

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY CHO KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CELLULASE TỪ *Bacillus subtilis* TH-VK22

NGUYỄN MỘC TÂN, NGUYỄN NGỌC AN, NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH, PHẠM TÂN VIỆT*

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: phamtanviet@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstih.v65i05.4966>

Tóm tắt: Phần lớn enzyme cellulase trên thị trường hiện nay có nguồn gốc từ vi sinh vật. Trong đó, vi khuẩn đã được chứng minh là nhóm sinh vật có nhiều tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất cellulase nhờ khả năng sinh trưởng nhanh và sản xuất nhiều loại enzyme ngoại bào. Trong nghiên cứu này, *Bacillus subtilis* TH-VK22 đã được nuôi cấy và đánh giá khả năng sinh tổng hợp cellulase. Môi trường Bushnell Haas Medium (BHM) với thành phần chủ yếu là các muối vô cơ đã được sử dụng để khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng vi khuẩn này. *B. subtilis* TH-VK22 sản xuất được cellulase có hoạt tính tốt khi nuôi cấy trong môi trường BHM có bổ sung 11,0% maltodextrin, 2,0 peptone, 0,5% rom, pH 5,0 và 35°C. Cellulase từ chủng *B. subtilis* TH-VK22 có thể hoạt động ổn định trong khoảng pH 5,0-9,0. Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau của *B. subtilis* TH-VK22, đặc biệt là trong ngành sản xuất nhiên liệu sinh học.

Từ khóa: enzyme ngoại bào, cellulase, *Bacillus subtilis*, vi khuẩn, điều kiện nuôi cấy

1. GIỚI THIỆU

Cellulose là một nguồn sinh khối phong phú trong tự nhiên [1], nó có thể được phân hủy bởi cellulase bằng cách thủy phân liên kết β -1,4-glycosidic để tạo thành glucose [2]. Tuy nhiên, để phân hủy hoàn toàn cellulose cần sự phối hợp của các nhóm enzyme endoglucanase (1,4-D-glucan-4-glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.4) thủy phân các liên kết β -1,4-glycosidic ở vị trí ngẫu nhiên trên mạch cellulose tạo thành các mạch ngắn hơn. Tiếp đến, exoglucanase (1,4-D-glucan glucohydrolase, E.C. 3.2.1.74) xúc tác thủy phân từ đầu của các mạch tạo ra cellobiose và một ít glucose. Cuối cùng, β -glucosidase (D-glucoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) thủy phân cellobiose và các đoạn oligosaccharide thành đơn phân glucose [3, 4].

Cellulase được sinh tổng hợp chủ yếu bởi vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm mốc trong quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng trên các vật liệu cellulose [5, 6]. Phần lớn cellulase trên thị trường hiện tại được sản xuất bởi nấm mốc do khả năng sinh tổng hợp cellulase cho hoạt tính cao [7]. Tuy nhiên, hầu hết các chủng vi sinh vật được sử dụng để sản xuất cellulase hiện nay là các chủng đã có sự can thiệp về di truyền. Trong đó, vi khuẩn có tốc độ tăng trưởng nhanh, có khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi từ môi trường đã được ứng dụng trong công nghiệp sản xuất cellulase [6, 8]. Một số loài vi khuẩn đã được báo cáo có khả năng sản xuất enzyme phân giải cellulose như là *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Acetovibrio*, *Streptomyces*, *Alteromonas* và *Paenibacillus* [6, 9]. *Bacillus subtilis* là một trong những loài đầu tiên được giải toàn bộ trình tự gene vào năm 1997 [10]. Nhiều nghiên cứu đã và đang được thực hiện dựa trên dữ liệu gene đã được công bố. Trong đó, các nghiên cứu về enzyme ngoại bào nói chung và cellulase nói riêng đã có nhiều ứng dụng trong công nghiệp. Trong số các yếu tố ảnh hưởng đến việc sản xuất cellulase từ vi sinh vật như nhiệt độ, pH, tốc độ lắc, thành phần dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy thì nhiệt độ và pH nuôi cấy đã được chứng minh có ảnh hưởng sâu sắc nhất. Mỗi chủng vi sinh vật sẽ có một nhiệt độ và pH sinh trưởng thích hợp. Khi được nuôi cấy trong điều kiện khác nhau, sự hình thành cellulase là khác nhau. Theo Ray và cộng sự (2007), hai chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CY5 và *Bacillus circulans* TP3 cho thấy khả năng sinh tổng hợp cellulase có hoạt tính cao nhất khi được nuôi cấy trong điều kiện pH 7,0-7,5 ở 40°C. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ nuôi cấy lên 45°C và giảm pH xuống 5,5 thì hoạt tính cellulase giảm xuống thấp nhất [11]. Nhiệt độ và pH cũng ảnh hưởng nghiêm trọng đến sự sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp cellulase ở các chủng *Bacillus licheniformis*, *Bacillus paralicheniformis* và *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* JJBS300 [12, 13]. Thành phần dinh dưỡng, tốc độ lắc cũng ảnh hưởng lên khả năng sản xuất cellulase của vi sinh vật. Akintola và cộng sự (2019) đã nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự sản xuất cellulase của chủng *Enterobacter cloacae* IP8, kết quả cho thấy hoạt tính cellulase đạt cao nhất trong môi trường nuôi cấy có bổ sung 1,5% CMC, 2% peptone và tốc độ lắc 150 vòng/phút

