỷ lệ mẫu/NaOH = 1/20 (g/ml)) để hòa tan hemicellulose, lignin, pectin, sắc tố, các tạp chất chứa trong mẫu, đồng thời làm trương cellulose và giảm liên kết của cellulose. Sau đó, rửa bã nhiều lần với nước cất rồi tiếp tục đun sôi với HCl 20% theo tỷ lệ mẫu/HCl = 1/20 (g/ml). Lọc rửa bã nhiều lần với nước cất. Tiến hành sấy bã ở 105°C đến khối lượng không đổi và cân lượng cellulose còn lại (Nguyễn Việt Hưng, 2019).

Xác định hiệu quả phân giải cellulose

Chênh lệch giữa hai công thức đối chứng (ĐC) và thí nghiệm (TN) về hiệu quả phân giải cellulose được tính bằng $(m_1 - m_2)/m_0 \times 100$ (%). Trong đó, m_0 : khối lượng cellulose trước ủ (g),

m_1 : khối lượng cellulose sau ủ (ĐC) (g), m_2 : khối lượng cellulose sau ủ (TN) (g).

Xử lý số liệu

Kết quả nghiên cứu được phân tích sự khác biệt trung bình bằng phân tích thống kê one-way ANOVA trên phần mềm SAS 9.1, kiểm định sự sai khác trung bình theo Waller-Duncan với mức ý nghĩa $P < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn phân giải cellulose

Tổng số 29 khuẩn lạc đã được phân lập từ các nguồn đất trồng chuối, rác thải, mùn mục từ cây chuối. Các khuẩn lạc có dạng hình tròn, bóng, lồi, màu trắng đục, hoặc trắng sữa. Kích thước của các khuẩn lạc không đồng đều, đường kính dao động khoảng từ 2-8mm. Về đặc điểm hình thái tế bào, các chủng có hình cầu hoặc hình que, sắp xếp theo chuỗi hoặc xếp rời. Các chủng phân lập được bao gồm cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm (kết quả không hiển thị).

Kết quả 16 chủng có khả năng phân giải cellulose được trình bày trong bảng 1. Kết quả cho thấy phần lớn các chủng vi khuẩn phân lập được có hoạt tính carboxymethyl cellulase, kích thước vòng phân giải dao động từ 8-29mm. Theo Đỗ Năng Vịnh & cs. (2020), các chủng vi khuẩn phân lập từ bã mía có khả năng phân giải cellulose có đường kính dao động từ 8-30mm. Kết quả Bảng 1 cho thấy chủng H3 có khả năng phân giải cellulose cao nhất, được định danh bằng khối phổ MALDI-TOF, kết quả được trình bày trong bảng 2.

Kết quả khối phổ vi sinh vật cần xác định được so sánh với khối phổ trên ngân hàng IVD thông qua phần mềm MBT Compass IVD-Upgrade. Kết quả cho thấy vi khuẩn H3 được xác định là *Bacillus megaterium* với độ tin cậy cao.

B. megaterium là vi khuẩn hình que, Gram dương, hiếu khí (trích theo Vos & cs., 2011). *B. megaterium* là loại vi khuẩn phổ biến để sản xuất phân bón hữu cơ sinh học vì chúng phân giải tốt phân lân hữu cơ trong đất. Trong quá

