

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN SINH TỔNG HỢP CELLULASE CỦA HAI CHỦNG VI KHUẨN TH-VK22 VÀ TH-VK24

NGUYỄN NGỌC AN, NGUYỄN MỘC TẤN, NGUYỄN TRUNG THẾ HIỀN,
NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH, PHẠM TẤN VIỆT

Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh
phamtanviet@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Vi sinh vật có vai trò quan trọng trong tuần hoàn vật chất trong sinh quyển, đặc biệt là tham gia vào việc xử lý các chất có nguồn gốc từ xác bã thực vật. Việc tuyển chọn các chủng vi sinh vật và khảo sát điều kiện tốt nhất cho sự sản sinh cellulase của vi sinh vật là cần thiết để tạo cơ sở cho việc xử lý các vật chất có nguồn gốc từ thực vật tương ứng. Trong nghiên cứu này, 37 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ nhiều nguồn gốc khác nhau, trong đó hai chủng vi khuẩn TH-VK22 và TH-VK24 có nguồn gốc từ rơm và mùn cưa sau trồng nấm đã được tuyển chọn và định danh thuộc loài *Bacillus subtilis*, được đặt tên tương ứng là *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24. Cả hai chủng vi khuẩn này đều thể hiện khả năng sinh tổng hợp cellulase trong môi trường có điều kiện pH 4,0 tại 35°C với 1% chất cảm ứng rơm cho *B. subtilis* TH-VK22 và 2% mùn cưa cho *B. subtilis* TH-VK24, cho thấy tiềm năng xử lý cellulose trong môi trường acid của hai chủng vi khuẩn này.

Từ khóa. *Bacillus subtilis*, cellulase, enzyme ngoại bào, phân hủy cellulose.

ISOLATION, SELECTION AND ENHANCED CELLULASE PRODUCTION OF TH-VK22 AND TH-VK24 BACTERIAL STRAINS

Abstract. Microorganisms play an important role in the movement of nutrients through the biosphere, especially in conversion of plant-derived residues and wastes. Therefore, selection of bacterial strains and investigating the conditions for enhanced production of cellulase are necessary to provide a basis for the treatment of relevant plant-derived materials. In this study, of out 37 bacterial isolates, two strains TH-VK22 and TH-VK24 were selected for their high capacity of cellulase production. These two strains were later characterized and identify as *Bacillus subtilis*, namely *B. subtilis* TH-VK22 and *B. subtilis* TH-VK24. Both strains showed the ability to highly produce cellulase in a medium with a start pH of 4.0 at 35°C with 1% straw for TH-VK22 and 2% sawdust for TH-VK24, which showed the potential applications of these two bacterial strains in cellulose treatment in the acidic environment.

Keywords. *Bacillus subtilis*, cellulase, extracellular enzyme, cellulose degradation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cellulose là hợp chất polymer sinh học phong phú nhất trong tự nhiên, chúng được cấu tạo từ 8.000 đến 12.000 đơn vị đơn phân glucose liên kết với nhau thông qua liên kết β -1,4 glycoside và được tìm thấy trong vách tế bào của các loại thực vật và tảo [1, 2]. Cellulose được xem là nguồn năng lượng sinh học giá thành thấp, có khả năng tái tạo để thay thế cho các nguồn nhiên liệu hóa thạch đang ngày càng cạn kiệt, điều này rất quan trọng cho sự phát triển bền vững của nhân loại [3, 4]. Trong nhiều lĩnh vực khác nhau, việc phân hủy cellulose với sự xúc tác của các cellulase tạo ra cellobiose và glucose là một bước quan trọng và cần thiết. Các cellulase thường được chia thành 3 nhóm chính dựa vào cơ chế phân giải cellulose: các endoglucanase (endo-1,4- β -D-glucan-4-glucanohydro, EC 3.2.1.4) xúc tác sự thủy phân ngẫu nhiên các liên kết β -1,4-glycoside bên trong phân tử cellulose, các exoglucanase hay cellobiohydrolase (exo-1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91) xúc tác giải phóng cellobiose hay glucose từ đầu không khử của cellulose, và β -glucosidase hay cellobiase (EC 3.2.1.21) xúc tác giải phóng

glucose từ cellobiose và các celloedextrin tan trong nước [5]. Sự thủy phân cellulose được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như làm mềm vải trong công nghệ dệt, sản xuất các chất tẩy rửa, xử lý môi trường, ứng dụng trong công nghệ thực phẩm, loại bỏ mực trong công nghệ sản xuất giấy, ứng dụng trong công nghệ dược liệu, ... [6-9]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng đã cho thấy ứng dụng cellulase trong công nghệ sản xuất nhiên liệu sinh học và còn sinh học từ các bã thải thực vật [10, 11].

Cellulase có thể thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau và chủ yếu được sản xuất từ các chủng vi sinh vật như vi khuẩn và nấm [12-15]. Các nguyên liệu được sử dụng trong sản xuất cellulase từ các vi sinh vật thường là các rác thải thực vật rẻ tiền, số lượng lớn và thân thiện môi trường như thân cây chuối, bã mía, rom rạ, lõi bắp, bã thải cây cọ dầu, cây bông vải, ... [16-20]. Cellulase được sản xuất từ vi khuẩn được xem là chất xúc tác tốt do chúng ít bị hạn chế bởi các nguyên liệu và quy trình sản xuất đơn giản [21, 22]. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để xây dựng quy trình sản xuất cellulase từ các vi khuẩn khác nhau, trong đó các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được ứng dụng nhiều nhất do các đặc tính nổi trội về khả năng sống mạnh mẽ trong các môi trường do sự hình thành các bào tử, nhu cầu dinh dưỡng thấp, khả năng tiết enzyme ngoại bào cao và có khả năng chịu nhiệt thích hợp cho việc ứng dụng trong các ngành công nghiệp khác nhau [3, 23, 24].

Việt Nam là đất nước nông nghiệp với lượng rác thải thực vật ra nhiều và đa dạng, việc phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sản sinh ra cellulase cao và khảo sát các điều kiện sinh tổng hợp enzyme này là cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp cellulase ngoại bào có hoạt tính cao và xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình sản xuất cellulase của các chủng tuyển chọn được. Nghiên cứu này tạo cơ sở cho việc xử lý chất thải thực vật tạo ra các sản phẩm có giá trị ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau.

2. VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn phân giải cellulose

Các mẫu đất dưới lớp lá cây mục được thu thập ở địa bàn xã Hưng Khánh Trung A, huyện Mỏ Cày Bắc, tỉnh Bến Tre. Mẫu đất sau đó được pha loãng trong nước muối sinh lý và trải trên môi trường Cao thịt-peptone (cao thịt 1,5 g/L, peptone 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 20 g/L) có bổ sung 0,5% CMC, ủ ở 37°C trong 72 giờ. Các khuẩn lạc riêng rẽ có khả năng tạo vòng phân giải cellulose (CMC) khi có sự hiện diện của dung dịch lugol được chọn và cấy rìa liên tiếp 3 lần trong cùng môi trường và điều kiện như trên để làm thuần.