[14]. Trong các nghiên cứu của Islam (2019), Baltaci và Mustafa Ozkan (2022), khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Bacillus* sp., *Streptomyces ambofaciens* OZ2 và *Cytobacillus oceanisediminis* OZ5 chịu ảnh hưởng đáng kể của các yếu tố này [15, 16]. Cellulase đã và đang được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau bao gồm thực phẩm, dệt may, tẩy rửa, giấy... cũng như trong nông nghiệp [2, 17, 18]. Bên cạnh đó, việc sử dụng cellulase để sản xuất nhiên liệu sinh học thay thế sự thiếu hụt nhiên liệu hóa thạch đang được nhiều tác giả quan tâm nghiên cứu [2]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện để tìm ra điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự sản xuất cellulase từ chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* TH-VK22, tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn và hướng tới ứng dụng vào các lĩnh vực công nghiệp khác nhau, đặc biệt là sản xuất nhiên liệu sinh học.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Giống vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy

Giống vi khuẩn từ bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh-Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh [19], được cấy rìa trên môi trường Luria Bertani (Peptone 10,0 g/L, Cao nấm men 5,0 g/L, NaCl 10,0 g/L, CMC 10,0 g/L, pH 7,0) để kiểm tra độ thuần chủng. Sinh khối khuẩn lạc được nuôi cấy trong 5 mL môi trường LB + 1% CMC, tốc độ 150 vòng/phút ở 37°C trong vòng 12 giờ để hoạt hóa giống.

2.2 Đánh giá khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *B. subtilis* TH-VK22 trên môi trường BHM

Môi trường BHM thường được sử dụng để khảo sát khả năng sinh tổng hợp cellulase của vi sinh vật. Do đó, sự sản xuất cellulase của *Bacillus subtilis* TH-VK22 được đánh giá thông qua hoạt tính cellulase của dịch nuôi cấy chủng này trên môi trường BHM (Bushnell Haas Medium) (MgSO₄ 0,2 g/L, CaCl₂ 0,02 g/L, KH₂PO₄ 1,0 g/L, K₂HPO₄ 1,0 g/L, NH₄NO₃ 1,0 g/L, FeCl₃ 0,05 g/L) bổ sung 1% CMC được đánh giá sau mỗi 12 giờ nuôi cấy bằng phương pháp BernFeld [20] như sau: 500 µL dịch enzyme thô (đã được loại bỏ tế bào vi khuẩn bằng cách ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C) được ủ với 1000 µL 1% CMC ở 50°C trong 30 phút. Sau đó, 500 µL DNS (3,5-dinitrosalisylic acid) được thêm vào nhằm dừng phản ứng và đồng thời định lượng đường khử tạo thành. Hỗn hợp trên được đun 15 phút ở 100°C, làm nguội và đo quang ở bước sóng 540nm. Phản ứng này dựa trên cơ sở thuốc thử DNS (màu vàng) phản ứng với đường khử (sản phẩm của quá trình thủy phân cơ chất bằng cellulase) tạo thành 3-amino, 5-nitrosalisylic acid (màu đỏ cam) có khả năng hấp thụ cực đại ở bước sóng 540nm. Sản phẩm màu tỉ lệ thuận với lượng đường khử tạo thành khi có sự xúc tác của cellulase. Hoạt tính của cellulase được xác định thông qua lượng micromolar glucose tạo thành khi 1ml dịch enzyme thô phản ứng với CMC trong khoảng thời gian 1 phút ở điều kiện chuẩn (50°C và pH 7,0) theo công thức:

$$\text{Hoạt độ cellulase} = \frac{\mu\text{M Glucose} \times V \times K}{v \times t}$$

Trong đó:

µM glucose: nồng độ glucose suy ra từ đường chuẩn

V: tổng thể tích hỗn hợp phản ứng (mL)

v: thể tích dịch enzyme sử dụng để phản ứng (mL)

K: độ pha loãng mẫu

t: thời gian thủy phân (phút)

Môi trường cho khả năng sinh tổng hợp cellulase có hoạt tính cao hơn sẽ được sử dụng cho thí nghiệm khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp.

