

ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM CHỦNG VI KHUẨN TIỀM NĂNG PHÂN GIẢI CELLULOSE PHÂN LẬP TỪ PHỤ PHẨM CHẾ BIẾN GỖ

Đặng Thị Thanh Tâm, Trần Thị Yến, Nguyễn Thanh Huyền *

Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: thanhhuyen@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 31.02.2023

Ngày chấp nhận đăng: 04.08.2023

TÓM TẮT

Cellulase là enzyme được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như nông nghiệp, công nghiệp và y học. Trong số các loài vi sinh vật thì vi khuẩn được đánh giá có khả năng tổng hợp cellulase với hoạt tính cao, ổn định và hạn chế gây ô nhiễm môi trường. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và xác định đặc điểm của chủng vi khuẩn có khả năng cao trong phân giải cellulose, từ đó có thể làm cơ sở cho việc nghiên cứu, phát triển biện pháp xử lý phụ phẩm nông nghiệp chứa cellulose hiệu quả hơn. Từ mẫu phụ phẩm chế biến gỗ được thu tại hai tỉnh Hưng Yên và Hà Nội, bằng phương pháp nuôi cấy trên môi trường chọn lọc có chứa 1% CMC (Carboxymethyl cellulose), 23 chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải CMC được phân lập và trong đó, vi khuẩn C4 và C21 là hai chủng có thể hiện khả năng phân giải CMC cao. Dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào, cũng như đặc điểm hóa sinh cho thấy cả hai chủng vi khuẩn này đều thuộc chi *Bacillus* sp. Sau khi khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt độ cellulase của hai chủng vi khuẩn tuyển chọn có thể thấy, chủng C4 tổng hợp cellulase có hoạt độ mạnh nhất khi nuôi trong môi trường LB, điều kiện lắc, pH 8,0 trong 24 giờ; Trong khi đó chủng C21 sinh tổng hợp cellulase có hoạt độ mạnh nhất khi nuôi trong môi trường LB, điều kiện lắc, ở 35°C, pH = 6,0 trong 72 giờ. Cuối cùng, đánh giá khả năng phân giải rơm rạ và gỗ mục trong điều kiện *in vitro* cho thấy chủng C4 và C21 có khả năng phân giải tăng 3,02-4,22 lần so với đối chứng.

Từ khóa: *Bacillus* sp., cellulase, phân giải CMC, phụ phẩm sản xuất gỗ.

Characterization of Potential Cellulose-Degrading Bacteria Isolated from by-Products of Wood Processing

ABSTRACT

Cellulase is an enzyme used in many fields, such as agriculture, industry, and medicine. Among microorganisms capable of synthesizing cellulase, bacteria are evaluated as having high enzyme activity, stability, and limited environmental pollution. This study was conducted to isolate and characterize bacteria strains with high ability to degrade cellulose, which can serve as a basis for research treatment methods for cellulose-containing agricultural by-products more effective. From wood processing by-products collected in two provinces, Hung Yen and Hanoi, by inoculating method on a selective medium containing 1% CMC (Carboxymethyl cellulose), 23 strains of bacteria capable of degrading CMC (carboxymethyl cellulose) were isolated, two strains, C4 and C2,1 were potential strains showing high ability to degrade carboxymethyl cellulose. Colony morphology, cell morphology, and biochemical characteristics showed that both strains belonged to genus *Bacillus* sp. After evaluating effects of culture conditions on cellulase activity of two selected strains, strain C4 synthesized cellulase with the highest activity when cultured in LB medium, shaking condition, at 35°C, pH 8.0 for 24 hours; while strain C4 synthesized cellulase with the highest activity when cultured in LB medium, shaking condition, at 35°C, pH 6,0 for 72 hours. Finally, evaluation of the ability to decompose rice straw and rotten wood *in vitro* showed that the efficiency of these strains increased 3.02-4.22 times compared with the control.