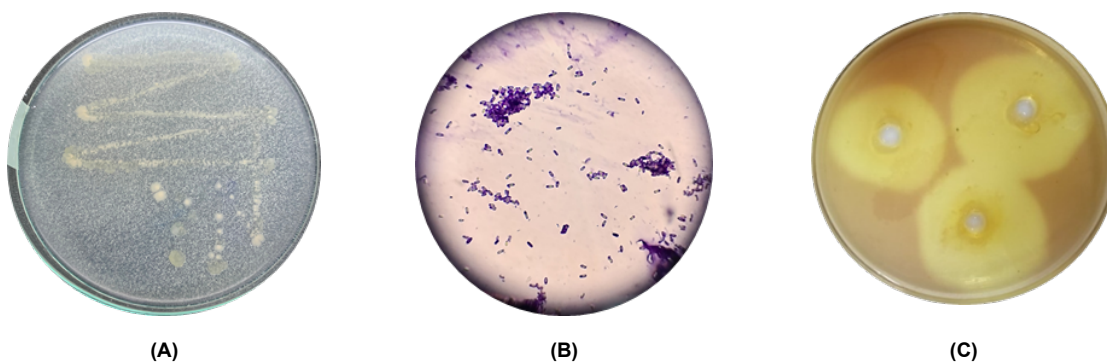
trình sinh trưởng, vi khuẩn này tạo ra nhiều acid hữu cơ có thể phân hủy hoặc hòa tan kali và phospho trong đất (Vary & cs., 2007). Chủng *B. megaterium* đã được Shakoor & cs. (2013) phân lập từ chợ rau tại Pakistan có khả năng

phân giải cellulose. Chủng *Bacillus megaterium* BM05 cũng được đánh giá khả năng sinh cellulase trong quá trình lên men chìm sử dụng rơm lúa mì làm chất nền trong nghiên cứu của Shahid & cs. (2016).

Bảng 1. Khả năng phân giải cellulose của các chủng nghiên cứu (Mean $\pm$ SD)

Chủng	Hình thái khuẩn lạc	Khả năng phân giải (A) (mm)	Đánh giá
C2	Khuẩn lạc tròn, màu vàng nhạt, bề mặt bóng nhẫy, đường kính 3mm	19,67 $\pm$ 0,88	Khá
C3	Khuẩn lạc tròn đều, màu trắng, phẳng, đường kính 4mm	14,67 $\pm$ 1,45	Trung bình
C4	Khuẩn lạc tròn, màu trắng, nhô cao ở giữa, bề mặt bóng, đường kính 3mm	9,33 $\pm$ 0,33	Yếu
C5	Khuẩn lạc tròn đều, màu trắng đục, có chấm trắng ở giữa hơi nhô, đường kính 3mm	22,33 $\pm$ 0,33	Mạnh
C6	Khuẩn lạc viền răng không đều nhau, màu trắng đục, bề mặt hơi nhô và bóng, đường kính 5mm	8,67 $\pm$ 0,67	Yếu
T1	Khuẩn lạc tròn, màu trắng, bề mặt phẳng, đường kính 3mm	20 $\pm$ 1,15	Khá
T2	Khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, bề mặt gồ ghề, đường kính 8mm	29 $\pm$ 0,67	Mạnh
T3	Khuẩn lạc tròn, màu nâu nhạt, bề mặt bóng, hơi nhô, đường kính 7mm	26,33 $\pm$ 0,67	Mạnh
H3	Khuẩn lạc tròn, viền không đều, màu hơi vàng đục, bề mặt bóng, đường kính 7mm	29,67 $\pm$ 0,67	Mạnh
H4	Khuẩn lạc tròn đều, màu trắng đục, không viền, đường kính 2mm.	20,67 $\pm$ 0,67	Mạnh
H9	Khuẩn lạc tròn, rìa bông tuyết, màu trắng đục, bề mặt nhăn nheo, đường kính 4mm.	10,33 $\pm$ 0,33	Trung bình
K1	Khuẩn lạc tròn đều, màu trắng đục, không có viền, bề mặt bóng, đường kính 1mm.	17,67 $\pm$ 0,67	Khá
K2	Khuẩn lạc tròn đều, màu trắng, không có viền, bề mặt lồi, đường kính 2mm	16,33 $\pm$ 0,33	Khá
K4	Khuẩn lạc tròn không đều, rìa rang cưa, màu trắng trong, bề mặt nhăn, đường kính 7mm	9,33 $\pm$ 0,33	Yếu

Ghi chú: $A \leq 10\text{mm}$: Khả năng phân giải cellulose yếu; $15\text{mm} \geq A > 10\text{mm}$: Khả năng phân giải cellulose trung bình; $20\text{mm} \geq A > 15\text{mm}$: Khả năng phân giải cellulose khá; $A > 20\text{mm}$: Khả năng phân giải cellulose mạnh.



Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc (A), tế bào (B) và hoạt tính carboxymethyl cellulase (C) của chủng H3

Bảng 2. Kết quả định danh bằng hệ thống khối phổ MALDI – TOF

Kí hiệu chủng	Loài được phát hiện	Màu sắc	Độ tin cậy
H3	<i>Bacillus megaterium</i>		Cao

3.2. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính enzyme cellulase của chủng *B. megaterium* H3

3.2.1. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng

Carbon là một nguồn cung cấp năng lượng và dinh dưỡng quan trọng không thể thiếu cho tế bào, trong khi đó, nitơ đóng vai trò thiết yếu trong quá trình chuyển hoá và trao đổi chất của vi sinh vật (Nguyễn Ngọc Ân, 2021). Nguồn nitơ dễ hấp thụ nhất đối với vi sinh vật là NH_3 và NH_4^+ , chúng xâm nhập vào tế bào dễ dàng và tạo thành nhóm amin. Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ đến hoạt tính enzyme cellulase được trình bày trong hình 2.

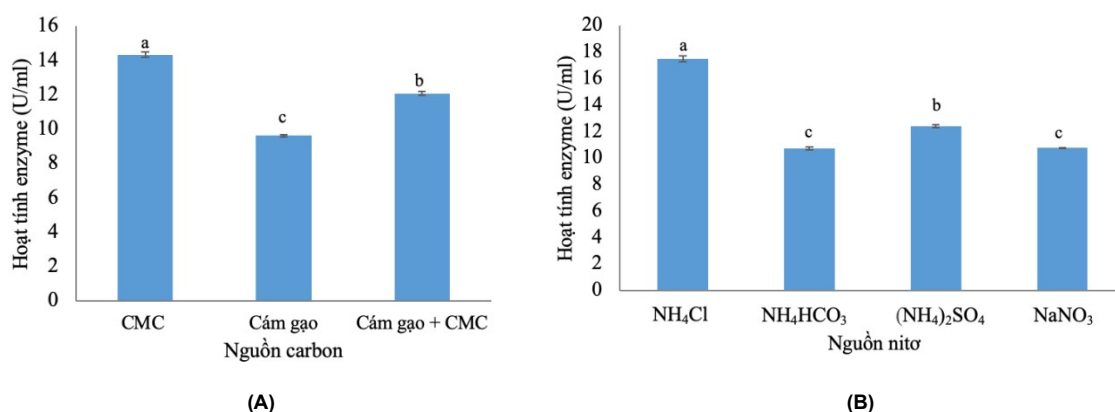
Kết quả từ hình 2A cho thấy, chủng H3 được nuôi cấy trong môi trường có nguồn carbon là CMC 10 g/l cho hoạt tính cellulase cao nhất, đạt $14,35 \pm 0,15$ U/ml. Mặc dù cám gạo là nguồn carbon tự nhiên với thành phần dinh dưỡng đa dạng gồm xơ, khoáng, acid béo không no, cũng là phế phẩm từ lúa gạo, giá thành rẻ, nhưng hoạt tính enzyme cellulase trong môi trường có nguồn carbon CMC cho hoạt tính cao hơn khoảng 1,5 lần cám gạo. Lý giải cho kết quả này, carbon chiếm khoảng 54% trong thành phần của CMC, trong khi đó thành phần carbon trong cám gạo chỉ chiếm 28%. Kết quả này cũng tương tự nghiên cứu khác với nguồn carbon là CMC, chủng vi khuẩn thuộc chi *Microbacterium* thể hiện hoạt tính cellulase tăng từ 2,04 đến 5,80 U/mg (Sadhu & cs., 2011).

