Vietnam J. Agri. Sci. 2018, Vol. 16, No. 4: 373-381 Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2018, 16(4): 373-381
www.vnua.edu.vn

TUYỂN CHỌN, ĐỊNH DANH VÀ XÁC ĐỊNH ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ TỚI KHẢ NĂNG SINH CELLULASE CỦA VI KHUẨN LACTIC

Nguyễn Thị Lâm Đoàn[1*], Peter Vandamme[2]

[1]Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[2]Phòng thí nghiệm Vi sinh vật, Trường đại học Ghent, Bỉ

[*]Email: nlddoan@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 20.05.2018 Ngày chấp nhận: 09.07.2018

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là tuyển chọn và định tên loài chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh cellulase ngoại bào cao và xác định một số điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh cellulase của chủng được tuyển chọn. Từ 120 chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ một số thực phẩm lên men truyền thống (cà muối, dưa muối và nem chua) đã tuyển chọn 40 chủng có khả năng sinh cellulase ngoại bào trong đó 10 chủng có đường kính vòng phân giải cao từ 11 - 15 mm. Chủng DP4.8 có khả năng sinh cellulase cao nhất tiếp tục được nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố như nồng độ cơ chất carboxymethyl cellulose (CMC), nhiệt độ, thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp cellulase. Kết quả cho thấy với nồng độ CMC 1,0%, nhiệt độ nuôi cấy 37°C và thời gian nuôi cấy 36 h cellulase của chủng DP4.8 được sinh ra mạnh nhất. Ngoài ra, chủng DP4.8 đã được phân tích trình tự gen *pheS*, so sánh với các loài trong ngân hàng gen BCCM/LMG của Trường đại học Ghent (Bỉ) và ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế (EMBL) cho thấy chủng này thuộc loài *Lactobacillus rossiaes*.

Từ khóa: Cellulase, vi khuẩn lactic, định tên loài, *pheS* gen.

Selection, Identification and Determination of Some Cultural Conditions Affecting Cellulase Production of Lactic Acid Bacteria

ABSTRACT

The purposes of this study were to select and identify species of lactic acid bacteria (LAB) capable of producing high extracellular cellulase and to determine some cultural conditions affecting cellulase production of selected strains. Forty strains producing extracellular cellulase were selected from 120 LAB strains isolated from some traditional fermented foods. Of 40 strains producing extracellular cellulase, 10 strains produced cellulase with high enzyme activities with diameter of substrate hydrolyzing zone reaching from 11 to 15 mm. DP4.8 strain with highest cellulase productivity was further investigated on the effect of some culture conditions such as carboxymethyl cellulose (CMC) concentration, cultural temperature, cultural time on producing cellulase. Results showed that CMC concentration of 1.0%, culture temperature at 37°C, and culture time (36h) were the best conditions for producing cellulase. In addition, DP4.8 strain was analysed by *pheS* gene sequencing and compared with the known sequence database in EMBL and BCCM/LMG collection of Ghent University, Belgium. This strain was identified to be *Lactobacillus rossiaes*.

Keywords: Cellulase, lactic acid bacteria, identification, *pheS* gene.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thành phần chính của thành tế bào thực vật là cellulose, hemicellulose và lignin trong đó cellulose chiếm tỉ lệ cao nhất (Han *et al.*, 2003). Sinh khối khô trung bình chứa 23% lignin, 40% cellulose và 33% hemicellulose (Sa-Pereira *et al.*, 2003). Cellulase là enzyme được dùng để chuyển cellulose từ hợp chất có phân tử lượng

cao, hệ số hấp thu kém, giá trị thương phẩm thấp thành sản phẩm mới có hệ số hấp thu cao hơn, giá trị thương phẩm tốt và có khả năng ứng dụng rộng rãi. Cellulase được sử dụng phổ biến trong công nghệ xử lý môi trường (Zahangir *et al.*, 2005), dệt may (Ali & Saad, 2008), sản xuất thức ăn chăn nuôi (Chandara *et al.*, 2005), chế biến thực phẩm (Ramesh *et al.*, 2011).

Enzyme được sản xuất từ nhiều nguồn khác nhau nhưng vi sinh vật là nguồn tài nguyên phong phú, thích hợp nhất để sản xuất enzyme ở quy mô công nghiệp. Nghiên cứu về cellulase và ứng dụng mới chỉ tập trung vào đối tượng chính là nấm (Ali & Saad, 2008; Ahamed & Vermette, 2008; Camossola & Dillon, 2007) và vi khuẩn *Bacillus* (Samley Man & Nguyen Thi Thanh Thuy, 2017; Kondakindi *et al.*, 2017) mà chưa có nhiều nghiên cứu hướng đến nhóm vi khuẩn lactic. Đây là một nguồn thu enzyme từ vi sinh vật có ưu thế đặc biệt khi ứng dụng vào các ngành sản xuất thực phẩm và đồ uống lên men như sản xuất bia, rượu hay trong việc sản xuất các chế phẩm dùng trong chăn nuôi.