2.2. Đánh giá sơ bộ khả năng phân giải cellulose

Khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose được nuôi cấy trong môi trường Cao thịt-peptone ở 37°C cho đến khi OD_{600nm} đạt khoảng 0,6 và 2 μ l dịch huyền phù được nhỏ vào đĩa thạch Cao thịt-peptone + 0,5% CMC, ủ ở 37°C trong 72 giờ. Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi khuẩn được xác định bằng cách so sánh độ lớn vòng phân giải $A = D - d$ với D là đường kính vòng phân giải và d là đường kính khuẩn lạc. Chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose mạnh nhất sẽ được chọn để nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự sinh tổng hợp cellulase.

2.3. Định danh vi khuẩn

Chủng vi khuẩn lựa chọn được định danh sơ bộ thông qua đánh giá đặc điểm khuẩn lạc, nhuộm Gram, nhuộm bào tử và kiểm tra khả năng sinh catalase. Chủng vi khuẩn được định danh ở mức phân tử bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA bởi phòng thí nghiệm Công nghệ động vật (Trường Đại học Konkuk, Seoul, Hàn quốc) với cặp mồi được sử dụng là 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' với phương trình PCR như sau 95°C - 5 phút, 30 chu kỳ tiếp theo (95°C - 30 giây; 55°C - 40 giây; 72°C - 90 giây) và 72°C - 5 phút. Kết quả giải trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu 16S-rRNA của vi khuẩn có sẵn trên National Center for Biotechnology Information (NCBI) bằng công cụ BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.4. Xác định hoạt độ cellulase bằng phương pháp Bernfeld

Phương pháp này dựa trên cơ sở sử dụng thuốc thử 3,5-acid dinitrosalicylic (DNS) có màu vàng sau khi cho phản ứng với đường khử (sản phẩm thủy phân của cellulose) sẽ tạo thành 3-amino,5-nitro salicylic

acid màu đỏ cam có khả năng hấp thụ cực đại bước sóng 540 nm và có cường độ tỷ lệ thuận với lượng đường khử được tạo ra nhờ sự xúc tác của cellulase. Dịch nuôi cấy vi khuẩn sau khi đã ly tâm loại tế bào (13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C) được cho phản ứng với dung dịch CMC 1% trong 1 giờ và thuốc thử DNS được thêm vào để xác định lượng đường khử được giải phóng. Đơn vị hoạt tính (UI) của cellulase được xác định bằng lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 micromole đường khử ở 50°C trong 1 phút [25].

2.5. Khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự sinh tổng hợp cellulase của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn được hoạt hóa qua đêm trong môi trường Cao thịt-peptone ở 37°C được pha loãng 10 lần và nuôi cấy lắc 150 vòng/phút ở 37°C trong cùng môi trường có bổ sung các chất cảm ứng với nồng độ chất cảm ứng khác nhau, ở những điều kiện pH ban đầu và nhiệt độ khác nhau. Hoạt tính cellulase của dịch nuôi cấy sau khi loại bỏ tế bào được xác định sau mỗi 12 giờ nuôi cấy bằng phương pháp Bernfeld.

Để khảo sát ảnh hưởng của các loại chất cảm ứng, môi trường thử nghiệm được sử dụng là Cao thịt-peptone có bổ sung 1% một trong 4 loại chất cảm ứng: rơm, mùn cưa, xơ dừa, CMC.

Chất cảm ứng cho hoạt tính cellulase của dịch nuôi cấy cao nhất sẽ được chọn để tiếp tục khảo sát sự ảnh hưởng của pH ban đầu: Môi trường thử nghiệm có bổ sung 1% chất cảm ứng thích hợp được điều chỉnh ở các giá trị pH ban đầu khác nhau 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 ± 0,1.

Giá trị pH ban đầu của môi trường nuôi cấy cho hoạt tính cellulase cao nhất sẽ được chọn để tiếp tục khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy: chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường thử nghiệm có bổ sung 1% chất cảm ứng và pH ban đầu thích hợp được nuôi ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C ± 0,1°C.

Điều kiện nhiệt độ nuôi cấy cho hoạt tính cellulase cao nhất sẽ được chọn để tiếp tục khảo sát sự ảnh hưởng nồng độ chất cảm ứng: chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường thử nghiệm bổ sung chất cảm ứng được chọn ở các nồng độ khác nhau 0%, 1%, 2%, 3%, 4% trong điều kiện nhiệt độ và pH ban đầu thích hợp.

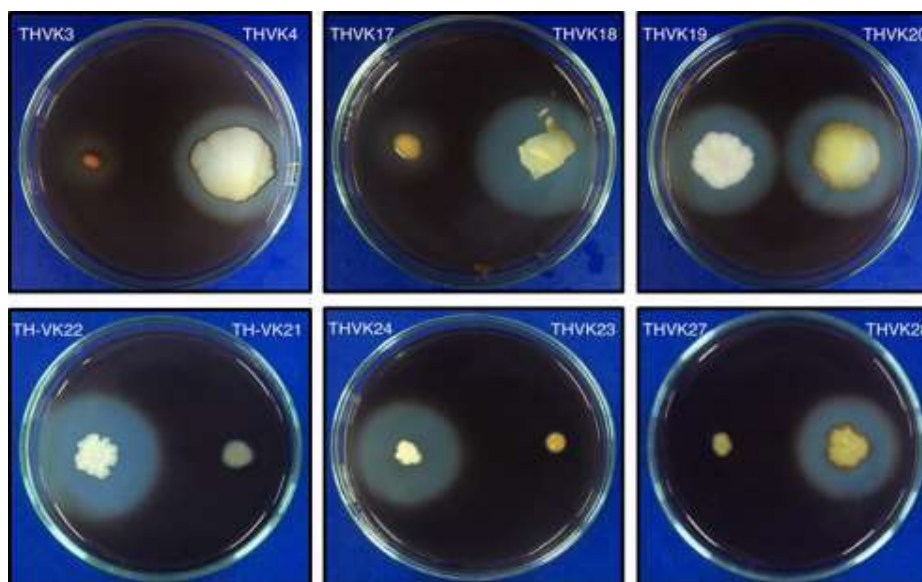
2.6. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Giá trị kết quả của các thí nghiệm là trung bình của 3 lần lặp lại. Số liệu được tính toán, vẽ biểu đồ trên Microsoft Excel 2013 và được xử lý thống kê bằng phương pháp ANOVA bằng phần mềm Statgraphics Centurion 18.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính cellulase

Các chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất thu thập từ nhiều địa phương khác nhau thuộc tỉnh Bến Tre, trên môi trường Cao thịt-pepton có bổ sung 0,5% CMC và nuôi ở 37°C trong 72 giờ. Kết quả phân lập được 37 chủng vi khuẩn khác nhau có thể sinh trưởng và phát triển trên môi trường chọn lọc và được đặt tên theo thứ tự TH-VK01 đến TH-VK37. Kết quả sàng lọc với dung dịch lugol cho thấy có 18 chủng vi khuẩn có khả năng hình thành vòng phân giải CMC với đường kính từ 0,3-1,5 cm. Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải CMC mạnh được thể hiện trong hình 1 và độ lớn vòng phân giải được thể hiện trong bảng 1 và hình 2. Các chủng vi khuẩn thể hiện độ lớn vòng phân giải nhỏ hơn 0,3 cm được xem như khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào không đáng kể (19 chủng).