Chủng vi khuẩn *B. megaterium* H3 sinh cellulase mạnh nhất với nguồn nitơ là NH_4Cl đạt $17,52 \pm 0,23$ U/ml. Giải thích cho kết quả này, nguồn nitơ là NH_4^+ trong hợp chất NH_4Cl là cao nhất (33,64%) so với các hợp chất còn lại. Kết quả nghiên cứu cao hơn kết quả của Trần Thị Hồng Nguyệt & Phan Duệ Thanh (2019) về ảnh hưởng của nitơ đến khả năng sinh cellulase của vi khuẩn *Cellulomonas*, đạt $5,18 \pm 0,42$ (U/ml).

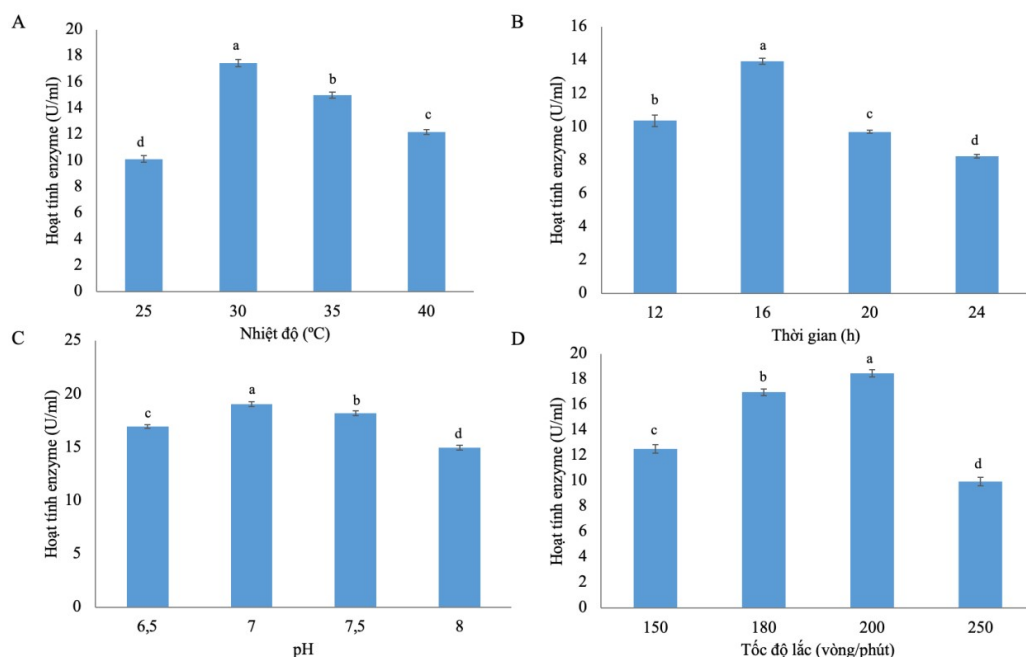
Chính vì vậy, nguồn carbon là CMC (10 g/l) và nguồn nitơ là NH_4Cl được lựa chọn cho môi trường nuôi cấy chủng *B. megaterium* H3.

3.2.2. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy

Nhiệt độ, thời gian, pH môi trường và tốc độ lắc nuôi cấy là các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển, khả năng sinh tổng hợp enzyme phân giải cơ chất của vi sinh vật. Thời gian nuôi cấy thích hợp sẽ đảm bảo enzyme được thu nhận đúng lúc và có lượng enzyme thu được cao nhất. Đồng thời tránh việc kéo dài thời gian nuôi cấy không cần thiết, gây lãng phí kinh tế và giảm hoạt tính của chế phẩm enzyme. Theo Bharucha & cs. (2013), điều kiện lắc ảnh hưởng đến tốc độ cung cấp oxy, giúp tăng lượng oxy hữu hiệu trong môi trường nuôi cấy, từ đó tác động đến hoạt động sinh tổng hợp enzyme của vi khuẩn. Hoạt tính cellulase của vi khuẩn *B. megaterium* H3 được khảo sát ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau, kết quả được thể hiện ở hình 3.