Keywords: *Bacillus* sp., cellulase, CMC-degrading activity, by-products of wood processing.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chuyển đổi sinh khối có chứa cellulose bằng các phương pháp của công nghệ sinh học là hướng ứng dụng bền vững để tạo ra các phân tử đường glucose cung cấp nguồn nguyên liệu tạo ra cồn sinh học và các nhiên liệu sinh học khác (Gupta & Verma, 2015). Các enzyme có thể phân hủy vật liệu chứa cellulose hiện nay được xem là chất xúc tác sinh học quan trọng trong các ứng dụng chuyển đổi công nghệ sinh học (Kuhad & cs., 2011). Những enzyme này được tạo ra bởi nhiều nhóm vi sinh vật có khả năng phân hủy các hợp chất chứa cellulose. Các phức hợp enzyme đó bao gồm endoglucanase, exoglucanase và β -glucosidases, chúng hoạt động cùng nhau để phá hủy liên kết α -1,4 glycosidic của cellulose (Juturu & Wu, 2014). Hầu hết các enzyme này được tổng hợp trong tự nhiên bởi các loài nấm như *Trichoderma*, *Aspergillus* hay từ các loài vi khuẩn như *Bacillus*, *Clostridium* và *Cellulomonas* (Gupta & Verma, 2015). Các enzyme phân hủy cellulose tạo ra bởi vi khuẩn được đánh giá có hiệu quả xúc tác cao, các chu kỳ lên men diễn ra ngắn, sử dụng nguyên liệu rẻ tiền và dễ dàng tác động để biến đổi về mặt di truyền (Bharathiraja & cs., 2017). Tuy nhiên, ngành công nghiệp sản xuất nhiên liệu sinh học hoặc các quá trình xử lý phế phẩm của sản xuất nông nghiệp, công nghiệp vẫn đang cần các nguồn gen vi sinh vật có khả năng phân hủy cellulose cao, dễ dàng áp dụng cho chi phí thấp (Lee & cs., 2008). Các nghiên cứu chỉ ra rằng vi khuẩn có khả năng tăng sinh khối nhanh hơn các loài vi sinh vật và đây là nguồn cung cấp gen tiềm năng để thu nhận các sản phẩm enzyme phân hủy cellulose. Quá trình nhân sinh khối thu nhận các sản phẩm thường được kiểm soát chặt chẽ để đạt được hiệu quả cao nhất. Sản lượng enzyme cellulase thường chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như lượng chủng giống, điều kiện nuôi cấy (pH, nhiệt độ, chất hoạt hóa, chất đệm, chế độ khuấy, thời gian sinh trưởng) (Immanuel & cs., 2006). Chính vì lý do đó, việc phân lập, nghiên cứu đặc điểm của chủng vi khuẩn thể hiện khả năng phân giải cellulose cao có ý nghĩa rất lớn trong việc phát triển các biện pháp xử lý phế phẩm nông nghiệp chứa cellulose.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu phụ phẩm (mùn cưa) sau chế biến gỗ được ủ hoại mục lâu ngày được thu thập tại 03 địa điểm là (1) xã Tân Quang, Văn Lâm, Hưng Yên; (2) xã Đại Đồng, Văn Lâm, Hưng Yên và (3) Kiều Kị, Gia Lâm, Hà Nội. Mẫu phế phẩm được đựng vào túi zip và đưa về phòng thí nghiệm phục vụ cho phân lập vi khuẩn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải CMC

* Phân lập:

Vi khuẩn được phân lập theo phương pháp của (Rawway & cs., 2018). Mẫu phụ phẩm sau chế biến gỗ được pha loãng nhiều lần (10^{-1} - 10^{-6}). Quá trình được tiến hành như sau cân 1g mẫu mùn cưa và hòa trong 9ml nước cất được dung dịch có nồng độ pha loãng là 10^{-1} . Tiếp tục pha loãng trong nước cất để được các dung dịch có nồng độ khác nhau 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Cấy trải 100 μ l dịch pha loãng ở các nồng độ khác nhau trên môi trường chọn lọc có chứa 1% Carboxymethyl cellulose (CMC) (peptone 10 g/l, CMC 10 g/l, K_2HPO_4 2 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 2,5 g/l, gelatin 2 g/l, agar 15 g/l, pH = 7,0) và ủ ở 30°C trong 48 giờ. Sau đó, quan sát và lựa chọn các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường chọn lọc và cấy chuyển sang đĩa môi trường LB đặc (NaCl 10 g/l, cao nấm men 5 g/l, peptone 10 g/l, agar 10 g/l, pH = 7,0) đến khi chỉ xuất hiện một loại khuẩn lạc đồng nhất về các đặc điểm hình thái.

* Tuyển chọn vi khuẩn tiềm năng có khả năng phân giải CMC:

Để có thể tuyển chọn chính xác các chủng có khả năng phân giải cellulose với hoạt tính cao. Các chủng vi khuẩn đã phân lập được tiếp tục nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 30°C. Sau 48 giờ, dịch nuôi cấy được thu nhận, li tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Dùng pipet hút 100 μ l dịch trong thu được sau li tâm nhỏ vào từng giếng (đường kính giếng d = 8mm) trên môi trường chứa 1%

CMC, ủ ở 30°C trong 48 giờ. Sử dụng Lugol để nhuộm và giữ trong 15 phút. Tính hiệu số D – d (D là đường kính vòng phân giải, d là đường kính giếng thạch) để xác định được các chủng vi khuẩn thể hiện khả năng phân giải CMC cao với hoạt tính mạnh (Vũ Thị Dinh & cs., 2018). Các chủng vi khuẩn này sau đó được tuyển chọn cho các thí nghiệm tiếp theo (Nguyen Thi Thu Thuy & cs., 2018).

2.2.2. Xác định đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn tuyển chọn

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào (phương pháp nhuộm gram), kiểm tra các đặc tính sinh lý, hóa sinh như thử nghiệm khả năng di động, sinh catalase, sinh indol, phản ứng khử citratre, thử nghiệm Voges Prokauer and Methyl Red (Rasul & cs., 2015).