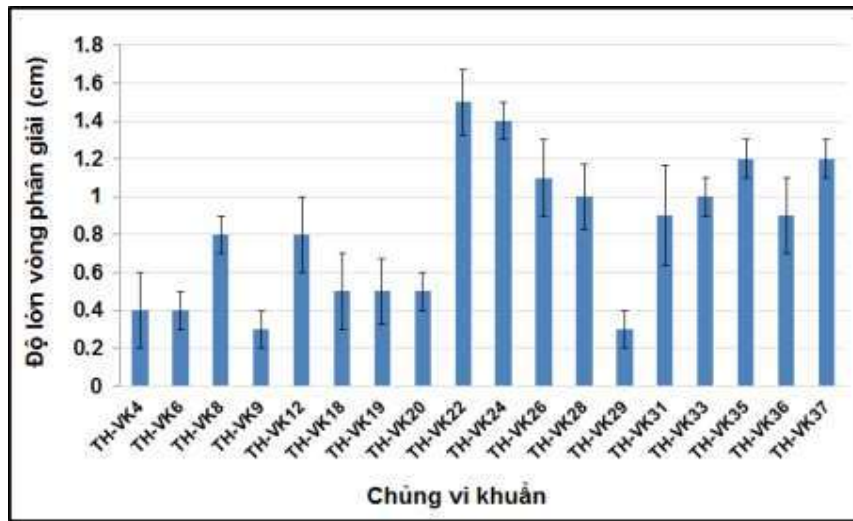


Hình 1. Khả năng phân giải cellulose của một số chủng vi khuẩn phân lập được.

Dựa trên kết quả được thể hiện ở bảng 1 và hình 2, trong số 18 chủng vi khuẩn thể hiện khả năng phân giải CMC thì hai chủng TH-VK22 và TH-VK24 cho thấy khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào tốt nhất với đường kính vòng phân giải tương ứng $1,5 \pm 0,2$ và $1,4 \pm 0,1$ cm, hai chủng vi khuẩn TH-VK35 và TH-VK37 cho đường kính vòng phân giải $1,2 \pm 0,1$ cm, trong khi các chủng còn lại có vòng phân giải thấp hơn. Kết quả phân tích thống kê cho thấy có sự khác biệt đáng kể của độ lớn vòng phân giải CMC của chủng TH-VK22 và TH-VK24 so với phần lớn các chủng còn lại (ANOVA, $n=3$, độ tin cậy 95%). Do đó, hai chủng vi khuẩn TH-VK22 và TH-VK24 được tuyển chọn cho các thí nghiệm khảo sát điều kiện sinh tổng hợp cellulase tiếp theo.

Bảng 1: Độ lớn vòng phân giải CMC của các chủng vi khuẩn phân lập được

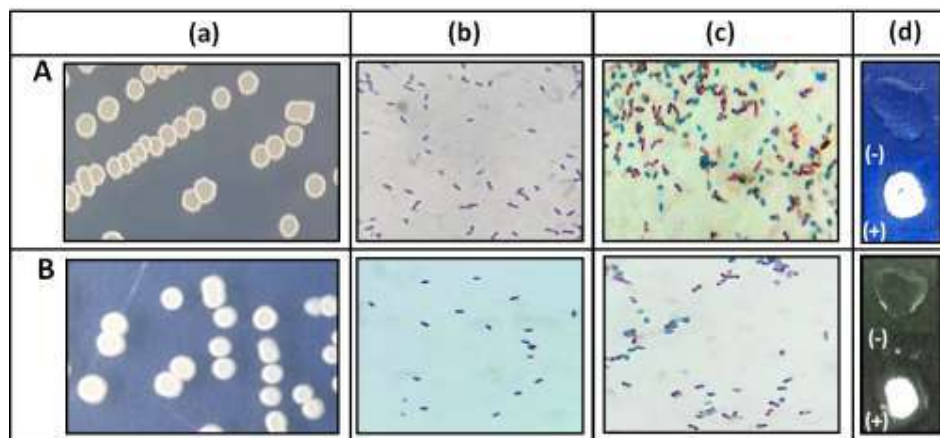
Chủng vi khuẩn	Độ lớn vòng phân giải A (cm)	Chủng vi khuẩn	Độ lớn vòng phân giải A (cm)
TH-VK4	$0,4 \pm 0,2$	TH-VK24	$1,4 \pm 0,1$
TH-VK6	$0,4 \pm 0,1$	TH-VK26	$1,1 \pm 0,2$
TH-VK8	$0,8 \pm 0,1$	TH-VK28	$1,0 \pm 0,2$
TH-VK9	$0,3 \pm 0,1$	TH-VK29	$0,3 \pm 0,1$
TH-VK12	$0,8 \pm 0,2$	TH-VK31	$0,9 \pm 0,3$
TH-VK18	$0,5 \pm 0,2$	TH-VK33	$1,0 \pm 0,1$
TH-VK19	$0,5 \pm 0,2$	TH-VK35	$1,2 \pm 0,1$
TH-VK20	$0,5 \pm 0,1$	TH-VK36	$0,9 \pm 0,2$
TH-VK22	$1,5 \pm 0,2$	TH-VK37	$1,2 \pm 0,1$



Hình 2. Độ lớn vòng phân giải CMC của một số chủng vi khuẩn phân lập được

3.2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, vi thể và định danh vi khuẩn TH-VK22 và TH-VK24

Hai chủng vi khuẩn tiềm năng sinh tổng hợp cellulase TH-VK22 và TH-VK24 được kiểm tra các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, nhuộm Gram, khả năng hình thành bào tử, đặc điểm sản sinh catalase và so sánh trình tự đoạn gen mã hóa cho 16S-rRNA để xác định vị trí phân loại của hai chủng vi khuẩn này. Hình thái khuẩn lạc của hai chủng vi khuẩn được quan sát sau khi nuôi ủ trên môi trường Cao thịt-pepton ở 37°C trong 72 giờ (Hình 3-a). Khuẩn lạc chủng TH-VK22 có kích thước 0,3-0,5 cm, trong khi khuẩn lạc chủng TH-VK24 có kích thước nhỏ hơn 0,2-0,4 cm, các khuẩn lạc đều có màu trắng đục, rìa không đều và gồ cao, bề mặt nhẵn, lõm phần tâm. Kết quả nhuộm Gram cho thấy cả hai chủng vi khuẩn này đều hình que và thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương (Hình 3-b). Khả năng hình thành nội bào tử của hai chủng vi khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp nhuộm với malachite green và safranin. Kết quả cho thấy cả hai chủng TH-VK22 và TH-VK24 đều hình thành nội bào tử với tế bào sinh dưỡng màu xanh và nội bào tử màu đỏ (hình 3-c). Ngoài ra, khả năng sinh enzyme catalase của hai chủng cũng được kiểm tra và xác nhận (hình 3-d).