Định tên bước đầu có thể cho biết cellulase được sinh ra từ loài nào, nhóm nào và dễ dàng ứng dụng chúng hơn. Trước đây, việc phân loại vi sinh vật theo phương pháp truyền thống dựa vào các đặc điểm hình thái, đặc tính sinh lý và sinh hóa, hoặc có thể xác định trình tự gen 16S rRNA (Nguyen *et al.*, 2010). Các đặc trưng này đôi khi cũng bộc lộ những hạn chế, nhiều trường hợp phải định lại tên phân loại của một số vi sinh vật, đặc biệt đối với vi khuẩn lactic là một nhóm có nhiều giống và thậm chí trong một giống cũng có sự đa dạng lớn về loài (Schleifer *et al.*, 1995). Trong thời gian gần đây, một đoạn gen *pheS* ngắn (382 - 455 bp) mã hoá cho protein phenylalanyl - tRNA synthase có tác dụng xúc tác cho việc chuyển phenylalanine đến tRNA tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein được quan tâm như một ứng cử viên tiềm năng trong xác định mối quan hệ phát sinh loài hơn là sử dụng gen 16S rRNA (Naser *et al.*, 2007). Sử dụng gen *pheS* cho tỉ lệ khác nhau lớn và giúp phân biệt rõ các loài gần nhau trong nhóm vi khuẩn lactic hơn là gen 16S rRNA (Naser *et al.*, 2007; De Bruyne *et al.*, 2008; Scheirlinck *et al.*, 2007). Gen *PheS* đã được nhiều nghiên cứu sử dụng như xác định các loài thuộc giống *Lactobacillus* (Naser *et al.*, 2007), nghiên cứu sự đa dạng của vi khuẩn lactic trong nem chua (Nguyen *et al.*, 2013), nghiên cứu sự đa dạng các loài vi khuẩn lactic trong phomat (Van Hoorde *et al.*, 2008).

Mục đích nghiên cứu này tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh cellulase cao và xác định một số điều kiện môi trường nuôi cấy để chúng cho hoạt tính tốt. Trình tự gen *pheS,* một trong những gen tiềm năng trong xác định mối quan hệ phát sinh loài của vi khuẩn lactic đã được sử dụng để xác định loài của chủng tuyển chọn. Những kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo ứng dụng chủng này trong công nghệ sản xuất thực phẩm và trong chăn nuôi.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.1.1. Các chủng vi khuẩn

120 chủng vi khuẩn lactic được cung cấp từ phòng thí nghiệm trung tâm - Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Các chủng này được phân lập từ một số thực phẩm lên men truyền thống (cà muối, dưa muối, nem chua).

2.1.2. Môi trường nghiên cứu

Môi trường MRS dịch thể dùng để nuôi cấy và hoạt hóa các chủng vi khuẩn lactic (g/l): Glucose - 20,0; NaH_2PO_4 - 2,0; CH3COONa - 5,0; Cao thịt - 10,0; $C_6H_{17}N_3O_7$ - 2,0; Pepton - 10,0; $MgSO_4.7H_2O$ - 0,1; Cao nấm men - 5,0; $MnSO_4.4H_2O$ - 0,05; Tween 80 - 1,0 ml; Nước cất vừa đủ - 1 lít; pH 6,5; khử trùng 121^0C/15 phút.

Môi trường CMC (g/l) với nồng độ CMC 0,1% để xác định khả năng sinh cellulase (g/l): Thạch 17,0 g/l, CMC (carboxymethyl cellulose) 1,0 g/l; Nước cất vừa đủ - 1 lít; pH 7; khử trùng 121^oC/15 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1. Xác định khả năng sinh cellulase ngoại bào

Khả năng sinh cellulase ngoại bào được xác định bằng phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường có bổ sung cơ chất tương ứng carboxymethyl cellulose (CMC) (Nguyễn Lân Dũng và cs., 1976). Chủng vi khuẩn lactic được hoạt hóa trong môi trường MRS lỏng. Sau 48 h nuôi ở 30ºC, lấy dịch nuôi vi khuẩn lactic đem ly tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 30 phút, ở 4ºC. Sau đó thu lấy dịch ly tâm. Đục lỗ thạch có đường kính 7 mm trên đĩa petri của môi trường CMC. Nhỏ 0,1 ml dịch ly tâm của mỗi chủng đã thu được vào lỗ thạch, sau đó đặt ở 4ºC trong 2 h để dịch ly tâm khuếch tán đều vào trong thạch. Đĩa thạch được đặt ở tủ định ôn 30ºC trong 48 h để lượng dịch trong lỗ thạch thủy phân cơ chất, tiếp đó đĩa thạch được nhuộm màu bằng dung dịch lugol 5%. Hoạt tính enzyme được đo bằng đường kính vòng phân giải cơ chất xung quanh lỗ thạch, tức D - d. Trong đó, D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính lỗ thạch (7mm).