2.2.3. Xác định hoạt độ cellulase bằng định lượng đường khử với thuốc thử DNS

Hoạt độ cellulase được xác định dựa vào lượng đường khử tạo thành sau phản ứng bằng phương pháp đo quang phổ theo quy trình của Miller & cs. (1959). Cụ thể, vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB lỏng có chứa 1% CMC ở điều kiện lắc 180 vòng/phút, nhiệt độ 30°C. Sau 48 giờ, thu dịch nuôi cấy vi khuẩn, li tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút, trong 10 phút, loại bỏ tế bào. Dùng pipet hút 0,5ml dịch sau li tâm cho vào 01 ống nghiệm, thêm 0,5ml dung dịch 1% CMC trong đệm phosphate 0,05M. Lắc đều hỗn hợp và ủ ở 50°C trong 30 phút.

Lập đường chuẩn glucose: Dung dịch glucose với các nồng độ đã biết được xác định giá trị mật độ quang ở bước sóng 540nm tương ứng và từ đó xây dựng mối tương quan giữa nồng độ glucose và mật độ quang bằng phương trình đường chuẩn dạng $y = ax + b$ (Trần Chí Thật & cs., 2020).

Định lượng đường khử: 1ml mẫu cần xác định lượng đường khử được cho vào ống nghiệm. Sau đó, bổ sung 1,5ml dung dịch thuốc thử 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) và ủ ở 100°C trong 10 phút. Làm nguội ống đến nhiệt độ phòng và đo mật độ quang ở bước sóng 540nm

(Trần Chí Thật & cs., 2020). Dựa theo đồ thị đường chuẩn để tính được hàm lượng đường của mẫu nghiên cứu.

2.2.4. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy vi khuẩn đến hoạt độ cellulase

Với mục đích xác định được điều kiện nuôi cấy thích hợp để các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp enzyme cellulase với hoạt độ cao, chủng C4 và C21 được nuôi trong môi trường LB lỏng và ở các điều kiện khác nhau như thời gian nuôi cấy, pH môi trường, nhiệt độ nuôi cấy và trạng thái nuôi cấy tĩnh, lắc. Thời gian nuôi cấy được khảo sát là sau 24, 48, 72 và 96 giờ; còn giá trị pH của môi trường được nghiên cứu là 4, 5, 6, 7, 8 và 9. Bên cạnh đó, chủng vi khuẩn tuyển chọn cũng được nuôi trong môi trường LB lỏng ở các nhiệt độ khác nhau (25°C, 30°C, 35°C và 40°C) để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ cellulase. Sau quá trình nuôi cấy, dịch nuôi tế bào được thu để xác định đánh giá hoạt độ enzyme cellulase (tiến hành theo phương pháp mô tả ở mục 2.2.3). Thí nghiệm được lặp lại ba lần cho mỗi công thức.

2.2.5. Khảo sát khả năng phân giải rơm và mùn gỗ của các chủng vi khuẩn trong điều kiện in vitro

Để đánh giá được khả năng phân hủy các vật liệu tự nhiên có chứa cellulose, hai chủng vi khuẩn tiềm năng C4 và C21 được nuôi cấy trong môi trường LB có thể tích 150ml ở điều kiện thích hợp về thời gian, pH và nhiệt độ cho việc tổng hợp enzyme cellulase có hoạt độ cao. Sau đó, bổ sung các vật liệu tự nhiên là rơm và mùn gỗ (5g) trực tiếp vào bình nuôi cấy vi khuẩn. Ở thí nghiệm đối chứng, rơm hoặc mùn gỗ được bổ sung vào môi trường LB lỏng không chứa vi khuẩn và ủ ở cùng điều kiện. Sau 10 ngày khối lượng vật liệu còn lại trong công thức có bổ sung dịch nuôi cấy và đối chứng được tách khỏi dung dịch, sấy khô và xác định khối lượng.

Hiệu suất phân giải vật liệu (%) của chủng vi khuẩn = (Khối lượng vật liệu phân hủy/Khối lượng vật liệu ban đầu) × 100%.

Khả năng phân giải vật liệu so với đối chứng (lần) = (Hiệu suất phân giải vật liệu

trong thí nghiệm có chứa vi khuẩn/Hiệu suất phân giải vật liệu trong thí nghiệm đối chứng).