Hình 3. Hình thái đại thể và vi thể của 2 chủng vi khuẩn TH-VK22 (A) và TH-VK 24 (B). (a) Hình thái khuẩn lạc trên môi trường Cao thịt-pepton sau 72 giờ nuôi ủ ở 37°C (b) Hình ảnh nhuộm Gram ở độ phóng đại X1.000. (c) Hình ảnh nhuộm bào tử (màu đỏ) ở độ phóng đại X1.000. (d) Hoạt tính catalase

của 2 chủng vi khuẩn, (-) đối chứng âm với môi trường cao thịt-pepton và H₂O₂ 3%, (+) chủng vi khuẩn và H₂O₂ 3%,

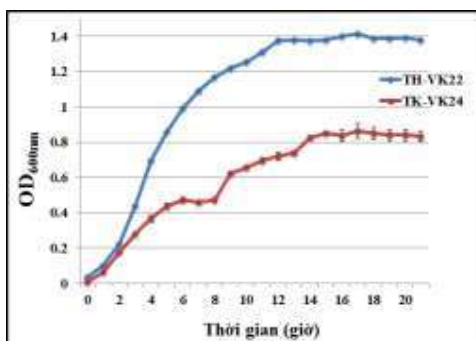
Bên cạnh đó, một phần trình tự đoạn gen mã hóa cho 16S-rRNA (913 bp cho TH-VK22 và 902 cho TH-VK24) của hai chủng vi khuẩn cũng được kiểm tra và so sánh với ngân hàng dữ liệu trên NCBI. Kết quả cho thấy gen mã hóa cho 16S-rRNA của chủng TH-VK22 có tỉ lệ tương đồng 96.7% với chủng *Bacillus subtilis* Bio AAS1 (FJ966223.1) và 16S-rRNA của chủng TH-VK24 có sự tương đồng với *Bacillus subtilis* F2-2-18 (KX350026.1) với tỷ lệ 96,4% (bảng 2). Dựa trên các kết quả thu được, hai chủng vi khuẩn TH-VK22 và TH-VK24 được xác định thuộc chi *Bacillus*, loài *Bacillus subtilis* và được đặt tên *Bacillus subtilis* TH-VK22 và *Bacillus subtilis* TH-VK24.

Bảng 2: Một phần trình tự đoạn gen mã hóa cho 16S-rRNA cho TH-VK22 và 902 cho TH-VK24

Chủng vi khuẩn	Trình tự đoạn gen mã hóa cho 16S-rRNA
TH-VK22 (913 bp)	TCGCTGCCTTATACTGCAGTTCGAGCGGGGGGATGGGAGCTTGCTTCCCTGATGTTTAA GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG GAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTG GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGT TGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAG AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT CCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGA GTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA AAGCGACTCTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGTGTAGGGGTTTTCCGCC CCTTATGCTGCAGCTACGCATAGCACTCGGCTGGGGAGTACGGTTCGCAGACTGATACT CAATGAAATGAAAGGAGCCCGCCACAGCCGTGGTATCATGTGT
TH-VK24 (837 bp)	TCACTTCCGCGGCTGGCTCCTAGAGGTCACCTTACCAGACTTCCGGGTGTTACAAACT TCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTTCCACCGCGGCAT TGCTGATCCCGGATTACTAGCGATTCCAGCTTACGCAGTCGAGTTCGCAGACTGCGA TCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTG TTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGT CATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTACCAGGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATG CTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC ACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTAT CTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATT AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTTGAGTTTCACTCTT GCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTATCTGCAGCACTAAGGGCGGAA ACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGACTACCACGGTATCTAATCCT GTTTCGCTCCCACGCTTCTCCTCACGTAGTACTAGCGAGAGATCCCGTCCCTGTG GTCTCCACTCTACCATAACGCCACTGGAATTCCTCCTCTTCTGGCACTTCGATTAC AGCTCCGTGGAACCGGCGGTTCTTC

3.3. Sự sinh trưởng của *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24

Sự sinh trưởng của hai chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24 được kiểm tra theo thời gian trong môi trường dinh dưỡng cao thịt-pepton có bổ sung 5% CMC ở 37°C và lắc 150 vòng/phút. Mật độ quang ở bước sóng 600nm được kiểm tra sau mỗi giờ. Đường cong tăng trưởng của vi khuẩn được thể hiện trong hình 4.

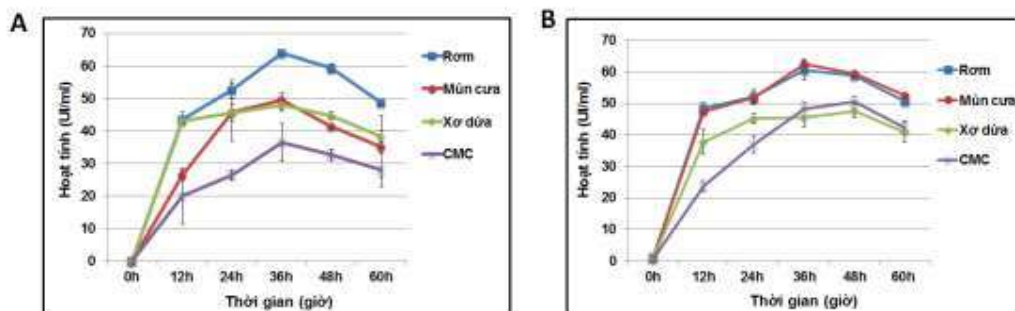


Hình 4. Đường cong tăng trưởng của *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24

Hai chủng vi khuẩn thể hiện sự tăng trưởng chậm trong 2 giờ đầu và phát triển mạnh trong thời gian tiếp theo. Mật độ sinh khối vi khuẩn đạt giá trị OD_{600nm} cao nhất trong khoảng thời gian 12-14 giờ nuôi ủ và duy trì pha cân bằng trong thời gian nuôi ủ tiếp theo. Việc sản sinh cellulase ngoại bào của các vi khuẩn thường xuất hiện cao nhất khi mật độ tế bào cực đại. Do đó, thời điểm sau 12 giờ nuôi ủ được chọn để khảo sát sự sinh tổng hợp enzyme ngoại bào trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.4. Ảnh hưởng của chất cảm ứng lên sự sinh tổng hợp cellulase của *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24

Sự tổng hợp enzyme ngoại bào của vi sinh vật chịu ảnh hưởng trực tiếp bởi chất cảm ứng trong môi trường. Do đó, để xác định điều kiện sinh tổng hợp cellulase ngoại bào của hai chủng *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các chất cảm ứng khác nhau là rom, mùn cưa, xơ dừa, và CMC. Hoạt tính cellulase của dịch nuôi cấy sau mỗi 12 giờ nuôi ủ được thể hiện ở hình 4.