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn carbon (A) và nitơ (B) đến hoạt tính enzyme cellulase



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy (A), thời gian nuôi cấy (B), pH (C) và tốc độ lắc (D) đến hoạt tính enzyme cellulase

Qua hình 3, hoạt tính enzyme thu nhận được là cao nhất lần lượt ở các điều kiện nhiệt độ 30°C sau 16h nuôi cấy, pH 7 và tốc độ lắc 200 vòng/phút. Kết quả phân tích phương sai cho thấy hoạt tính enzyme ở các công thức khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Nhiệt độ 30°C cũng là nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn *Bacillus pumillus* ATCC7061 sinh tổng hợp cellulase trong nghiên cứu của Gomaa (2013). Nguyễn Thùy Dương (2012) đã nghiên cứu nhiệt độ 30°C là nhiệt độ tối ưu để chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* ĐM19.1. Một số nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng nhiệt độ 30°C là nhiệt độ tối ưu cho sinh enzyme hoạt tính cao với *Bacillus alcalophilus* (3,7 U/ml) và *Bacillus cereus* MRLB1 (51,87 U/mg) (Abou-Taleb & cs., 2009; Afzal & cs., 2012).

Thời gian nuôi cấy tối ưu vi khuẩn để thu enzyme tùy thuộc vào vi khuẩn cũng như môi trường nuôi cấy khác nhau (Nguyễn Thùy Dương, 2012). Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Ân (2021) đã lựa chọn 12h là thời gian tối ưu để chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 đạt mật độ tế bào cao nhất và khả năng hoạt động trao đổi chất tốt nhất.

pH 7 cũng được báo cáo là điều kiện tối ưu để nuôi cấy vi khuẩn chủng *B. cereus* CB8 được nghiên cứu bởi và Vimal & cs. (2016) với hoạt tính phân giải cellulase đạt 4,12 U/ml.

Vi khuẩn *B. megaterium* H3 là vi khuẩn hiếu khí nên cần oxy để tồn tại và phát triển. Lượng oxy cũng ảnh hưởng tới quá trình trao đổi chất và tích lũy các sản phẩm sinh tổng hợp của vi khuẩn. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Huang & cs. (2018) khi chọn điều kiện lắc tối ưu là 200 vòng/phút cho vi khuẩn *B. megaterium*. Vũ Thị Dinh & cs. (2018) đã nghiên cứu vi khuẩn *Bacillus subtilis* TD có hoạt tính cellulase cao và phát triển tốt nhất ở tốc độ lắc 150 vòng/phút. Điều đó có nghĩa nhu cầu đối với oxy của mỗi chủng vi khuẩn là khác nhau.

3.3. Kết quả khảo sát khả năng phân giải phụ phẩm chuối của vi khuẩn *B. megaterium* H3

Khảo sát khả năng phân giải phụ phẩm chuối của vi khuẩn *B. megaterium* H3 bằng cách ủ hỗn hợp thân chuối với vi khuẩn ở điều kiện tự nhiên. Kết quả thí nghiệm sau 30 ngày ủ được thể hiện ở bảng 3 và bảng 4.

Sau 30 ngày ủ, hiệu quả giảm khối lượng ở mẫu chuối ủ bổ sung vi khuẩn giảm 10,21% so với mẫu đối chứng. Kết quả này cũng tương thích với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Thủy & cs. (2018), khối lượng tươi của mẫu rơm rạ khi ủ với chủng 6NH1 giảm 12,4% so với đối chứng. Tỷ lệ vật chất khô giảm sau quá trình xử lý rơm rạ thể hiện hiệu quả phân giải cellulose của chủng 6NH1. Tương tự như vậy, tỷ lệ hợp chất khô của mẫu thân chuối ủ bổ sung vi sinh giảm so với mẫu đối chứng. Như vậy, chủng vi khuẩn bổ sung vào đồng ủ đã thúc đẩy quá trình phân hủy chất hữu cơ diễn ra nhanh hơn, mạnh hơn.