2.2.6. Phân tích kết quả và xử lý thống kê

Số liệu thí nghiệm được thu thập và phân tích phương sai (ANOVA) hai nhân tố và sự so sánh các công thức được phân tích theo mô hình Tukey's multiple comparisons test với mức $P \leq 0,05$ bằng phần mềm Graphpad prism 9.3.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải CMC

Từ 03 mẫu phụ phẩm sau chế biến gỗ được thu thập tại Hà Nội và Hưng Yên, 24 chủng vi khuẩn đã được phân lập và làm thuần trên môi trường LB. Các chủng vi khuẩn phân lập được sau đó được đánh giá đặc điểm hình thái khuẩn lạc và khả năng phân giải CMC bằng phương pháp khuyếch tán đĩa thạch (Bảng 1). Kết quả cho thấy, hầu hết các chủng vi khuẩn phân lập được (23/24 chủng) có khả năng phân giải CMC. Mức độ phân giải CMC của 23 chủng này được biểu hiện ở các cấp độ khác nhau. Đường kính vòng phân giải dao động trong khoảng (6-25mm). Dựa trên kết quả này, chúng tôi nhận thấy 02 chủng vi khuẩn ký hiệu là C4 và C21 là các chủng có hoạt tính phân giải CMC ở mức độ cao. Kết quả đường kính vòng phân giải CMC của hai chủng C4 và C21 lớn hơn 20mm. Do đó, 02 chủng vi khuẩn này được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và điều kiện sinh trưởng, phát triển cho khả năng sinh tổng hợp cellulase tối ưu.

3.2. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Hai chủng tiềm năng C4 và C21 được tiếp tục nghiên cứu đặc điểm hình thái và sinh hóa (Hình 1, Bảng 2). Về đặc điểm hình thái, cả hai chủng C4 và C21 là trực khuẩn, gram dương (Hình 1). Cả hai chủng đều có khả năng sinh enzyme protease, amylase và catalase ngoại bào. Tuy nhiên, dựa trên đường kính vòng phân giải, kết quả cho thấy chủng C21 biểu hiện hoạt tính các enzyme ngoại bào protease và amylase

mạnh hơn chủng C4. Về đặc điểm sinh hóa khác, 02 chủng tiềm năng C4 và C21 đều biểu hiện dương tính với phản ứng MR và VP. Bên cạnh đó, hai chủng lựa chọn đều có khả năng sử dụng nitrate là nguồn carbon cho sự sinh trưởng. Hai chủng này không có khả năng sinh indol. Như vậy, theo khóa phân loại vi sinh vật của Bergey, với đặc điểm hình thái và hóa sinh của hai chủng C4, C21 có thể xếp hai chủng vi khuẩn này đều thuộc chi *Bacillus* sp. (Garrity & cs., 2010).

So sánh với nghiên cứu của (Behera & cs., 2014) khi thực hiện phân lập vi khuẩn phân giải cellulose từ đất ngập mặn vùng đồng bằng sông Mahanadi đã phân lập được 05 chủng *Bacillus* sp. có hoạt tính cellulase; Hay trong nghiên cứu của mình, (Sethi & cs., 2013; Rasul & cs., 2015) cũng chọn lọc được chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp cellulase với hoạt tính cao và bước đầu đã ứng dụng hiệu quả trong việc xử lý các phế phụ phẩm nông nghiệp.

3.3. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn đến hoạt độ enzyme cellulase

Với mục đích xác định được điều kiện nuôi cấy thích hợp sinh tổng hợp cellulase có hoạt độ cao, chủng C4 và C21 được nuôi trong môi trường LB lỏng và khảo sát các yếu tố như thời gian nuôi cấy, pH của môi trường, nhiệt độ và điều kiện nuôi cấy. Các yếu tố này sẽ được khảo sát lần lượt và áp dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Đầu tiên, hai chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trong môi trường LB lỏng, pH = 7, điều kiện lắc 180 vòng/phút trong 24, 48, 72 và 96 giờ. Dịch nuôi cấy được thu nhận, li tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ tế bào để đánh giá hoạt độ của enzyme cellulase theo phương pháp Miller. Kết quả cho thấy, chủng C4 sau 48 giờ nuôi cấy cho hoạt độ enzyme cellulase tối đa đạt 0,373 U/ml và khi kéo dài thời gian nuôi cấy làm giảm hoạt độ của enzyme cellulase (Hình 2). Ngược lại, đối với chủng C21, thời gian nuôi cấy thích hợp để chủng vi khuẩn này tổng hợp cellulase với hoạt

độ cao là 72 giờ đạt 1,190 U/ml. Khi tăng thời gian nuôi cấy chủng C21 lên 96h, hoạt độ enzyme giảm mạnh.

So với kết quả nghiên cứu của (Rasul & cs., 2015) có thể thấy rằng, trong khoảng 48 đến 72 giờ nuôi cấy, chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. thể hiện khả năng tổng hợp cellulase với hoạt độ cao và đạt giá trị cao nhất sau 48 giờ nuôi cấy. Tương tự như vậy, Behera & cs. (2014) cũng khẳng định rằng 02 trong số 15 chủng vi khuẩn