Thí nghiệm 2. Xác định ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh cellulase ngoại bào của chủng tuyển chọn

Chủng có khả năng sinh cellulase cao tiếp tục được nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh cellulase

Thí nghiệm 2.1. Xác định ảnh hưởng của nguồn cơ chất carboxymethyl cellulose (CMC)

Chủng vi khuẩn lactic đã tuyển chọn có khả năng sinh cellulase cao là kết quả của thí nghiệm 2 được nuôi cấy trên môi trường MRS có bổ sung cơ chất CMC ở nồng độ khác nhau như theo nghiên cứu của Shaikh *et al.* (2013). Môi trường 1, 2, 3, 4 lần lượt bổ sung 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% cơ chất CMC tương ứng, nuôi ở nhiệt độ 30ºC trong 48 h, xác định khả năng sinh cellulase như thí nghiệm 1.

Thí nghiệm 2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Các chủng vi khuẩn lactic được tuyển chọn đem nuôi cấy trên môi trường MRS chứa nguồn cơ chất CMC thích hợp ở thí nghiệm trên, với các nhiệt độ 30, 37, 44, 51ºC (Nguyễn Thị Thu và cs, 2018), sau 48 h nuôi, xác định khả năng sinh cellulase như thí nghiệm 1.

Thí nghiệm 2.3. Xác định ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Chủng vi khuẩn lactic đã tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường chứa nguồn cơ chất CMC và nhiệt độ thích hợp (kết quả nghiên cứu thí nghiệm trước) tại thời gian 12, 24, 36, 48 h, (Nguyễn Thị Thu và cs., 2018), xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào ở các thời gian nuôi cấy khác nhau.

2.2.2. Phương pháp phân tích

Phân tích trình tự gen *pheS* cho việc xác định loài vi khuẩn lactic sinh cellulase cao

Phương pháp xác định trình tự gen *pheS* được dùng để xác định loài của chủng có khả năng sinh enzyme cellulase cao nhất như miêu tả của Nguyen *et al.* (2013).

Tách chiết DNA

Chủng sinh cellulase mạnh nhất được mã hóa R-42472 (DP4.8) và DNA genomic của chủng được tách chiết theo phương pháp của Gevers *et al.* (2001).

Chất lượng và độ tinh sạch DNA được kiểm tra bằng cách đo quang phổ ở bước sóng 234, 260 và 280 nm (SpectraMax Plus384, Molecular Devices, California, USA) và điện di trên gel 1,0% w/v agarose trong 45 phút ở điện thế 75V của 5,0 µL DNA trộn với 2,0 µL loading dye (4,0 g sucrose và 2,5 mg bromophenol blue hòa tan trong 6,0 mL đệm TE). Marker được sử dụng là SmartLadder, Eurogentec, Searing, của Bỉ.

Khuếch đại PCR cho giải trình tự gen pheS

Đoạn gen *pheS* được nhân lên với mồi xuôi là *PheS*-21-F (5′-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3′) và mồi ngược *PheS*-22-R (5′-CCWARVCCRAARGCAAARCC-3′) (De Bruyne *et al.*, 2008). Phản ứng được tiến hành với DNA pha loãng (OD = 1,0). Thể tích PCR của 50 µl gồm 5,0 µl của 10x PCR buffer (15 mM $MgCl_2$), 5,0 µl deoxynucleoside triphosphates (2 mM của mỗi loại dNTP), 0,5 µL của mỗi mồi (50 µM), 1 µL Taq polymerase (1U μl^{-1}), 37 µL nước cất và 1