2.3 Khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp cellulase trên môi trường BHM

Chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22 được tăng sinh qua đêm trong môi trường BHM + 1% CMC ở 37°C cho đến khi mật độ tại OD₆₀₀ đạt 1,2-1,3 được sử dụng làm giống để khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố khác nhau lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *B. subtilis* TH-VK22. Trong đó, tinh bột, glycerol, sucrose, manitol, lactose, maltodextrin với nồng độ 1% được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbohydrate so sánh với đối chứng không bổ sung carbohydrate. Nguồn carbohydrate có ảnh hưởng tích cực nhất đến hoạt tính cellulase của dịch nuôi cấy sẽ được chọn để khảo sát nồng độ bổ sung 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0, 11,0, 13,0, 15,0, 17,0 và 19,0%.

Nồng độ carbohydrate thích hợp sẽ được chọn để đánh giá ảnh hưởng của các nguồn nitrogen vô cơ và hữu cơ như cao thịt, peptone, cao trùn quế, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 và NH_4Cl . Tương tự như carbohydrate, nguồn nitrogen thích hợp sẽ được sử dụng để tiếp tục đánh giá các nồng độ bổ sung từ 0,5 đến 5,0% lên sự sản xuất cellulase.

Nồng độ nitrogen và nồng độ carbohydrate có ảnh hưởng tốt nhất lên hoạt tính cellulase của dịch nuôi cấy sẽ được chọn để tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của các loại cơ chất khác nhau bao gồm rơm, mùn cưa, xơ dừa, giấy lọc, bã mía và trấu lên khả năng sinh tổng hợp cellulase. Tương tự hai thí nghiệm trên, nguồn cơ chất thích hợp sẽ được chọn để khảo sát ảnh hưởng lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng vi khuẩn với các nồng độ từ 0,5 đến 4,0%.

Nhiệt độ nuôi cấy được khảo sát từ 25 đến 40°C trong môi trường có các thành phần thích hợp đã được xác định ở các thí nghiệm trên. pH môi trường nuôi cấy ban đầu được khảo sát trong khoảng 3,0-9,0 với các điều kiện nuôi cấy như trên.

Sau mỗi 12 giờ nuôi cấy, hoạt tính cellulase được xác định bằng phương pháp BernFeld.

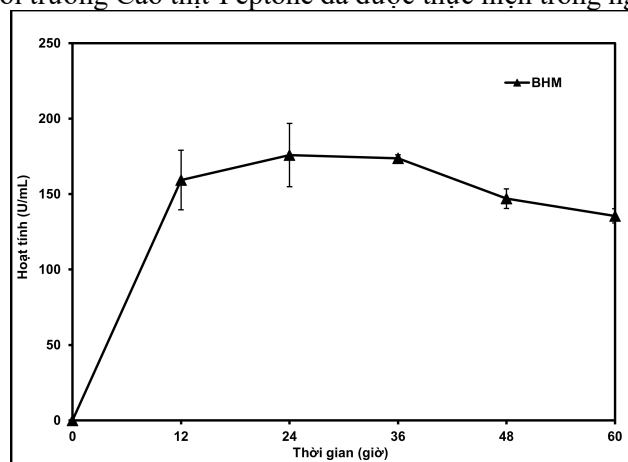
2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được tính toán, vẽ biểu đồ bằng Microsoft Excel và đánh giá sự khác biệt thống kê bằng phương pháp ANOVA của phần mềm Statgraphics.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào của chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22 trên môi trường BHM

Sự sản xuất cellulase ngoại bào của vi sinh vật phụ thuộc rất nhiều vào dinh dưỡng, nhằm phục vụ cho nhu cầu năng lượng của bản thân. Vì vậy, để đánh giá ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy lên sự sản xuất cellulase của chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22, môi trường BHM đã được sử dụng để so sánh với môi trường Cao thịt-Peptone đã được thực hiện trong nghiên cứu trước.



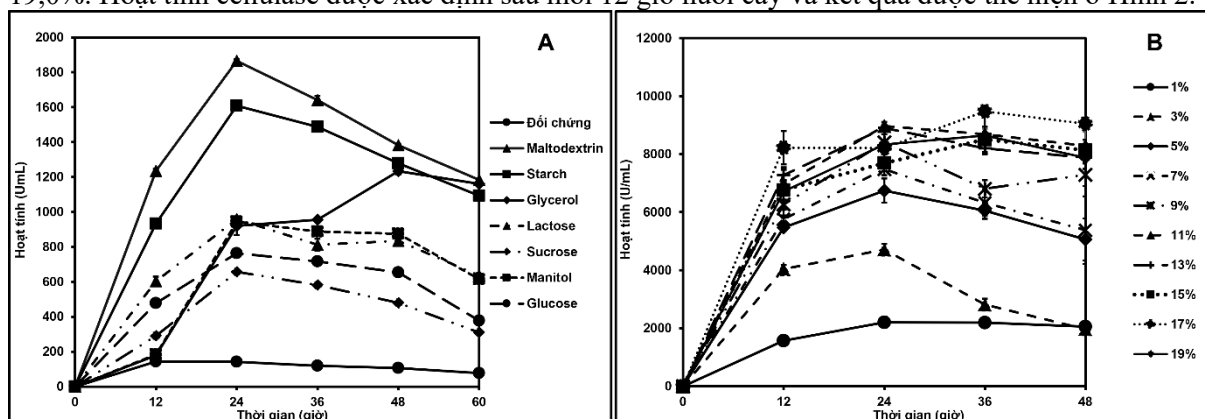
Hình 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của *B. subtilis* TH-VK22