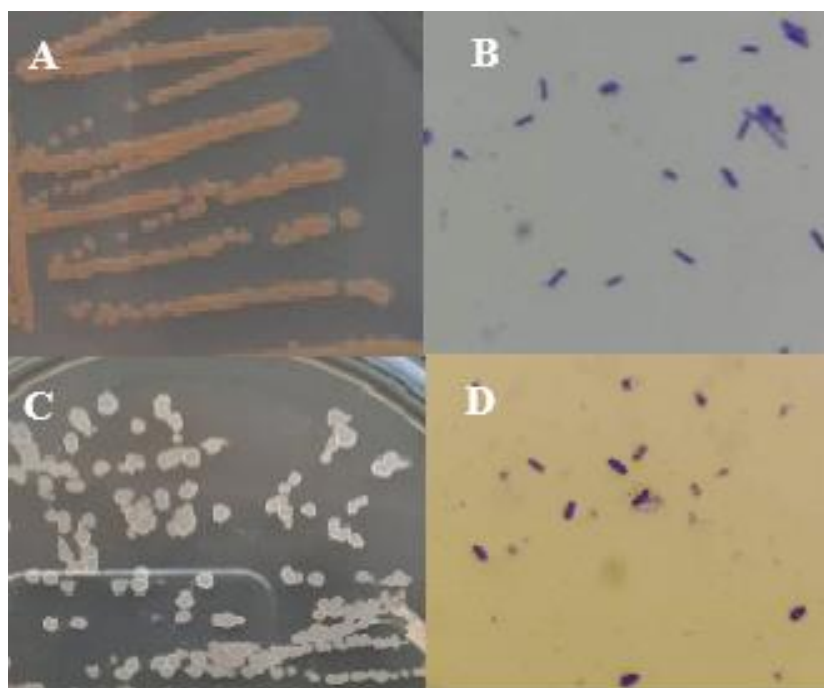
họ tuyển chọn được có hoạt độ phân giải CMC cao nhất sau 72 giờ.

Như vậy, thời gian nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến hoạt độ của enzyme cellulase, đồng thời tùy từng chủng mà điều kiện thích hợp cho sự tổng hợp cellulase có hoạt độ cao là khác nhau. Tuy nhiên, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, 48-72 giờ là khoảng thời gian thích hợp cho rất nhiều chủng vi khuẩn sinh cellulase với hoạt độ cao.

Bảng 1. Đánh giá đặc điểm và khả năng phân giải CMC của các chủng phân lập

Nguồn phân lập	Hoạt tính phân giải	Ký hiệu chủng
Hà Nội	Không có hoạt tính	C2
	Yếu	C5, C6
	Trung bình	C1, C3, C7, C8, C9
	Cao	C4
Hưng Yên	Yếu	C10, C11, C23, C34
	Trung bình	C12-C20
	Cao	C21

Ghi chú: Đường kính phân giải CMC 0-10mm: Hoạt tính phân giải yếu; Đường kính phân giải CMC 10-20mm: Hoạt tính phân giải trung bình; Đường kính phân giải CMC > 20mm: Hoạt tính phân giải cao.

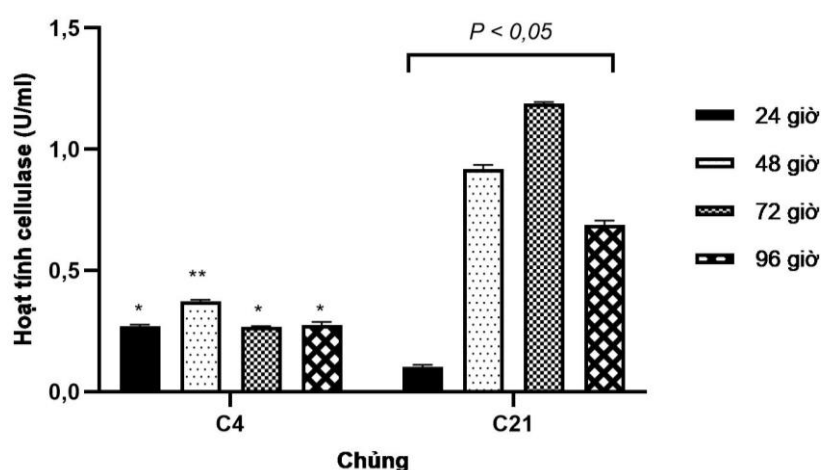


Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào chủng C4 (A-B) và chủng C21 (C-D) trên môi trường LB sau 24h nuôi cấy

Bảng 2. Đặc điểm sinh hóa của của hai chủng tiêm nạng C4 và C21

Đặc điểm sinh hóa	Chủng C4	Chủng C21
Nhuộm Gram	Trực khuẩn, Gram dương	Trực khuẩn, Gram dương
Khả năng sản sinh enzyme protease ngoại bào (Đường kính vòng phân giải - mm)	+ (8mm)	+ (18mm)
Khả năng sản sinh enzyme ngoại bào amylase (Đường kính vòng phân giải - mm)	+ (9mm)	+ (18mm)
MR	+	+
VP	+	+
Khả năng sử dụng citrate	+	+
Khả năng sinh indol	-	-
Khả năng sinh catalase	+	+
Khả năng di động	+	+

Ghi chú: (+): Kết quả dương tính; (-): Kết quả âm tính.