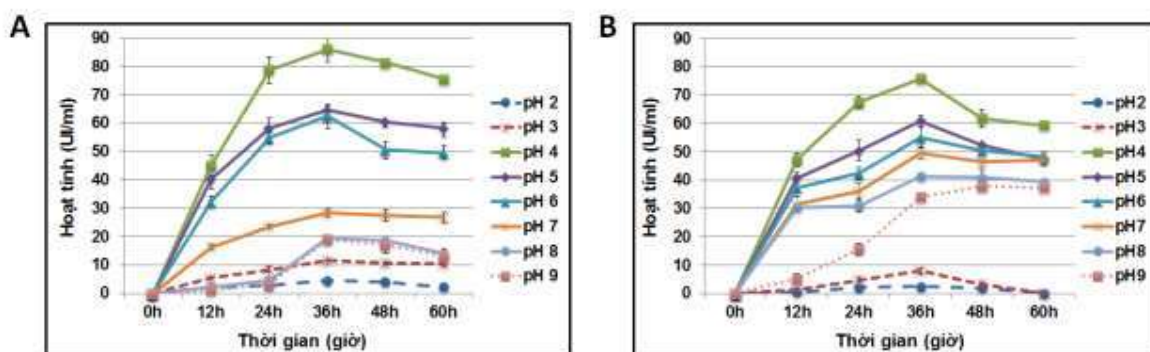
Hình 5. Ảnh hưởng của các chất cảm ứng lên sự hình thành cellulase của vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 (A) và *B. subtilis* TH-VK24 (B).

Kết quả cho thấy cả hai chủng đều có khả năng sản sinh cellulase với các mức độ khác nhau dưới ảnh hưởng của các chất cảm ứng khác nhau. Chủng TH-VK22 cho thấy khả năng sản sinh cellulase cao nhất khi được cảm ứng bởi rom và hoạt tính thu được cao nhất là $63,8 \pm 1,3$ UI/ml sau 36 giờ nuôi ủ và giảm dần theo thời gian. Các chất cảm ứng mùn cưa, xơ dừa, CMC thể hiện là các chất cảm ứng không thích hợp với hoạt tính thu được sau 36 giờ nuôi ủ là $49,5 \pm 2,2$ UI/ml, $47,8 \pm 1,6$ UI/ml, $36,4 \pm 5,7$ UI/ml (Hình 5A). Bên cạnh đó, chủng TH-VK24 thể hiện khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất với 2 chất cảm ứng là mùn cưa và rom với hoạt tính thu được tương ứng là $62,5 \pm 1,4$ UI/ml và $60,6 \pm 3,0$ UI/ml. Xơ dừa và CMC cũng không phải là chất cảm ứng thích hợp cho khi hoạt tính thu được chỉ là $45,6 \pm 3,0$ UI/ml và $48,3 \pm 2,0$ UI/ml sau 36 giờ nuôi ủ (Hình 5B). Ngoài ra, rom cũng được ghi nhận là chất cảm ứng thích hợp cho sự tổng hợp cellulase của *Bacillus* sp. 313SI trong điều kiện 35°C theo Varsha Goyal và cộng sự (2014) [26]. Tuy nhiên, thời gian tối thích cho chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. 313SI được ghi

nhận sau 60 giờ nuôi ủ, trong khi ở hai chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24, thời gian nuôi ủ thích hợp ngắn hơn nhiều (chỉ sau 36 giờ). Bên cạnh đó, kết quả phân tích thống kê cho thấy có sự khác biệt đáng kể của rom với các chất cảm ứng còn lại đối với chủng *B. subtilis* TH-VK22, trong khi rom hoặc mùn cưa là khác biệt đáng kể với các chất cảm ứng còn lại đối với chủng *B. subtilis* TH-VK24 (ANOVA, n=6, độ tin cậy 95%). Do đó, nhằm làm đa dạng hệ cellulase ngoại bào, rom được chọn lọc làm chất cảm ứng cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo đối với chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 trong khi mùn cưa được chọn cho chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK24.

3.5. Ảnh hưởng của điều kiện pH lên sự sinh tổng hợp cellulase của *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24

Bên cạnh việc chịu ảnh hưởng bởi các chất cảm ứng, sự sinh tổng hợp cellulase ngoại bào của các vi sinh vật còn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố pH và nhiệt độ của môi trường cấy. Để khảo sát ảnh hưởng của yếu tố pH lên sự sinh tổng hợp cellulase của vi khuẩn, môi trường Cao thịt-pepton có bổ sung chất cảm ứng rom và mùn cưa tương ứng cho vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24 được điều chỉnh đến các giá trị pH khác nhau từ 2,0 đến 9,0 và vi khuẩn được nuôi cấy với các điều kiện được trình bày ở trên. Dung dịch enzyme thô được thu nhận và kiểm tra hoạt tính sau mỗi 12 giờ nuôi cấy.



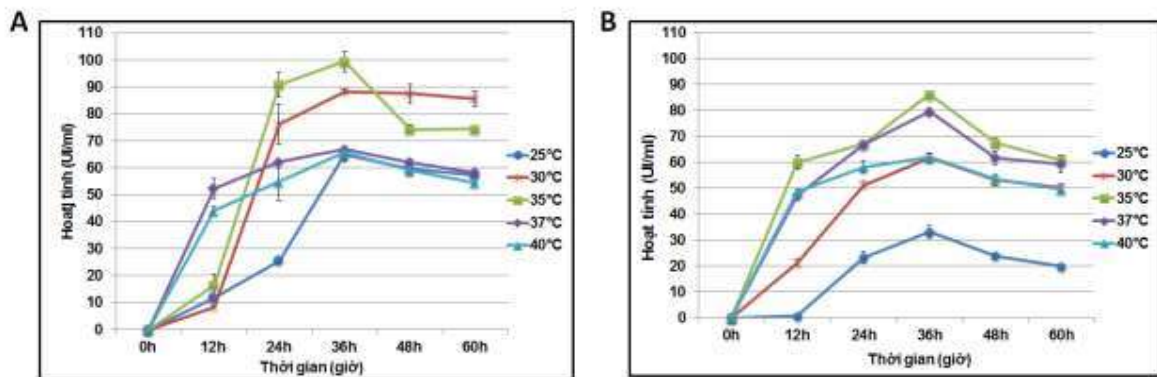
Hình 6. Ảnh hưởng của điều kiện pH ban đầu lên sự sinh tổng hợp cellulase của *B. subtilis* TH-VK22 (A) và *B. subtilis* TH-VK24 (B).