Hình 1 cho thấy chủng *B. subtilis* TH-VK22 khi được nuôi trong môi trường BHM có khả năng sinh tổng hợp cellulase có hoạt tính cao nhất sau 12 giờ nuôi cấy đạt $159,3 \pm 19,7$ U/mL và tiếp tục duy trì ổn định sau 24, 36 giờ với hoạt tính lần lượt là $175,8 \pm 21$, $175,6 \pm 2,3$ U/mL. Trước đó, Nguyễn Ngọc Ân và cộng sự đã thực hiện khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự sinh tổng hợp cellulase chủng vi khuẩn này trong môi trường Cao thịt-Peptone. Tuy nhiên, hoạt tính cellulase cao nhất của dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* TH-VK22 chỉ đạt khoảng 100 U/mL [19], thấp hơn khoảng 30% so với việc sử dụng môi trường BHM. Tương tự, môi trường BHM cũng đã được Singh và cộng sự sử dụng để xác định khả năng sản xuất cellulase ngoại bào của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* SS35, kết quả cho thấy hoạt tính cellulase được ghi nhận cao nhất là 0,072 U/mL, thấp hơn rất nhiều so với kết quả của thí nghiệm này [21]. Mostafa và cộng sự đã chỉ ra rằng chủng *Paenibacillus alvei* khi được nuôi cấy trong môi trường BHM đã hình thành cellulase có hoạt tính cao nhất chỉ đạt 8,11 U/mL sau 48 giờ nuôi cấy [22]. Kết quả này cho thấy chủng *B. subtilis* TH-VK22 có khả năng sinh tổng hợp cellulase có hoạt tính tốt hơn so với nghiên cứu trước đây và các nghiên

cứu trên cùng đối tượng vi khuẩn khi nuôi cấy trên cùng môi trường BHM. Do đó, môi trường này được sử dụng để tiến hành khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase của chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22

3.2 Ảnh hưởng của các nguồn carbohydrate và nồng độ của nguồn carbohydrate tốt nhất lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22

Carbohydrate ảnh hưởng trực tiếp lên sự sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật. Nhằm đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbohydrate lên sự sinh tổng hợp cellulase của *B. subtilis* TH-VK22, tinh bột, glycerol, sucrose, manitol, lactose và maltodextrin với nồng độ 1,0% đã được bổ sung vào môi trường BHM. Sau đó, nguồn carbohydrate thích hợp nhất tiếp tục được khảo sát nồng độ bổ sung với các nồng độ khảo sát từ 1,0 đến 19,0%. Hoạt tính cellulase được xác định sau mỗi 12 giờ nuôi cấy và kết quả được thể hiện ở Hình 2.



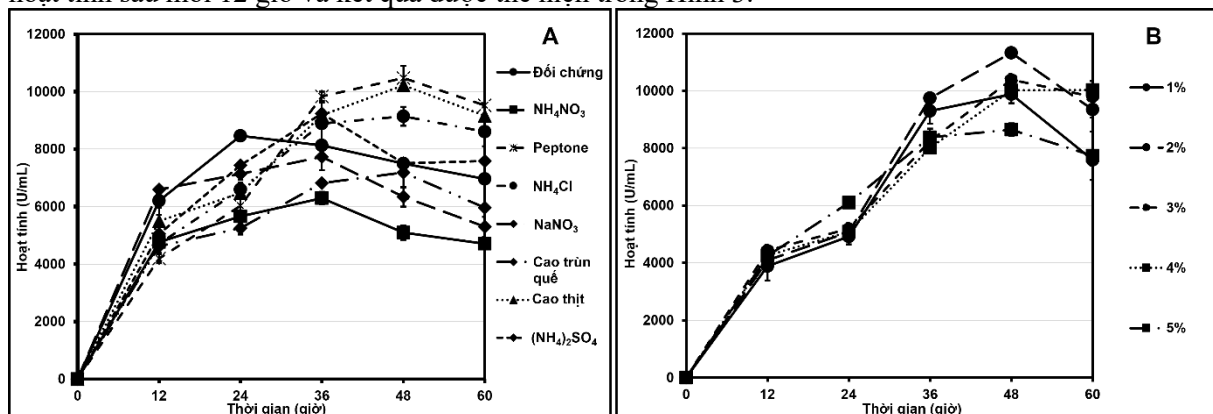
Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn carbohydrate (A) và nồng độ carbohydrate lên sự sinh tổng hợp cellulase của *Bacillus subtilis* TH-VK22