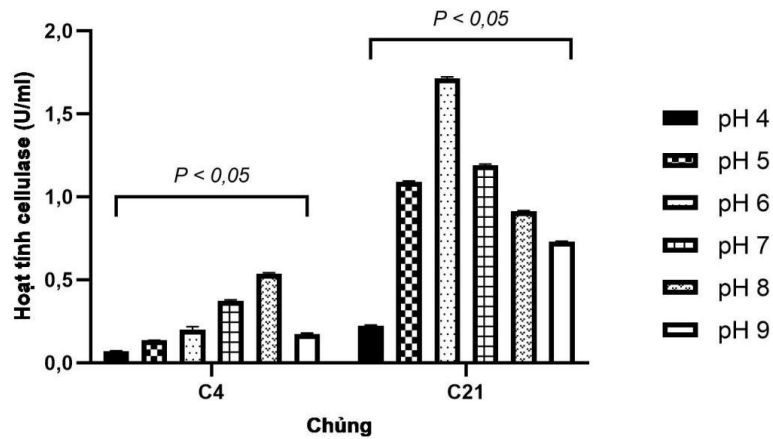
Ghi chú: Các công thức có ký hiệu * khác nhau là sai khác nhau có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ enzyme cellulase của chủng tiêm nạng C4 và C21

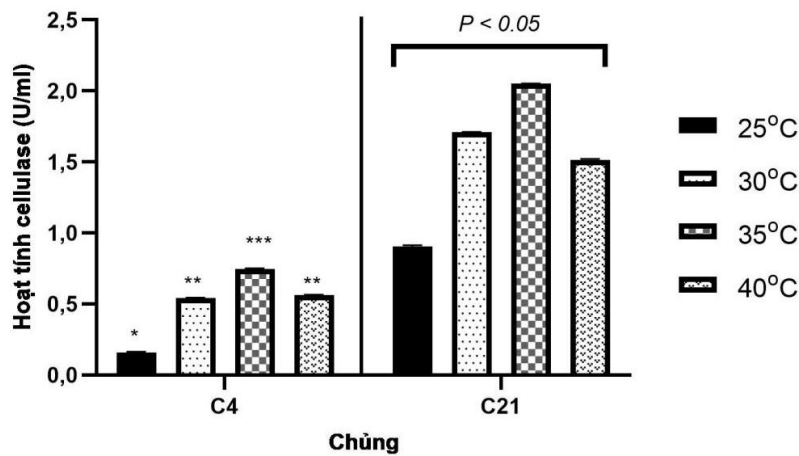
Nghiên cứu về ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh cellulase của các chủng vi khuẩn tuyển chọn cho thấy giá trị pH có ảnh hưởng khá lớn (Hình 3). Mỗi chủng thể hiện khả năng phân giải CMC hiệu quả ở môi trường có giá trị pH khác nhau. Cụ thể, hoạt độ cellulase của chủng C4 đạt cao nhất là 0,535 U/ml khi được nuôi trong môi trường LB với pH = 8. Chủng C21 được nuôi trong môi trường với pH = 6 có hoạt độ cellulase tương ứng là 1,713 U/ml. Có thể thấy đây là một ưu điểm khi ứng dụng các chủng vi khuẩn này trong việc xử lý các phế phụ phẩm chứa cellulose trong tự

nhiên vì trên thực tế pH của các sản phẩm phụ phẩm nông nghiệp này thường dao động trong khoảng 6-8 (Farag & cs., 2007).

Cùng với thời gian nuôi cấy, pH môi trường thì nhiệt độ cũng là nhân tố đóng vai trò quan trọng trong việc tổng hợp cellulase. Trong nghiên cứu này, chủng C4 và C21 được nuôi tại các điều kiện nhiệt độ khác nhau (25°C, 30°C, 35°C, 40°C). Kết quả cho thấy, cả hai chủng C4, C21 đều thể hiện khả năng phân giải CMC khi được nuôi ở 30-40°C và hoạt tính cellulase của cả hai chủng vi khuẩn này đều đạt giá trị cao nhất ở nhiệt độ 35°C (Hình 4).



Hình 3. Ảnh hưởng pH môi trường nuôi cấy đến hoạt độ enzyme cellulase của chủng tiềm năng C4 và C21



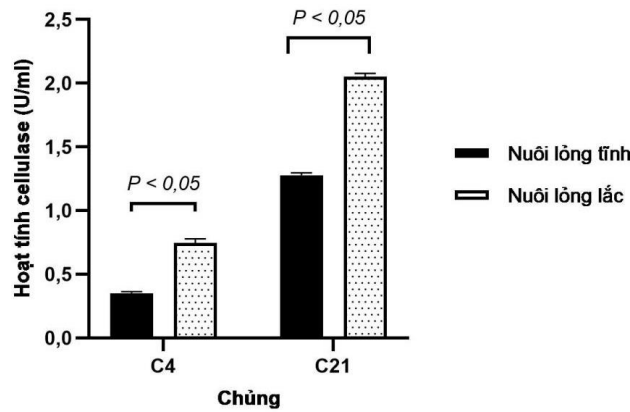
Ghi chú: Các công thức có ký hiệu * khác nhau là sai khác nhau có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