µl của dung dịch DNA. Sử dụng máy GenAmp PCR 9600 thermocycler (Applied Biosystem). Chu trình nhiệt bao gồm (1) 5,0 phút ở 95°C, (2) 3 chu trình 1,0 phút ở 95°C + 2,0 phút 15 giây ở 46°C + 1,0 phút 15 giây ở 72 °C, 30 chu trình 35 giây ở 95°C + 1,0 phút 15 giây ở 46°C + 1,0 phút 15 giây ở 72°C, (4) cuối cùng 7,0 phút 72°C (De Bruyne *et al.*, 2008). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách lấy 5 µl sản phẩm PCR với 2,0 µl của loading dye, điện di trên gel agarose 1,0% ở 75V trong 45 phút. Marker sử dụng là SmartLadder, Eurogentec, Searing, Bỉ. Sau khi kiểm tra nếu sản phẩm PCR có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen *pheS* sẽ được tinh sạch nhờ hệ thống màng lọc Nucleofast 96 PCR (Macherey - Nagel). Để giải trình tự gen *pheS* sản phẩm PCR vừa tinh sạch ở trên sẽ được chạy PCR lần thứ hai. Thể tích PCR là 10 µl gồm 3,0 µl sản phẩm PCR đã được tinh sạch, 1,857 µl nước cất, 1,857 µl dung dịch đệm chạy trình tự, mồi 3,0 µl (4,0 µM) mồi *pheS* 21F và mồi *pheS* 21R tách biệt, Bigdye 0,286 µl. Chương trình nhiệt gồm 30 chu trình 15 giây ở 96°C + 1,0 giây ở 35°C + 4,0 phút ở 60°C. Sau đó 10 µl sản phẩm PCR cho mồi xuôi và 10 µl sản phẩm PCR cho mồi ngược được chuyển vào 2 giếng của đĩa 96 giếng và thêm 45 µl sung dịch SAM, 10 µl XTerm. Giải trình tự được thực hiện nhờ máy ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem) (Nguyen *et al.*, 2013).

Phân tích trình tự gen pheS và xác định loài

Số liệu trình tự thô được chuyển đến AutoAssemble 1.40 (Applied Biosystem), trình tự liên tục của gen *pheS* được xác định bằng chương trình Bionumeric 5.1 (Applied Maths). Giá trị tương đồng của loài và cây phân loại được tạo ra dựa vào phương pháp neighbourjoining và maximum- parsimony (Saitou *et al.*, 1987). Trình tự gen so sánh với các loài trong ngân hàng gen BCCM/LMG của Đại học Gent (Gent, Bỉ), so sánh chuỗi DNA này với ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế (EMBL) và thực hiện nhờ sử dụng chương trình FASTA để xác định loài có mối liên quan gần nhất đã biết của trình tự trong phần gen *pheS* (Nguyen *et al.*, 2013).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn các chủng có khả năng sinh cellulase

Tiến hành nuôi 120 chủng vi khuẩn lactic trên môi trường MRS lỏng trong 48 h ở 30°C. Khả năng sinh cellulase được đánh giá qua đường kính vòng phân giải cơ chất.

Bảng 1. Các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh cellulase ngoại bào

STT	Nguồn phân lập	Ký hiệu chủng	Số lượng chủng	Chủng có khả năng sinh cellulase ngoại bào
1	Dưa muối	DM4.1 - DM4.40	40	15
2	Cà muối	DC4.1 - DC4.40	40	11
3	Nem chua	DP4.1- DP4.40	40	14
Tổng			120	40

Bảng 2. Các chủng vi khuẩn lactic có đường kính vòng phân giải cơ chất CMC lớn

STT	Ký hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải (D-d)mm	STT	Ký hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải (D-d)mm
1	DM4.38	11,0	6	DC4.3	13,9
2	DP4.2	12,4	7	DM4.26	14,0
3	DC4.11	12,9	8	DC4.17	14,4
4	DP4.39	13,2	9	DM4.35	14,8
5	DC4.21	13,5	10	DP4.8	15,0

Ghi chú: Chủng DP4.8 có khả năng sinh cellulase ngoại bào với đường kính vòng phân giải cao nhất tiếp tục được nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh cellulase.

Kết quả chỉ ra trong 120 chủng có 40 chủng có khả năng sinh cellulase ngoại bào (Bảng 1), trong đó 10 chủng có đường kính vòng phân giải cơ chất CMC cao đạt từ 11 - 15 mm (Bảng 2).

Theo nghiên cứu của Đào Thị Lương và cs. (2010) đã chỉ ra đường kính vòng phân giải cellulase của vi khuẩn lactic được phân lập từ cỏ, ngô, nước bún là từ 8,0 - 12 mm. Khả năng sinh cellulase ngoại bào của các hai nghiên cứu có khác nhau, điều này có thể lý giải là do nguồn phân lập vi khuẩn lactic khác nhau nên khả năng sinh enzyme của chúng cũng khác nhau.

3.2. Xác định ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh cellulase ngoại bào của chủng được tuyển chọn

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất CMC đến khả năng sinh cellulase

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng CMC thường được chọn làm cơ chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn để kích thích tăng tiết cellulase trong quá trình nuôi cấy (Shaikh *et al.*, 2013; Arijit *et al.*, 2010, Ngô Tự Thành và cs., 2009). Chính vì vậy, bài báo này đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ cơ chất CMC đến khả năng sinh cellulase của chủng DP4.8. Kết quả thu được trình bày tại bảng 3 và hình 1.