Hình 2A cho thấy khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *B. subtilis* TH-VK22 không giống nhau khi chủng này được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung các nguồn carbohydrate khác nhau. Dịch nuôi cấy vi khuẩn khi được nuôi trong môi trường có bổ sung maltodextrin thể hiện hoạt tính cellulase cao nhất là $1864,9 \pm 10,2$ U/mL sau 24 giờ nuôi cấy và giảm dần theo thời gian. Kế đến tinh bột với hoạt tính cellulase của dịch nuôi cấy thu được là $1608,3 \pm 13,7$ U/mL, giảm khoảng 10% so với maltodextrin, sau 24 giờ nuôi cấy. Với các nguồn carbohydrate khác như lactose, mannitol và glycerol, cellulase từ *Bacillus subtilis* TH-VK22 có hoạt tính gần như tương đương nhau, khoảng 950 U/mL sau 24 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, khi bổ sung glycerol vào môi trường nuôi cấy, hoạt tính cellulase từ dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* TH-VK22 cao nhất sau 48 giờ, đạt $1233,8 \pm 17,6$ U/mL, xấp xỉ với việc bổ sung maltodextrin sau 48 giờ. Glucose và sucrose thể hiện là nguồn carbohydrate không thích hợp khi cellulase thu được với hoạt tính lần lượt là $762,7 \pm 11,1$ U/mL và $656 \pm 11,9$ U/mL, sau 24 giờ nuôi cấy. Ở nghiệm thức đối chứng, với việc không bổ sung nguồn carbohydrate trong quá trình nuôi cấy chủng *B. subtilis* TH-VK22 đã thu được dịch nuôi cấy có hoạt tính cellulase là thấp nhất ($143,7 \pm 2,1$ U/mL) sau 12 giờ và bắt đầu giảm dần trong các khoảng thời gian nuôi cấy kế tiếp. Trong nghiên cứu của Ray và cộng sự, nguồn carbon thích hợp để chủng *Bacillus licheniformis* CBH7 cho hoạt tính cellulase của dịch nuôi cấy tốt nhất là glucose ($6,72 \pm 0,38$ U/mL) [23]. Trong khi đó, chủng *Bacillus subtilis* lại sinh tổng hợp cellulase tốt nhất khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung lactose với hoạt tính thu được là 23,96 U/mL, được ghi nhận trong nghiên cứu của Bai và cộng sự [24]. Tuy glucose và lactose là nguồn carbon thích hợp cho các đối tượng trong hai nghiên cứu trên để sản xuất cellulase có hoạt tính cao, nhưng hoạt tính cellulase thu nhận được với việc sử dụng glucose và lactose trong nghiên cứu này vẫn cao hơn rất nhiều lần. Mặc khác, đây là nghiên cứu đầu tiên sử dụng maltodextrin làm nguồn carbohydrate cho quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase, nên có thể cung cấp thêm cơ sở dữ liệu để so sánh, đánh giá và tham khảo cho các nghiên cứu khác trong tương lai. Ngoài ra, kết quả phân tích thống kê ANOVA (độ tin cậy 95%) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa maltodextrin và các nguồn carbohydrate còn lại sau 24 giờ nuôi cấy. Do đó, maltodextrin được chọn làm nguồn carbohydrate để thực hiện đánh giá ảnh hưởng của nồng độ bổ sung lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *B. subtilis* TH-VK22.

Hình 2B cho thấy chủng *B. subtilis* TH-VK22 thể hiện khả năng sinh tổng hợp cellulase có hoạt tính tăng dần tương quan với hàm lượng maltodextrin. Trong đó, hoạt tính cellulase của dịch nuôi cấy tăng dần ở các nghiệm thức có nồng độ maltodextrin 1, 3, 5, 7 và 9% với hoạt tính lần lượt là 2204,7±188,5, 4714,1±200, 6747,4±416,3, 7480,7±200 và 8403±509,2 U/mL sau 24 giờ nuôi. Tuy nhiên hoạt tính cellulase đạt cực đại khi bắt đầu nâng nồng độ maltodextrin lên 11% và duy trì ổn định ở khoảng 8500 U/mL sau 24 giờ với các nồng độ cao hơn là 13, 15, 17 và 19% khi bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy. Việc gia tăng nồng độ lên 13, 15, 17 và 19% không làm gia tăng hoạt tính cellulase có thể là do lượng dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển dẫn đến sự sản xuất cellulase cũng ở mức ổn định. Bên cạnh đó, kết quả phân tích thống kê ANOVA (độ tin cậy 95%) cho thấy hoạt tính cellulase giữa các nghiệm thức được bổ sung 11, 13, 15, 17 và 19% maltodextrin vào môi trường nuôi cấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy nhiên, để tối ưu về mặt giá trị kinh tế, 11% maltodextrin đã được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.3 Ảnh hưởng của các nguồn nitrogen và nồng độ của nguồn nitrogen tốt nhất lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Bacillus subtilis* TH-VK22