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 thể hiện khả năng tổng hợp cellulase tốt nhất trong môi trường nuôi cấy có giá trị pH ban đầu trong khoảng 4,0-6,0 và mạnh nhất ở pH 4,0 với hoạt tính $86,1 \pm 1,4$ UI/ml trong khi hoạt tính ở điều kiện pH 5,0 và 6,0 là $64,6 \pm 1,7$ UI/ml và $62,4 \pm 4,1$ UI/ml, giảm khoảng 25% so với điều kiện pH 4,0 sau 36 giờ nuôi ủ. Bên cạnh đó, hoạt tính enzyme thu nhận ở các môi trường nuôi cấy có điều kiện pH 3,0, 7,0-9,0 thể hiện hoạt tính thấp, dưới 30 UI/ml và chỉ đạt $4,5 \pm 0,7$ UI/ml trong điều kiện pH 2,0. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn này hoạt động tốt trong môi trường có pH acid từ 4,0-6,0 và tốt nhất trong khoảng pH 4,0 (Hình 6A). Ngoài ra, điều kiện pH 4,0 cũng được nhận thấy là thích hợp cho sự sinh tổng hợp cellulase của vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK24 với hoạt tính enzyme thu được $77,1 \pm 1,7$ UI/ml. Hoạt tính enzyme của chủng *B. subtilis* TH-VK24 giảm dần trong các điều kiện pH 5,0 đến pH 9,0, đồng thời hoạt tính giảm mạnh trong điều kiện acid pH 2,0 ($2,8 \pm 0,9$ UI/ml) và 3,0 ($8,2 \pm 0,9$ UI/ml) (Hình 6B). Sự giảm hoạt tính enzyme trong các điều kiện pH acid mạnh (2 - 3) hoặc pH kiềm (8-9) do điều kiện bất lợi của môi trường ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn, từ đó ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme của vi khuẩn. Cả hai chủng vi khuẩn đều cho thấy khả năng sinh tổng hợp enzyme tăng dần theo thời gian nuôi ủ và cho hoạt tính cao nhất sau 36 giờ nuôi cấy và giảm dần theo thời gian nuôi ủ tiếp theo, điều này tương ứng với hoạt động sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn với sự hình thành mật độ tế bào cao nhất sau 12-14 giờ và duy trì pha cân bằng đến 48 giờ nuôi ủ (hình 4), do đó hàm lượng enzyme được tổng hợp và tích lũy cao nhất trong giai đoạn này. Sự giảm dần hoạt tính sau 36 giờ nuôi ủ có thể là kết quả của tích lũy các chất tiết như các acid hữu cơ và các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp của vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy và ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme tạo thành. Ngoài ra, kết quả phân tích thống kê cho thấy có sự khác biệt đáng kể của pH 4 khác

biệt đáng kể với các điều kiện còn lại (ANOVA, n=6, độ tin cậy 95%). Do đó, điều kiện pH 4,0 được chọn là điều kiện pH thích hợp cho môi trường sinh tổng hợp cellulase của cả hai chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24. Tương tự, Anu Sadasivan Nair và cộng sự (2018) cũng cho thấy điều kiện pH tối ưu cho vi khuẩn *Bacillus velezensis* ASN1 là 4,72 [27]. Ngoài ra, điều kiện pH thích hợp cho các chủng vi khuẩn *Bacillus* khác cũng được ghi nhận, phần lớn hoạt động trong khoảng từ acid yếu đến trung tính pH 5,0-6,5 [3, 24, 28], kết quả này cho thấy hai chủng vi khuẩn TH-VK22 và TH-VK24 có phổ pH cao, thích hợp ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau.

3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh tổng hợp cellulase của vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh tổng hợp cellulase được kiểm tra trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau (25, 30, 35, 37, 40°C) trong môi trường pH 4.0 và 1% chất cảm ứng. Kết quả kiểm tra hoạt tính dung dịch enzyme thô sau mỗi 12 giờ nuôi cấy được thể hiện ở hình 6. Chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 thể hiện hoạt tính cao sau 36 giờ nuôi ở nhiệt độ 35°C là $99,4 \pm 3,7$ UI/ml và ở nhiệt độ 35°C là $88,2 \pm 0,8$ UI/ml, trong khi hoạt tính enzyme chỉ đạt được khoảng 65 UI/ml ở các nhiệt độ 25°C, 37°C, 40°C. So sánh hoạt tính enzyme trong điều kiện nhiệt độ 30°C và 35°C cho thấy hoạt tính enzyme ở nhiệt độ 30°C thể hiện sự ổn định theo thời gian sau 60 giờ nuôi ử, trong khi hoạt tính của enzyme ở điều kiện 35°C giảm sau 48 giờ nuôi ử. Điều này cũng được quan sát thấy tương tự trong trường hợp nhiệt độ 37°C và 40°C, hoạt tính enzyme tăng nhanh trong giai đoạn đầu và giảm theo thời gian ử tiếp theo. Vi khuẩn phát triển chậm trong điều kiện nhiệt độ 25°C và cho hoạt tính enzyme tăng chậm theo sự sinh trưởng và phát triển (Hình 7A). Nhiệt độ 35°C cũng là nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn *Bacillus* sp. 313SI và vi khuẩn *Bacillus velezensis* A-68 sinh tổng hợp cellulase trong nghiên cứu của Varsha Goyal và cộng sự (2014) [26], và Wa Gao và cộng sự (2014) [29], trong khi nhiệt độ 30°C thích hợp cho vi khuẩn *Bacillus pumillus* ATCC7061 [30]. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn này hoạt động tốt trong khoảng nhiệt độ 30°C và sinh tổng hợp enzyme nhanh tại 35°C sau 36 giờ nuôi ử tương tự như các nghiên cứu trước đây.



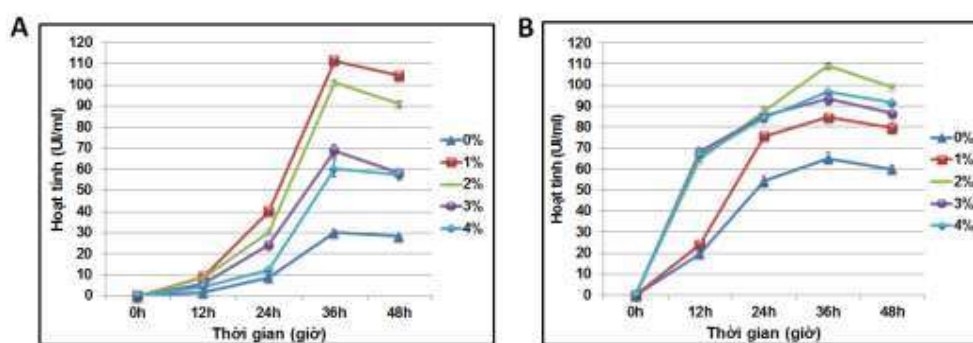
Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự hình thành cellulase của *B. subtilis* TH-VK22 (A) và *B. subtilis* TH-VK24 (B).