Ở bảng 4, khối lượng cellulose giữa mẫu ủ có bổ sung vi khuẩn *B. megaterium* H3 giảm 32,28% so với đối chứng. Nguyễn Thị Thu Thủy & cs. (2018) đã nghiên cứu mẫu ủ bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* giảm so với mẫu đối chứng là 49,6%, còn mẫu ủ phế phụ phẩm nông nghiệp bổ sung *B. amyloliquefaciens* và *Streptomyces olivochromogene* có lượng cellulose giảm so với đối chứng là 55,87%. Ngoài ra, có thể làm tăng hiệu quả ủ bằng cách tạo hỗn hợp vi khuẩn với một số chất mang khác, hay điều chỉnh độ ẩm đồng ủ.

Bảng 3. Khối lượng tươi và hàm lượng chất khô của nguyên liệu trước và sau ủ (Mean $\pm$ SD)

Công thức	Khối lượng nguyên liệu ủ (g)			Hàm lượng chất khô (%)		
	Trước ủ	Sau ủ	Giảm so với ĐC (%)	Trước ủ	Sau ủ	Giảm so với ĐC (%)
ĐC	4500	3955,33 $\pm$ 2,91	-	8,90 $\pm$ 0,08	4,85 $\pm$ 0,00	-
TN	4500	3495,67 $\pm$ 2,60	10,21	8,90 $\pm$ 0,08	4,01 $\pm$ 0,00	9,46

Ghi chú: “-”: Không áp dụng.

Bảng 4. Khả năng phân giải cellulose của chủng *B. megaterium* H3 (Mean $\pm$ SD)

Công thức ủ	Khối lượng cellulose (g)			Trạng thái nguyên liệu sau ủ
	Trước ủ	Sau ủ	Giảm so với ĐC (%)	
ĐC	55,49 $\pm$ 1,23	49,69 $\pm$ 1,05	-	Nâu đen, cứng, chưa hoại
TN	55,49 $\pm$ 1,23	31,78 $\pm$ 0,78	32,28	Đen, hoại mục, mềm

Ghi chú: “-”: Không áp dụng.



(ĐC)



(TN)

Hình 4. Mẫu chuối ủ đối chứng (ĐC) và mẫu ủ bổ sung *B. megaterium* H3 (TN)

Trong quá trình ủ, do ủ trong thùng kín nên nước ủ từ phụ phẩm cây chuối vẫn giữ trong thùng ủ. Trạng thái mẫu chuối sau ủ có sự khác biệt rõ rệt. Ở công thức đối chứng, mẫu chuối ủ có màu nâu đen, cứng, chưa hoại mục. Còn ở công thức ủ *B. megaterium* H3, mẫu chuối màu đen, hình dạng bị biến đổi, mềm xốp, mủn, bị hoại mục rõ rệt, mùi thối. Sự thay đổi đó là do sự chuyển hóa các hợp chất hữu cơ nhờ hoạt động sống của vi sinh vật và các phản ứng xảy ra trong quá trình ủ. Tuy nhiên, thí nghiệm này mới chỉ là nghiên cứu bước đầu, để tăng hiệu quả phân giải, có thể trộn thêm các nguyên liệu hữu cơ khác, kiểm soát độ ẩm và nhiệt độ thích hợp, hay bổ sung hệ thống thu nước rỉ, tận dụng nguồn nước này để làm phân bón.

4. KẾT LUẬN

Tổng số 29 khuẩn lạc đã được phân lập từ 12 mẫu đất và phụ phẩm cây chuối. Các vi khuẩn này tiếp tục được tuyển chọn dựa trên khả năng tạo vòng phân giải cellulose. Từ 16 chủng tuyển chọn, chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* H3 được xác định là có khả năng phân giải cellulose mạnh nhất.