Bên cạnh carbohydrate, sự sinh trưởng, phát triển, cũng như là khả năng sinh tổng hợp cellulase của vi sinh vật cũng chịu tác động bởi nitrogen có trong môi trường nuôi cấy. Để xác định ảnh hưởng của các nguồn nitrogen khác nhau lên sự sinh tổng hợp cellulase của chủng *B. subtilis* TH-VK22, các nguồn nitrogen hữu cơ như cao thịt, peptone, cao trùn quế và vô cơ như $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 và NH_4Cl đã được bổ sung vào môi trường BHM có chứa 11% maltodextrin. Nguồn nitrogen cho dịch nuôi cấy thể hiện cellulase có hoạt tính cao nhất được khảo sát nồng độ bổ sung từ 0,5 đến 5,0%. Dịch nuôi cấy được thu nhận để xác định hoạt tính sau mỗi 12 giờ và kết quả được thể hiện trong Hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của các nguồn nitrogen khác nhau (A) và nồng độ nitrogen (B) lên khả năng sản xuất enzyme cellulase của chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22

Hình 3A thể hiện thể hiện khả năng sinh tổng hợp cellulase của *B. subtilis* TH-VK22 ở các mức độ khác nhau khi được nuôi cấy trong môi trường chứa các nguồn nitrogen khác nhau. Nguồn peptone và cao thịt khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy cho dịch nuôi cấy thể hiện cellulase có hoạt tính cao nhất và gần như tương đương nhau với hoạt tính lần lượt là 10473,3±433,3 và 10217,8±63,2 U/mL sau 48 giờ nuôi cấy. Trong khi đó, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và NH_4Cl cũng cho dịch nuôi cấy có cellulase với hoạt tính tương tự nhau là 9240±83,4 và 8884,4±735,1 U/mL chỉ sau 36 giờ nuôi ử, giảm khoảng 10% so với hai nguồn peptone và cao thịt. Các nguồn nitrogen khác là cao trùn quế, NaNO_3 và NH_4NO_3 thể hiện là các nguồn nitrogen không thích hợp khi hoạt tính cellulase thu được lần lượt là 6817,8±78,8, 7728,8±452,5, và 6295,6±218,8 U/mL, thấp hơn so với đối chứng với hoạt tính cellulase thu nhận được là 8462,2±153,9 U/mL chỉ sau 24 giờ nuôi cấy. Tương tự, peptone cũng được ghi nhận là nguồn nitrogen thích hợp cho sự sinh tổng hợp cellulase của chủng *Bacillus pseudomycooides* trong nghiên cứu của Md. Abu Saleh và cộng sự [25], trong khi cao thịt là nguồn nitrogen thích hợp cho sự sinh tổng hợp cellulase của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus cerus*, *Bacillus subtilis* và *Bacillus stratosphericus* sau 48 giờ nuôi cấy trong nghiên cứu của Ikram và cộng sự [26]. Ngoài ra, kết quả phân tích thống kê ANOVA (độ tin cậy 95%) cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa hai nguồn nitrogen được khảo sát là peptone và cao thịt. Tuy nhiên, có sự khác biệt có ý nghĩa với các

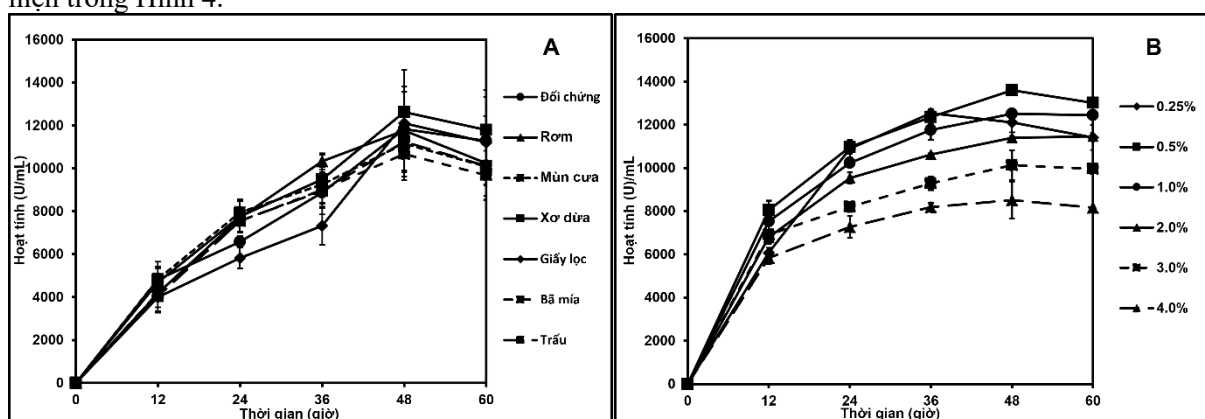
KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY...

nguồn nitrogen được khảo sát còn lại. Vì vậy, peptone sẽ được chọn làm nguồn nitrogen để thực hiện khảo sát nồng độ bổ sung thích hợp với các nồng độ được khảo sát là 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 và 5,0%.