Tuy nhiên, chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK24 thể hiện sự sinh tổng hợp enzyme mạnh trong khoảng nhiệt độ 35°C, 37°C, 40°C và không tổng hợp enzyme trong điều kiện nhiệt độ 25°C trong khoảng 12 giờ nuôi ử ban đầu. Hoạt tính enzyme đạt cao nhất tại nhiệt độ 35°C với $88,5 \pm 1,6$ UI/ml sau 36 giờ nuôi ử, giảm nhẹ trong điều kiện nuôi ử tại 37°C là $80,8 \pm 1,5$ UI/ml và giảm mạnh tại nhiệt độ 40°C là $68,7 \pm 1,8$ UI/ml (hình 7B). Sau thời gian nuôi ử 36 giờ, hoạt tính enzyme thu được giảm dần, kết quả này cũng cho thấy sự nhạy cảm của enzyme đối với nhiệt độ cao trong môi trường nuôi ử. Điều này cho thấy chủng vi khuẩn này ưa ấm hơn so với chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 và hoạt động yếu ở nhiệt độ 25°C. Khả năng hình thành cellulase trong khoảng nhiệt độ này cũng được ghi nhận ở các vi khuẩn *B. subtilis* Q3 và vi khuẩn *Bacillus* sp. [3, 28] với nhiệt độ thích hợp là 37°C và vi khuẩn *B. subtilis* MU S1 và *Paenibacillus* sp. [31, 32] với nhiệt độ thích hợp là 40°C. Kết quả phân tích thống kê cho thấy có sự khác

biệt đáng kể về sự sinh tổng hợp cellulase ở 35°C với các điều kiện nhiệt độ còn lại (ANOVA, n=6, độ tin cậy 95%). Dựa vào các kết quả thu nhận được, nhiệt độ thích hợp cho sự sinh tổng hợp của cellulase của vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24 là 35°C.

3.7. Ảnh hưởng của hàm lượng chất cảm ứng lên sự sinh tổng hợp cellulase của vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 và *B. subtilis* TH-VK24

Sự điều hòa sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của vi sinh vật còn bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của nồng độ, hàm lượng của chất cảm ứng trong môi trường nuôi cấy. Do đó, chất cảm ứng ở các hàm lượng khác nhau được thêm vào môi trường nuôi cấy và kiểm tra hoạt tính sau mỗi 12 giờ nuôi ủ tại 35°C. Trong môi trường không có sự hiện diện của chất cảm ứng, cả hai chủng vi khuẩn đều thể hiện khả năng sinh tổng hợp enzyme thấp và kết quả tăng dần khi được bổ sung chất cảm ứng. Hàm lượng rom thích hợp cho chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 là 1% với hoạt tính enzyme đạt được $111,5 \pm 1,4$ UI/ml, sự gia tăng hàm lượng chất cảm ứng lên 2%, 3% và 4% trong môi trường nuôi ủ thu được hoạt tính enzyme tương ứng $101,1 \pm 3,2$ UI/ml, $68,9 \pm 4,0$ UI/ml, và $60,3 \pm 1,0$ UI/ml sau 36 giờ nuôi ủ (Hình 8A). Việc bổ sung rom với hàm lượng 3%, 4% làm giảm hoạt tính cellulase của *B. subtilis* TH-VK22 có thể là kết quả của sự hạn chế độ thông thoáng trong môi trường nuôi ủ khi có sự hiện diện lượng lớn rom với bản chất là các cellulose có tỷ trọng nhẹ và diện tích bề mặt cao, dẫn đến việc giảm sự sinh trưởng và phát triển của chủng này làm ức chế sự hình thành enzyme ngoại bào. Tuy nhiên, chủng *B. subtilis* TH-VK24 thể hiện hoạt tính enzyme khi được nuôi ủ trong điều kiện có 2%, 3% và 4% mùn cưa tương ứng với các giá trị lần lượt là $102,5 \pm 0,6$ UI/ml, $90,9 \pm 1,6$ UI/ml, $96,9 \pm 0,8$ UI/ml sau 36 giờ nuôi ủ, cao hơn so với điều kiện bổ sung 1% chất cảm ứng ($84,2 \pm 2,5$ UI/ml). Mùn cưa có kích thước nhỏ, với thành phần cấu trúc là cellulose, hemicellulose và lignin, sự gia tăng hàm lượng mùn cưa lên 3% và 4% không ảnh hưởng nhiều đến độ thông thoáng của môi trường nuôi cấy cho nên hoạt tính enzyme được ghi nhận không giảm nhiều so với điều kiện 2% (Hình 8B). Kết quả phân tích thống kê cho thấy có sự khác biệt đáng kể của nồng độ rom 1% với các nồng độ khác đối với chủng *B. subtilis* TH-VK22, trong khi nồng độ mùn cưa 2% - 4% là không có sự khác biệt đối với chủng *B. subtilis* TH-VK24 (ANOVA, n=5, độ tin cậy 95%). Như vậy, kết quả thu nhận được cho thấy chủng vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK22 thể hiện khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào cao nhất trong điều kiện môi trường có chứa 1% chất cảm ứng là rom xay nhuyễn, trong khi đối với *B. subtilis* TH-VK24 là mùn cưa với hàm lượng 2%. Kết quả tương tự với hàm lượng chất cảm ứng 1% đến 2% thích hợp cho sự sinh tổng hợp của vi khuẩn cũng được quan sát thấy trong các nghiên cứu khác [3, 26, 33], trong đó chất cảm ứng rom với hàm lượng 1% là điều kiện thích hợp cho sự sinh cellulase của *Bacillus* sp. 313SI theo Varsha Goyal và cộng sự (2014) [26].



Hình 8. Ảnh hưởng của hàm lượng rom lên sự hình thành cellulase của *B. subtilis* TH-VK22 (A) và của hàm lượng mùn cưa lên sự hình thành cellulase của *B. subtilis* TH-VK 24 (B).