Chủng *Bacillus megaterium* H3 sinh enzyme cellulase hoạt lực cao nhất trong môi trường có nguồn carbon là CMC, nguồn nitơ là NH_4Cl , điều kiện nuôi cấy thích hợp nhất là nhiệt độ 30°C , thời gian 16h, tốc độ lắc 200 vòng/phút, pH ban đầu 7,0.

Việc bổ sung vi khuẩn *B. megaterium* H3 vào mẫu ủ thân chuối đã thể hiện hiệu quả trong việc phân giải cellulose của rác thải thân chuối sau 30 ngày ủ trong điều kiện thí nghiệm. Tuy nhiên, đây mới chỉ là kết quả bước đầu, cần tiếp tục nghiên cứu các loại giá thể phù hợp cho việc sản xuất chế phẩm vi sinh vật phân giải cellulose từ phụ phẩm cây chuối.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ tài chính của Học viện Nông nghiệp Việt Nam cho đề tài “Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose để xử lý phế phụ phẩm từ cây chuối” mã số T2023-08-33.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abou-Taleb K.A., Mashhoor W.A., Nasr S.A., Sharaf M.S. & Abdel-Azeem H.H. (2009). Nutritional and environmental factors affecting cellulase production by two strains of cellulolytic *Bacilli*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3(3): 2429-2436.
- Afzal I., Shah A.A., Makhdam Z., Hameed A. & Hasan F. (2012). Isolation and characterization of cellulase producing *Bacillus cereus* MRLB1 from soil. Minerva Biotechnologica. 24(3): 101.
- Bharucha U., Patel K. & Trivedi (2013). Optimization of Indole acetic and production bt *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on Mustard. Agricultural Research. 2(3): 215-221.
- Đinh Hồng Duyên, Nguyễn Thế Bình & Vũ Thanh Hải (2017). Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy phế phụ phẩm sau thu hoạch quả vải. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 53(B): 61-70.
- Đào Thị Thùy Dương, Chu Thị Lưu, Đỗ Thị Thắm, Trần Thị Bích Hương & Vũ Văn Hùng (2022). Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến sinh trưởng phát triển và năng suất Chuối nuôi cấy mô (*Musa accuminata* L.) tại huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp. 3.
- Đỗ Năng Vịnh, Lê Như Kiều, Lê Thị Thanh Thủy, Hà Thị Thủy, Mai Đức Chung, Nguyễn Văn Toàn, Mai Thị Vân Khánh, Lê Trung Hiếu & Nguyễn Thành Đức (2020). Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose để xử lý bã bùn mía. Tạp chí khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam. 1(110): 78-84.
- FAO (1986). Determination of moisture content. FAO food and nutrition paper. 14(7): 205.
- Gilbert L. (2019). Packaging made from banana plants an a-peeling alternative. UNSW Sydney. Retrieved from <https://www.unsw.edu.au/newsroom/news/2019/11/packaging-made-from-banana-plants-an-a-peeling-alternative> on Oct 26, 2022.
- Gomaa E.Z. (2013). Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumillus* grown on Ficus nitida wastes. Brazilian Journal of Microbiology. 44: 529-537.
- Gupta P., Samant K. & Sahu A. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. International journal of microbiology. 2012. doi:10.1155/2012/578925.
- Haug R. (2018). The practical handbook of compost engineering. Routledge.
- Huang J., Zhang D., Ou Y., Zhang G., Zheng L., Lin L., Ye X., Zhu X. & Pan, Y. (2018). Optimization