Chủng *B. subtilis* TH-VK22 cho thấy khả năng sinh tổng hợp cellulase có hoạt tính cao nhất khi môi trường nuôi cấy được bổ sung 2% peptone là $11323,3 \pm 57,7$ U/mL, cao hơn khoảng 13% so với nghiệm thức đối chứng chứa 1% peptone với hoạt tính cellulase là $9878,9 \pm 307,3$ U/mL (Hình 3B) sau 48 giờ nuôi cấy. Hoạt tính của cellulase có trong dịch nuôi cấy vi khuẩn tỉ lệ nghịch với sự tăng dần nồng độ peptone từ 3, 4 lên 5% với hoạt tính lần lượt là $10390 \pm 69,4$, $10012,2 \pm 117,7$ và $8645,6 \pm 219,2$ U/mL. Việc giảm hoạt tính khi tăng nồng độ nitrogen có thể do là mỗi chủng vi sinh vật có nhu cầu dinh dưỡng cho sự sinh trưởng và phát triển của riêng mình. Vì vậy, khi điều kiện sống quá lý tưởng bởi sự dồi dào của lượng peptone có trong môi trường nuôi cấy sẽ làm cho sự sản xuất cellulase để phân giải CMC cần cho hoạt động sống của chủng vi sinh vật bị hạn chế. Ngoài ra, kết quả phân tích thống kê ANOVA (độ tin cậy 95%) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa nồng độ 2% peptone so với các nồng độ khác. Tương tự như nghiên cứu của Akintola và cộng sự được thực hiện năm 2019, peptone với nồng độ 2% được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *Enterobacter cloacae* IP8 cũng được ghi nhận là cho hoạt tính của cellulase có trong dịch nuôi cấy là tốt nhất [14]. Do đó, peptone với nồng độ 2% được sử dụng để tiến hành các khảo sát tiếp theo trên *B. subtilis* TH-VK22.

3.4 Ảnh hưởng của cơ chất và nồng độ của loại cơ chất tốt nhất lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22

Chất cảm ứng trong môi trường nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong việc sản xuất enzyme ngoại bào của các chủng vi sinh vật. Vì vậy, các loại cơ chất cảm ứng bao gồm rom, mùn cưa, xơ dừa, giấy lọc, bã mía và trấu được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chứa 11% maltodextrin và 2% peptone để đánh giá hoạt tính cellulase của chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22. Tương tự như carbohydrate và nitrogen, loại cơ chất cảm ứng cho sự sinh tổng hợp cellulase có hoạt tính cao nhất được chọn để khảo sát nồng độ bổ sung từ 0,5 đến 4,0%. Kết quả kiểm tra hoạt tính của cellulase có trong dịch nuôi cấy vi khuẩn sau mỗi 12 giờ được thể hiện trong Hình 4.



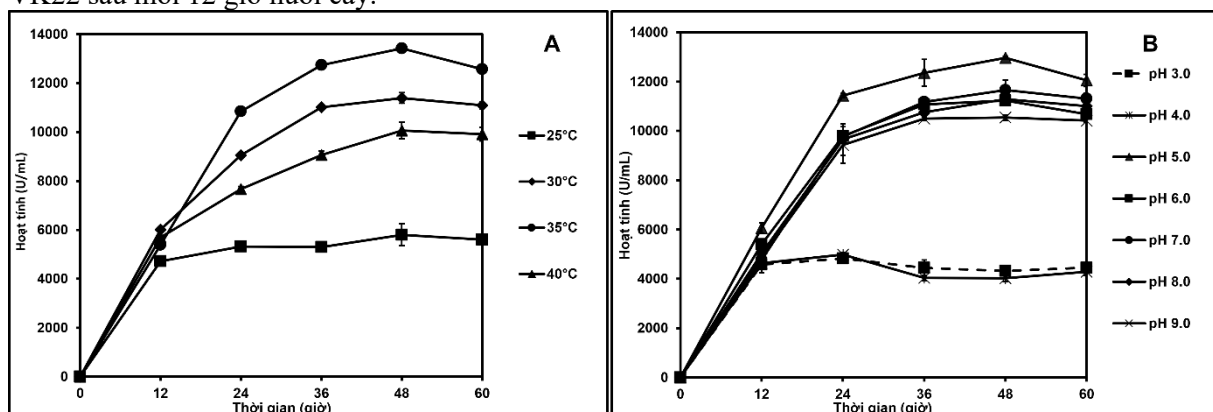
Hình 4. Ảnh hưởng của các nguồn cơ chất cảm ứng khác nhau (A) và nồng độ cơ chất (B) lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22