Chủng DP4.8 khi nuôi cấy trên môi trường 2 là môi trường MRS có bổ sung 1,0% cơ chất CMC cho hoạt tính celllulase cao nhất thể hiện qua đường kính vòng phân giải cơ chất đạt 16,5 mm, tiếp đó môi trường 1 có bổ sung 0,5% CMC (16 mm), sau đó đường kính vòng phân giải giảm dần khi tăng nồng độ cơ chất CMC từ 1,5% (11 mm) và 2,0% (10 mm).

Kết quả này cũng tương tự như một số kết quả nghiên cứu trước đó của Ngô Tự Thành và cs. (2009), hoạt tính cellulase trong muôi trường nuôi cấy vi khuẩn tăng khi môi trường có bổ sung CMC 1,0%. Ngoài ra, Shaikh *et al.* (2013) cũng đã cho thấy chủng vi khuẩn CDB30 có hoạt tính enzyme cellulase cao nhất khi môi trường có bổ sung nồng độ cơ chất 1,0%, sau đó giảm dần ở 1,5%.

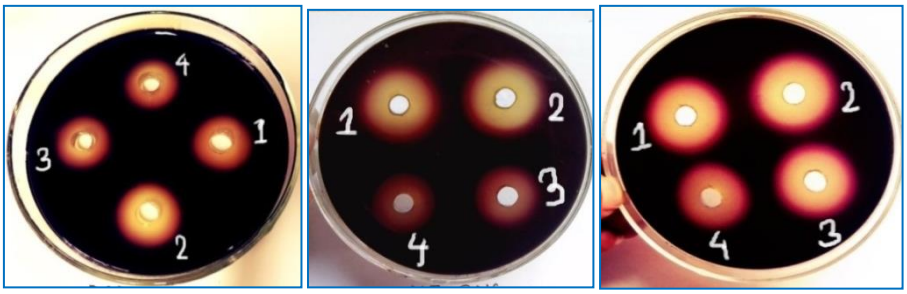
Như vậy, để tăng lượng enzyme sinh ra trong môi trường nuôi cấy có thể bổ sung nồng độ cơ chất vào môi trường nuôi cấy nhưng chỉ nên bổ sung ở một nồng độ thích hợp nếu không chúng cũng là nguyên nhân ức chế sự hình thành enzyme.

3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme ngoại bào

Nhiệt độ nuôi cấy là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật nói chung, của vi khuẩn lactic nói riêng và

Bảng 3. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi khuẩn lactic được tuyển chọn

Yếu tố điều kiện môi trường	Giá trị khác nhau	Đường kính vòng phân giải (D-d)mm
Nồng độ cơ chất CMC (%)	0,5	16
	1,0	16,5
	1,5	11
	2,0	10
Nhiệt độ (°C)	30	17
	37	18
	44	12
	51	10,2
Thời gian nuôi cấy (h)	24	18,5
	36	19
	48	18
	52	12,5



A B C

Hình 1. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh cellulase ngoại bào của các chủng DP4.8

Ghi chú: A. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất CMC 1. 0,5%; 2. 1,0%; 3. 1,5%; 4. 2,0%; B. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy 1. 30°C; 2. 37°C; 3. 44°C; 4. 51°C; C. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy 1. 24 h; 2. 36 h; 3. 48 h; 4. 52 h.

sự tạo thành enzyme của chúng. Nhiệt độ nuôi cấy quá cao hay quá thấp đều có thể gây ức chế các enzyme, làm đình trệ phản ứng trao đổi chất và do đó ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Vì vậy, để tìm ra giá trị nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển và khả năng sinh enzyme của vi khuẩn lactic, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng sinh enzyme. Kết quả bảng 3 và hình 1 cho thấy, khoảng nhiệt độ thích hợp nhất cho chủng DP4.8 sinh cellulase là ở nhiệt độ 37°C (đường kính vòng phân giải 18 mm). Nuôi cấy ở nhiệt độ 44°C chủng DP4.8 vẫn có khả năng sinh enzyme nhưng khả năng sinh enzyme yếu dần đặc biệt ở 51°C (đường kính vòng phân giải 10,2 mm). Theo nghiên cứu trước đó ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh cellulase ngoại bào của chủng vi khuẩn lactic G5 được phân lập từ bã dong riềng tốt là khi được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C (Nguyễn Thị Thu và cs., 2018).

3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme ngoại bào

Kết quả được trình bày như bảng 3 và hình 1 cho thấy thời gian nuôi cấy thích hợp nhất để chủng có sinh cellulase cao là trong khoảng thời gian 24 - 48 h nhưng đặc biệt là 36 h được thể hiện ở đường kính vòng phân giải lớn nhất (19 mm). Kết quả này cũng tương tự với các nghiên cứu trước đó của Nguyễn Thị Thu và cs. (2018) cho rằng các chủng vi khuẩn lactic sinh cellulase cao cũng ở thời gian 36 h.