- of cultural conditions for *Bacillus megaterium* cultured in *Agaricus bisporus* industrial wastewater. *BioMed Research International*. 2018.
- Khan M.N., Luna I.Z., Islam M.M., Sharmeen S., Salem K.S., Rashid T.U., Zaman A., Haque P. & Rahman M. M. (2016). Cellulase in waste management applications. In Gupta V. G. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Microbial cellulase system properties and applications. Elsevier. 237-256.
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 538-542.
- Monsalve J.F., Medina de Perez V.I. & Ruiz Colorado A.A. (2006). Ethanol production of banana shell and cassava starch. *Dyna*. 73(150): 21-27.
- Nguyễn Ngọc Ân, Nguyễn Lê Hiền Hòa, Trần Nguyễn Diễm Linh, Bùi Thị Luyến, Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Thị Diệu Hạnh & Phạm Tấn Việt (2021). Khảo sát các điều kiện sinh tổng hợp cellulase từ *Bacillus amyloliquefaciens* D19. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường Đại học Công nghiệp TP.HCM*. 49(01).
- Nguyễn Lâm Dũng, Ngô Đình Quyết & Phạm Văn Ty (2009). *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội.
- Nguyễn Thủy Dương (2012). Nghiên cứu sự tổng hợp cảm ứng cellulase ở một số chủng *Bacillus* phân lập từ đất vườn. Luận văn thạc sĩ sinh học. Trường Đại học Sư phạm TP. Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Việt Hưng (2019). Nghiên cứu tách lignin và xenlulozo từ rơm rạ bằng phương pháp axit và kiểm dưới sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Luận văn thạc sĩ khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội.
- Nguyễn Xuân Thành, Lê Văn Hưng & Phạm Văn Toàn (2003). *Giáo trình công nghệ vi sinh vật trong nông nghiệp và xử lý ô nhiễm môi trường*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- Nguyễn Thị Thu Thủy, Trần Thị Xuân Phương, Cao Thị Dung, Lê Thị Hương Xuân & Trương Thị Hồng Hải (2017). Phân lập, tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose và bước đầu ứng dụng trong xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp làm phân hữu cơ vi sinh. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp*. 1(1).
- Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Tiến Long & Trần Thanh Đức (2018). Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose để sản xuất phân hữu cơ vi sinh. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 127(30): 117-127.
- Sadhu S., Saha P., Mayilraj S. & Maiti T. K. (2011). Lactose-enhanced cellulase production by *Microbacterium* sp. isolated from fecal matter of zebra (*Equus zebra*). *Current microbiology*. 62: 1050-1055.
- Shahid Z.H., Irfan M., Nadeem M., Syed Q. & Qazi J.I. (2016). Production, purification, and characterization of carboxymethyl cellulase from novel strain *Bacillus megaterium*. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 35(6): 1741-1749.
- Shakoor S., Aftab S. & Rehman A. (2013). Characterization of cellulose degrading bacterium, *Bacillus megaterium* S3, isolated from indigenous environment. *Pakistan Journal of Zoology*. 45(6): 1655-1662.
- Thanh Tâm (2021). Cây chuối có thể mang về tỷ USD, nếu tận dụng tốt mọi phần. *Tạp chí Kinh tế nông thôn*.
- Trần Thị Hồng Nguyệt & Phan Duệ Thanh (2019). Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện cấy đến khả năng sinh cellulase của 2 chủng vi khuẩn phân lập từ đất trồng và bông thải trồng nấm rơm. *Tạp chí khoa học tự nhiên*. 64(10A): 120-127.
- Vary P.S., Biedendieck R., Fuerch T., Meinhardt F., Rohde M., Deckwer W.D. & Jahn D. (2007). *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied microbiology and biotechnology*. 76: 957-967.
- Vimal J., Venu A. & Joseph J. (2016). Isolation and identification of cellulose degrading bacteria and optimization of the cellulase production. *International Journal of Research in Biosciences*. 5(3): 58-67.
- Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. & Whitman W.B. (Eds.) (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media.
- Vũ Thị Dinh, Phan Thị Thu Nga, Hoàng Trung Doãn & Trần Liên Hà (2018). Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu nhiệt độ cao, thích nghi dải pH rộng, có hoạt tính cellulase cao và bước đầu ứng dụng xử lý nước thải nhà máy giấy. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*. 1.
- Walke R.H. (1975). *The preparation, characterization and agricultural use of bark-sewage compost*. University of New Hampshire.