Hình 4. Ảnh hưởng nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt độ enzyme cellulase của chủng tiềm năng C4 và C21

Rasul & cs. (2015) khi nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. cũng khẳng định dải nhiệt độ từ 30-40°C khá thích hợp cho việc tổng hợp cellulase, dù trong nghiên cứu đó 40°C mới là nhiệt độ thích hợp mà các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. tạo ra cellulase có hoạt độ cao. Tương tự như vậy, (Khatiwada & cs., 2016) xác định được 37°C là nhiệt độ thích hợp để chủng *Bacillus* sp. sinh tổng hợp cellulase. Hơn nữa, nhiều nghiên cứu trước đó đã thực hiện khảo sát điều kiện nhiệt độ ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp cellulase của các chủng *Bacillus* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm cũng như ở quy mô công nghiệp đã chỉ ra rằng, nhiệt độ thích hợp để sản

xuất cellulase phụ thuộc vào chủng vi khuẩn và sự biến đổi của chúng (Immanuel & cs., 2006).

Ở thí nghiệm này, chúng tôi tiếp tục kế thừa kết quả nghiên cứu trên cho hai chủng tiềm năng C4 và C21 để tiến hành xác định ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy (lỏng, tĩnh hoặc lỏng, lắc 180 vòng/phút). Chủng vi khuẩn C4 sẽ được nuôi cấy trong thời gian 48 giờ, pH môi trường là 8. Bên cạnh đó, chủng C21 sẽ được nuôi cấy đánh giá trong 72 giờ, pH môi trường là 6. Cả hai chủng đều được nuôi cấy ở nhiệt độ là 35°C. So sánh hai điều kiện nuôi lỏng tĩnh và lỏng lắc cho thấy khi nuôi cấy lỏng lắc cả hai chủng C4 và C21 cho hoạt độ cellulase cao hơn (Hình 5).



Ghi chú: Vi khuẩn được nuôi cấy ở điều kiện pH và nhiệt độ tối ưu trong thời gian tối ưu cho hoạt độ cellulase cao nhất.

Hình 5. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến hoạt độ enzyme cellulase của chủng tiềm năng C4 và C21

Bảng 3. Khả năng phân giải vật liệu có chứa cellulose của các chủng tiềm năng (sau 10 ngày xử lý ở điều kiện tối ưu)

Vật liệu	Hiệu suất phân giải vật liệu trong công thức đối chứng (%)	Hiệu suất phân giải vật liệu của chủng vi khuẩn (%)		Khả năng phân giải vật liệu của vi khuẩn so với đối chứng (lần)	
		Chủng C4	Chủng C21	Chủng C4	Chủng C21
Rơm khô	9,6	29	32	3,02	3,33
Mùn gỗ	7,2	28,4	31,2	3,91	4,33

Hussain & cs. (2017) cũng khảo sát ảnh hưởng của trạng thái nuôi cấy tĩnh và lắc đến sự tổng hợp cellulase của chủng *B. megaterium* BMS4, *B. subtilis* BTN7A và *B. amyloliquefaciens* SA5. Kết quả thu được cho thấy các chủng vi khuẩn này khi được nuôi cấy trong điều kiện lắc sẽ sinh cellulase có hoạt độ cao hơn khi được ủ ở trạng thái tĩnh. Nhiều nghiên cứu trước đây đã khẳng định rằng tốc độ khuấy trộn là yếu tố quan trọng để giúp hòa tan oxy trong môi trường nuôi cấy, điều này ảnh hưởng đến sự phát triển của các tế bào vi sinh vật, cũng như khả năng sản xuất cellulase (Jo & cs., 2008).

3.4. Khả năng phân giải rơm và mùn gỗ của chủng vi khuẩn trong điều kiện *in vitro*

Để đánh giá được chính xác khả năng phân giải cellulose của chủng tiềm năng C4 và C21, chúng tôi tiến hành thử nghiệm khả năng phân giải của hai chủng trên nguồn vật liệu có nguồn gốc tự nhiên là rơm khô và mùn gỗ trong điều kiện *in vitro*. Kết quả cho thấy, cả hai chủng C4

và C21 đều có cho thấy khả năng phân giải vật liệu nghiên cứu với hiệu suất phân giải lần lượt là 29% và 32% đối với rơm và 28,4% và 31,2% đối với mùn gỗ. Bên cạnh đó, để đánh giá chính xác khả năng phân giải của các chủng vi khuẩn này, chúng tôi cũng xác định và so sánh với khả năng phân hủy tự nhiên ở công thức đối chứng mà các vật liệu được bổ sung vào môi trường LB không chứa vi khuẩn và số liệu được ghi nhận đã chỉ ra rằng, hai chủng tiềm năng này đều phân giải rơm và mùn gỗ cao hơn gấp 3-4 lần (Bảng 3). Cụ thể, chủng C4 phân giải rơm khô và mùn gỗ tăng 3,02-3,91 lần so với đối chứng. Trong khi đó, chủng C21 có khả năng phân giải tăng hơn so với đối chứng lần lượt là 3,33 và 4,33 lần. Như vậy, trong điều kiện *in vitro*, chủng C21 thể hiện khả năng phân giải rơm và mùn gỗ cao hơn chủng C4.