3.3. Sản phẩm PCR đoạn gen *pheS* của chủng DP4.8

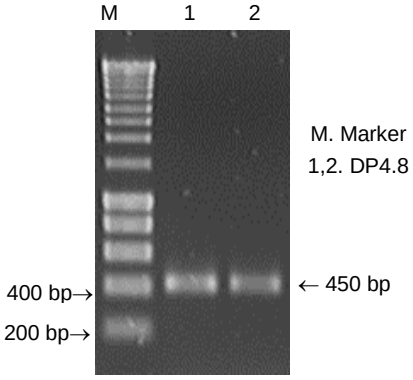
Sau khi DNA của chủng DP4.8 tách chiết, tiến hành nhân đoạn gen *pheS* với các đoạn mồi và theo các bước như phần 2.5. Sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 1,0%.

Kết quả điện di sản phẩm PCR đã thu được một băng khoảng 450 bp (Hình 2) tương ứng với kích thước của đoạn gen *pheS* (Naser *et al.,* 2005). Như vậy, khuếch đại đoạn gen *pheS* của chủng DP4.8 đã cho kết quả tốt.

3.4. Giải trình tự DNA của chủng DP4.8 và xác định loài

Sau khi kiểm tra nếu sản phẩm PCR có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen *pheS* sẽ được tinh sạch, chạy PCR với mồi *pheS* 21F và mồi *pheS* 21R tách biệt và sử dụng chương trình nhiệt như đã miêu tả trong phần 2.2.2.

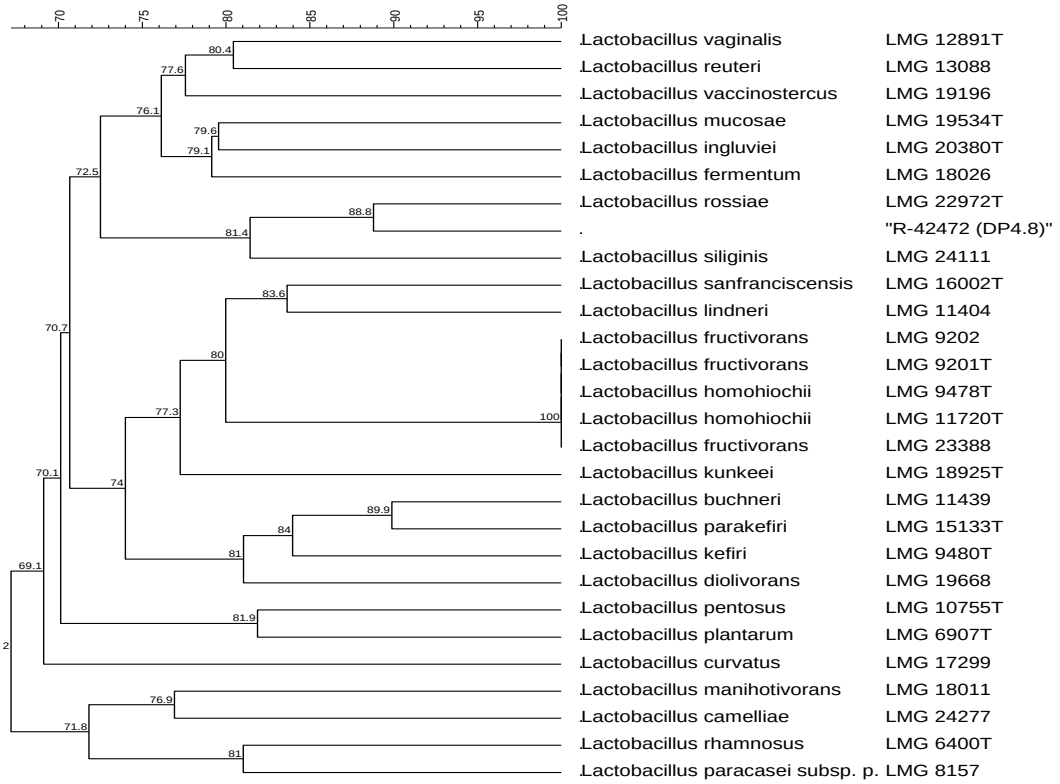
Trình tự của chủng này được so sánh với các loài trong ngân hàng gen BCCM/LMG của Đại học Ghent (Ghent, Bỉ) và đoạn DNA này được so sánh với ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế (EMBL) nhờ sử dụng chương trình FASTA để xác định loài có mối liên quan gần nhất đã biết trình tự trong phần gen *pheS*. Kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 3.