4. KẾT LUẬN

Hai chủng chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào cellulase đã được phân lập từ các nguồn khác nhau và được định danh bằng phân tích trình tự 16S rRNA. Hai vi khuẩn được xác định thuộc chi *Bacillus* và loài *Bacillus subtilis* và được đặt tên *Bacillus subtilis* TH-VK22 và *Bacillus subtilis* TH-VK24. Điều kiện sinh tổng hợp cellulase của cả hai chủng vi khuẩn đã được kiểm tra và xác định. Chủng

B. subtilis TH-VK22 thể hiện sự tổng hợp enzyme tốt nhất trong môi trường có bổ sung 1% chất cảm ứng rơm xay, trong khi chủng *B. subtilis* TH-VK24 thích hợp với môi trường chứa 2% chất cảm ứng mùn cưa. Điều kiện pH 4,0 và nhiệt độ 35°C thích hợp cho hoạt động của cả hai chủng vi khuẩn. Trong tự nhiên, việc xử lý các xác bã thực vật được thực hiện nhờ hoạt động của các loại vi sinh vật phân giải cellulose nhờ cellulase. Tuy nhiên, việc lên men xử lý loại chất thải này sẽ hình thành các acid hữu cơ, làm giảm giá trị pH môi trường và làm giảm hoạt động của các loại vi sinh vật trong quá trình xử lý. Khả năng hoạt động tốt của hai chủng TH-VK22 và TH-VK24 trong môi trường pH 4,0 cho thấy tiềm năng cao trong việc tham gia xử lý các chất thải hữu cơ hoặc lên men thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ các xác bã thực vật một cách hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chuannan Long, Y.O., Ping Guo, Yuntao Li, Jingjing Cui, Minnan Long, Zhong Hu, Cellulase production by solid state fermentation using bagasse with *Penicillium decumbens* L-06. *Annals of Microbiology*, 2009. 59: p. 517–523.
2. Abou-Taleb, K.A.A., Mashhoor, W.A., Nasr, Sohair A., Sharaf, M.S. Abdel-Azeem, Hoda H.M. , Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic Bacilli. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2009. 3(3): p. 2429-2436.
3. Shigan Yan, X.S., Wencheng Zhang, Liping Zhu, Isolation identification and cellulase-producing condition optimization of *Bacillus subtilis* Q3. *AIP Conference Proceedings* 2019. 2110(020004).
4. Jaehwan Kim, S.Y., Zoubeida Ounaies, Discovery of Cellulose as a Smart Material. *Macromolecules*, 2006. 39(12): p. 4202-4206.
5. Singh, A. and K. Hayashi, Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties, and biosynthesis. *Adv Appl Microbiol*, 1995. 40: p. 1-44.
6. Bano S., Q.S.A., Aman A., Syed M. N., Durrani K., High production of cellulose degrading endo-1,4-beta-D-glucanase using bagasse as a substrate from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Carbohydrate Polymers*, 2013. 91(1): p. 300-4.
7. Puspita Lisdiyanti, E.S., Niken Financia Gusmawati, Wiwik Rahayu Isolation and Characterization of Cellulase Produced by Cellulolytic Bacteria from Peat Soil of Ogan Komering Ilir, South Sumatera *International Journal of Environment and Bioenergy* 2012. 3(3): p. 145–153.
8. Joel R Cherry, A.L.F., Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003. 14(4): p. 438-443.
9. Ole Kirk, T.V.B., Claus Crone Fuglsang, Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002. 13(4): p. 345–351.
10. Kevin A Gray, L.Z., Mark Emptage, Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006. 10(2): p. 141-146.
11. Bhat, M.K., Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 2000. 18(5): p. 355–383.
12. Bahkali, A.H., Influence of various carbohydrates on xylanase production in *Verticillium tricorpus*. *Bioresource Technology*, 1996. 57(3): p. 265-268.

13. G. Immanuel, R.D., P. Prema, A. Palavesam, 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*, 2006. 3(1): p. 25–34.
14. Chul Seung Shin, J.P.L., Jin Suk Lee, Soon Chul Park, Enzyme production of *Trichoderma reesei* rut C-30 on various lignocellulosic substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000. 84(1-9): p. 237–245.
15. R. Kanmani, V.P., Singaram Jayalakshmi, Sachaarification of banana-agro waste and clarification of apple juice by cellulase enzyme produced from *Bacillus pumilus*. *World Applied Sciences Journal*, 2011. 12(11): p. 2120-2128.
16. Ariffin, H., et al., Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3. *J Biosci Bioeng*, 2008. 106(3): p. 231-6.
17. Krishna, C., Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology*, 1999. 69(3): p. 231-239.
18. Jorgensen Henning, O.L., Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888—Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology* 2006. 38(3): p. 381-390
19. Amany L. Kansoh, S.A.E., A. N. Zeinat, Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesii*. *Polymer Degradation and Stability*, 1999. 63(2): p. 273-278.
20. M.S. Umikalsom, A.B.A., H.S. Zulkifli, C.C. Tong, M.A. Hassan, M.I.A. Karim, The treatment of oil palm empty fruit bunch fibre for subsequent use as substrate for cellulase production by *Chaetomium globosum* Kunze. *Bioresource Technology*, 1997. 62(1-2): p. 1-9.
21. Abdullah, R., et al., Process optimisation for the biosynthesis of cellulase by *Bacillus* PC-BC6 and its mutant derivative *Bacillus* N3 using submerged fermentation. *Nat Prod Res*, 2015. 29(12): p. 1133-8.
22. Somen Acharya, A.C., Optimization of Fermentation Conditions for Cellulases Production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 Isolated from Indian Hot Spring Brazilian Archives of Biology and Technology, 2012. 55(4): p. 497-503.
23. Kazemi, A., et al., Isolation, identification, and media optimization of high-level cellulase production by *Bacillus* sp. BCCS A3, in a fermentation system using response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol*, 2014. 44(2): p. 107-18.
24. Meng, F., et al., Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass. *Lett Appl Microbiol*, 2014. 59(3): p. 306-12.
25. Bernfeld, P., Amylase, α and β . *Methods in Enzymology*, 1955. 1: p. 149-158.
26. Goyal, V., et al., Parametric Optimization of Cultural Conditions for Carboxymethyl Cellulase Production Using Pretreated Rice Straw by *Bacillus* sp. 313SI under Stationary and Shaking Conditions. *Biotechnol Res Int*, 2014. 2014: p. 651839.
27. Nair, A.S., et al., Waste office paper: A potential feedstock for cellulase production by a novel strain *Bacillus velezensis* ASN1. *Waste Manag*, 2018. 79: p. 491-500.
28. Ponnuswamy Vijayaraghavan, S.G.P.V., Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus* sp. *Polish Journal of Microbiology*, 2012. 61(1): p. 51–55.
29. Gao, W., et al., Enhanced Production of carboxymethylcellulase by a marine bacterium, *Bacillus velezensis* A-68, by using rice hulls in pilot-scale bioreactor under optimized conditions for dissolved oxygen. *J Microbiol*, 2014. 52(9): p. 755-61.

30. Goma, E.Z., Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumillus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2013. 44(2): p. 529-537.
31. Sreena, C.P. and D. Sebastian, Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs. *J Genet Eng Biotechnol*, 2018. 16(1): p. 9-16.
32. Islam, F. and N. Roy, Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. *BMC Res Notes*, 2018. 11(1): p. 445.
33. Irfan, M., et al., Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* K-18 for saccharification using response surface methodology. *AMB Express*, 2017. 7(1): p. 29.

Ngày nhận bài: 30/09/2019

Ngày chấp nhận đăng: 20/12/2019