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu phụ phẩm sau chế biến gỗ thu được tại tỉnh Hưng Yên và Hà Nội, đã tuyển chọn

được chủng C4 và C21 có hoạt tính cellulase phân giải CMC cao nhất. Dựa vào các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào và các đặc điểm hóa sinh, có thể tạm kết luận chủng G4 và chủng G21 thuộc chi *Bacillus* sp. Chủng C4 và C21 tổng hợp cellulase có hoạt độ cao nhất ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau. Chủng C4 nuôi trong môi trường LB lỏng, điều kiện lắc 180 vòng/phút, ở 35°C, pH = 8,0 trong 48 giờ tổng hợp enzyme cellulase có hoạt độ cao nhất đạt 0,747 U/ml. Trong khi đó chủng C21 nuôi trong môi trường LB lỏng, điều kiện lắc 180 vòng/phút, ở 35°C, pH = 6,0 trong 72 giờ tổng hợp enzyme cellulase có hoạt độ cao nhất đạt 2,052 U/ml. Cả hai chủng đều thể hiện khả năng phân giải rơm và mùn gỗ trong điều kiện *in vitro* gấp 3,02-4,33 lần so với đối chứng. Như vậy, các kết quả nghiên cứu đạt được cho thấy, hai chủng C4 và C21 phân lập được là các chủng tiềm năng, đây sẽ là nguồn vật liệu có giá trị cho hướng nghiên cứu sử dụng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose trong xử lý phụ phẩm sau chế biến gỗ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Behera B., Parida S., Dutta S.K. & Thatoi H. (2014). Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Mangrove Soil of Mahanadi River Delta and Their Cellulase Production Ability. *American Journal of Microbiological Research*. 2: 41-46.
- Bharathiraja S., Suriya J., Krishnan M., Manivasagan P. & Kim S.K. (2017). Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications. *Adv Food Nutr Res*. 80: 125-148.
- Farag H., El-Mersfey M. & Radwan H. (2007). A Simple and Novel Bioreactor for Agricultural and Municipal solid Wastes Recycling.
- Garrity G., De Vos P., Jones D., Kreig N., Ludwig W., Rainey F., Schleifer K. & Whitman W. (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3. The Firmicutes. 10.1007/978-0-387-68489-5.
- Gupta A. & Verma J.P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 41: 550-567.
- Hussain A., Abdel-Salam M., Abo-Ghalia H., Hegazy W. & Shaaban Hafez S. (2017). Optimization and molecular identification of novel cellulose degrading bacteria isolated from Egyptian environment. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15.
- Immanuel G., Dhanusha R., Prema P. & Palavesam A. (2006). Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *International Journal of Environmental Science & Technology*. 3(1): 25-34.
- Jo K.-I., Lee Y.-J., Kim B.-K., Lee B.-H., Chung C.-H., Nam S.-W., Kim S.-K. & Lee J.-W. (2008). Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 13(2): 182-188.
- Juturu V. & Wu J.C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 33: 188-203.
- Khatiwada P., Ahmed J., Sohag M.M., Islam K. & Azad A. (2016). Isolation, Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Isolates from Municipal Solid Wastes and Rice Straw Wastes. *BioTechniques*. 6: 280.
- Kuhad R.C., Gupta R. & Singh A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res*. 2011: 280696.
- Lee Y.J., Kim B.K., Lee B.H., Jo K.I., Lee N.K., Chung C.H., Lee Y.C. & Lee J.W. (2008). Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour Technol*. 99(2): 378-86.
- Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Tien Long & Tran Duc (2018). Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose để sản xuất phân hữu cơ vi sinh. *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*. 127: 117.
- Rasul F., Afroz A., Rashid U., Mehmood S., Sughra K. & Zeeshan N. (2015). Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry. *International Journal of Biosciences IJB*. 6: 230-238.
- Rawway M., Ali S. & Badawy A. (2018). Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Different Sources at Assiut Governorate (Upper Egypt). *Journal of Ecology of Health & Environment*. 6: 15-24.
- Sethi S., Datta A., Gupta B. & Gupta S. (2013). Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *ISRN Biotechnol*.
- Trần Chí Thật, Phạm Mai Hoàng Duy & Lê Minh Tường (2020). Khả năng phân hủy rơm rạ của các chủng xạ khuẩn thu thập ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 2: 44-51.
- Vũ Thị Dinh, Phan Thị Thu Nga, Hoàng Trung Doãn, Trần Liên Hà, 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: 3-10.