Hình 2. Sản phẩm PCR đoạn gen *pheS* của chủng DP4.8 trên gel agarose 1,0 %

Bảng 4. Xác định loài của chủng DP4.8 nhờ so sánh với ngân hàng trình tự nucleotide (EMBL)

Chủng	Loài có mối quan hệ gần nhất	% ID	Accession numbers
DP4.8	*Lactobacillus rossiae*	98,2	EM_PRO:AM745669
	Lactobacillus rossiae	98,2	EM_PRO:AM905913
	Lactobacillus rossiae	88,5	EM_PRO:AM745668
	Lactobacillus siligionis	82,2	EM_PRO:AM932124



Hình 3. Cây phát sinh chủng loài của DP4.8 được so sánh với các loài trong ngân hàng gen *pheS* của BCCM/LMG của Đại học Gent (Vương quốc Bỉ)

Như vậy, khi so sánh trình tự gen *pheS* của chủng DP4.8 với ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế (EMBL) sử dụng chương trình FASTA thì chủng này có mối quan hệ gần nhất với loài *Lactobacillus rossiae* (giống về trình tự 98,2%), sau đó đến loài *Lactobacillus siligionis* (82,2%) (Bảng 4). Như vậy, chủng này thuộc loài *Lactobacillus rossiae*. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả khi so sánh trình tự gen *pheS* của các loài vi khuẩn trong ngân hàng gen của BCCM/LMG của Đại học Ghent (Ghent, Bỉ). Khi đưa đến ngân hàng gen của BCCM/LMG của Đại học Gent, Bỉ thì chủng DP4.8 được nhận một số R-42472 (DP4.8). Ở ngân hàng gen này chủng DP4.8 có trình tự tương đồng là 88,8% với LMG22972T chủng này thuộc loài *Lactobacillus rossiae*. Trong khi đó chủng DP4.8 có trình tự tương đồng 81,4% với LMG 24111 (*Lactobacillus siligionis*) (Hình 3). Qua các kết quả trên thì có thể phân loại chủng DP4.8 thuộc loài *Lactobacillus rossiae*. Theo nghiên cứu trước *Lactobacillus rossiae* là một loài an toàn đã được ứng dụng trong công nghệ chế biến thực phẩm như trong lên men tinh bột để sản xuất bánh mỳ (Cagno *et al.,* 2007).

4. KẾT LUẬN

Từ 120 chủng vi khuẩn lactic đã tuyển chọn được 10 chủng sinh cellulase ngoại bào cao với đường kính vòng phân giải cơ chất từ 11 - 15 mm. Trong đó, chủng DP4.8 có khả năng sinh cellulase cao nhất với vòng phân giải cơ chất đạt 15 mm. Nghiên cứu đã xác định nồng độ cơ chất carboxymethyl cellulose (CMC) 1,0%, nhiệt độ cấy 37°C, thời gian nuôi cấy 36 h là điều kiện thích hợp để chủng DP4.8 sinh cellulase cao. Bằng phương pháp phân tích trình tự gen *pheS,* tên loài của chủng DP4.8 được xác định là *Lactobacillus rossiaes* với hoạt tính sinh cellulase cao có triển vọng ứng dụng trong công nghệ sản xuất thực phẩm như công nghệ sản xuất đồ uống gồm bia, rượu vang, và nước quả.

LỜI CẢM ƠN

Xin cảm ơn sự hợp tác của Phòng thí nghiệm Vi sinh vật, Trường đại học Ghent, Bỉ đã tạo điều kiện để nhóm nghiên cứu thực hiện một số nội dung trong bài báo này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahamed A., and Vermette P. (2008). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. Biochemical Engineering Journal, 40(3): 399-407.

Ali U. F., and Saad E. H. S. (2008). Production and partial purification of cellulase complex by *Aspergillus niger* and *A. nidulans* grown on water hyacinth blend. Journal of Applied Sciences Research, 4(7): 875-891.

Arijit D., Sourav B., and Lakshmi, M. (2010). Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from cow Dung. Journal Agriculture and Enviromental Sciencies, 8(6): 685-691.

Cagno R. D., Angelis M. D., Gallo G., Settanni L., Berloco M.G., Siragusa S., Parente E., Corsetti A. and Gobbetti M. (2007). Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rossiae* strains isolated from sourdough. Journal of Applied Microbiology, 103(4): 821-35.

Camassola M., and Dillon A. J. P. (2007). Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugarcane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. Journal of applied microbiology, 103(6): 2196-2204.

Chandara S. K. R., Snishamol C., and Prabhu N. G. (2005). Cellulase production by native bacteria using water hyacinth as substrate under solid state fermentation. Malaysian Journal of Microbiology, 1(2): 25-29.

De Bruyne K., Franz C. M. A.P., Vancanneyt M., Schillinger U., Mozzi F., Valdez G.F. de., De Vuyst L. and Vandamme P. (2008). *Pediococcus argentinicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by *pheS*, *rpoA* and *atpA* sequence analysis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(12): 2909-2916.

Nguyễn Lân Dũng, Đoàn Xuân Mượn, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch và Phạm Văn Ty (1976). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập 2, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.

Nguyễn Thị Lâm Đoàn, Ngô Xuân Mạnh, Nguyễn Thị Đà, Vũ Thị Hằng và Nguyễn Xuân Bắc (2011). Phân tích trình tự gen *pheS* cho việc xác định loài vi khuẩn lactic sinh bacteriocin. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 49 (1): 93-99.

Gevers D., Huys G., and Swings J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for

identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiology Letters, 205(1):31-36.

Han S.O., Yukawa H., Inui M. and Doi R.H. (2003). Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase gens in *Clostridium cellulovorans*. Journal of Bacteriology, 185(20): 6067-6075.

Kondakindi V, R., Tatiparti V., Pabbati R., and Maddela N. (2017). Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from pulp and paper mill effluent contaminated soil. Brazilian archives of Biology and Technology, 60: 1-6.

Đào Thị Lương, Nguyễn Thị Anh Đào, Nguyễn Thị Kim Quy, Trần Thị Lệ Quyên, Dương Văn Hợp, Trần Quốc Việt, Ninh Thị Len và Bùi Thị Thu Huyền (2010). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic dùng trong chế biến và bảo quản thức ăn thô xanh và phụ phẩm nông nghiệp cho gia súc nhai lại. Di truyền học và ứng dụng - Chuyên san Công nghệ sinh học, 6: 1-6.

Naser S.M., Dawyndt P., Hoste B., Gevers D., Vandemeulebroecke K., Cleenwerck I., Vancanneyt M., and Swings J. (2007). Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gen sequence analyses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(12): 2777-2789.

Naser S.M., Thompson F. L., Hoste B., Gevers D., Dawyndt P., Vancanneyt M., and Swings J (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. Microbiology, 151: 2141-2150.

Nguyen T. L. D., Van H. K., Cnockaert M., De B. E., Maarten A., Le T. B., Vandamme P. (2013). A culture-dependent and -independent approach for the identification of lactic acid bacteria associated with the production of nem chua, a Vietnamese fermented meat product. Journal of Food Research International, 50: 232 -240

Nguyen H., Elegado F., Librojo-Basilio N., Mabesa R. and Dizon E. (2010). Isolation and characterisation of selected lactic acid bacteria for improved processing of Nem chua, a traditional fermented meat from Vietnam. Beneficial Microbes, 1: 67-74.

Ramesh C, K, Rishi G, and Ajay S (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. Enzyme Research, pp. 1-10

Samley Man and Nguyen Thi Thanh Thuy (2017). Screening and characterization of cellulase produced by *Bacillus* spp. Vietnam Journal of Agricultural Sciences, 15(9): 1105-1212.

Sa-Pereira P., Paveia H., Costa-Ferreira M. and Aires-Barros M.R. (2003). A new look at xylanases: An overview of purification strategies. Molecular Biotechnology, 24: 257-281.

Saitou N., and Nei M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogentic trees. Molecular Biology and Evolution, 4(4): 406-425.

Shaikh N. M., Patel A. A., Mehta S. A., and Patel N. D. (2013). Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. Universal Journal of Environmental Research and Technology 3(1): 39-49

Scheirlinck I., Van der Meulen R., Van Schoor A., Cleenwerck I., Huys G., Vandamme P., De Vuyst L and Vancanneyt M. (2007). *Lactobacillus namurensis* sp. nov., isolated from a traditional Belgian sourdough. Int J Syst Evol Microbiol, 57: 223-227.

Schleifer K.H., Ehrmann M., Beimfohr C., Brockmann E., Ludwig W and Amann R (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 5: 1081-1094.

Ngô Tự Thành, Bùi Thị Việt Hà, Vũ Minh Đức và Chu Văn Mẫn (2009). Nghiên cứu hoạt tính enzym ngoại bào của một số chủng *Bacillus* mới phân lập và khả năng ứng dụng chúng trong xử lý nước thải. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 25: 101-106

Nguyễn Thị Thu, Trần Liên Hà, Nguyễn Chí Dũng (2018). Tuyển chọn, định tên và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp cellulase cao, có hoạt tính probiotic. Tạp chí khoa học và công nghệ lâm nghiệp, 1: 11-18

Van Hoorde K., Verstraete T., Vandamme P., and Huys G. (2008). Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. Food Microbiology, 25: 929-935.

Zahangir A. M., Nurdina M., and Erman M. M. (2005). Production of cellulase enzyme from oil palm biomass as substrate by solid state bioconversion. American Journal of Applied Sciences, 2: 569-572.