Hình 4A cho thấy chủng *B. subtilis* TH-VK22 có khả năng sinh tổng hợp cellulase với mức độ gần như nhau khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung các loại cơ chất cảm ứng khác nhau. Các chất cảm ứng CMC, rom, mùn cưa, xơ dừa, giấy lọc, bã mía và trấu cho dịch nuôi cấy có hoạt tính cellulase tăng dần theo thời gian và đạt đỉnh sau 48 giờ nuôi cấy với hoạt tính lần lượt là $11825,9 \pm 1997,9$, $11766,7 \pm 713,9$, $11151,9 \pm 1692,6$, $12618,5 \pm 1978,8$, $12100 \pm 1479,8$, $10670,4 \pm 1061,9$, $11244 \pm 1352,3$ U/mL và giảm dần sau đó. Kết quả này có thể là do bản chất thành tế bào thực vật chủ yếu được cấu tạo từ cellulose, hemicellulose, peptin, lignin và các protein tan. Do đó, việc cảm ứng cho sự sản xuất cellulase có hoạt tính tương đương nhau ở các loại cơ chất được khảo sát. Mặc khác, nước ta là một quốc gia nông nghiệp, ngành chủ đạo là trồng lúa nước. Vì vậy, rom có nguồn cung dồi dào trong việc sử dụng làm cơ chất cảm ứng để sản xuất cellulase từ *B. subtilis* TH-VK22. Ngoài ra, rom cũng được ghi nhận là nguồn cơ chất thích hợp cho sự sản xuất cellulase của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* 1-1v khi nuôi cấy trên môi trường có pH 6,0 theo Abdel-Rahman và cộng sự [27]. Bên cạnh đó, kết quả phân tích thống kê ANOVA (độ tin cậy 95%) cho

thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nguồn cơ chất cảm ứng. Với nguồn nhiên liệu dồi dào, hiệu quả về mặt kinh tế và môi trường, rom được chọn làm nguồn cơ chất cảm ứng cho sự sinh tổng hợp cellulase của chủng *B. subtilis* TH-VK22 trong thí nghiệm khảo sát nồng độ bổ sung từ 0,5 đến 5,0%. Hình 4B cho thấy chủng *B. subtilis* TH-VK22 sinh tổng hợp cellulase có hoạt tính cao nhất khi được nuôi cấy trong môi trường có 0,5% rom với hoạt tính là $13593,3 \pm 145,0$ U/mL sau 48 giờ nuôi cấy và nồng độ 0,25% rom có hoạt tính là $12111,1 \pm 464,3$ U/mL. Khi tăng nồng độ dần lên 1,0, 2,0, 3,0, 4,0%, sự hình thành cellulase có xu hướng giảm dần với hoạt tính enzyme ghi nhận được lần lượt là $12504,4 \pm 157,5$, $11393,3 \pm 67,9$, $10126,7 \pm 692,1$ và $8525,6 \pm 863,1$ U/mL. Việc tăng nồng độ cơ chất làm giảm hoạt tính cellulase có thể do tỉ lệ của rom tương đối nhiều so với thể tích của môi trường nuôi cấy thấp làm ảnh hưởng đến sự khếch tán oxy trong quá trình nuôi cấy lắc, qua đó ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của chủng *B. subtilis* TH-VK22. Ngoài ra, kết quả phân tích thống kê ANOVA (độ tin cậy 95%) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nồng độ rom được khảo sát. Kết quả này cho thấy chủng *B. subtilis* TH-VK22 sản xuất cellulase có hoạt tính cao nhất khi được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 0,5% rom. Nồng độ này bằng một nửa so với nồng độ rom cần thiết để chủng *Bacillus* sp. 313SI sản xuất cellulase có hoạt tính cao nhất trong nghiên cứu của Varsha Goyal và cộng sự [28] và thấp hơn rất nhiều so với 50% rom cần cho *Bacillus licheniformis* 1-1v sản xuất cellulase có hoạt tính mạnh nhất trong nghiên cứu của Abdel-Rahman và cộng sự [27]. Tuy nhiên, hoạt tính của cellulase từ chủng *B. subtilis* TH-VK22 khi được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,5% rom lại cao hơn so với hai nghiên cứu trên.

3.5 Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH nuôi cấy lên sự sản xuất cellulase của *Bacillus subtilis* TH-VK22

Ngoài chịu tác động của các điều kiện dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy và pH ban đầu của môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Bacillus subtilis* TH-VK22. Do đó, chủng này được nuôi cấy trên môi trường thích hợp đã được thực hiện trong các thí nghiệm trên ở các nhiệt độ khác nhau 25, 30, 35 và 40°C nhằm đánh giá khả năng sản xuất cellulase. Sau đó, pH ban đầu của môi trường nuôi cấy từ 3,0-9,0 cũng được khảo sát trong môi trường thích hợp tương tự như khảo sát nhiệt độ. Kết quả Hình 5 thể hiện hoạt tính của cellulase từ chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22 sau mỗi 12 giờ nuôi cấy.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy (A) và pH ban đầu của môi trường nuôi cấy (B) lên khả năng hình thành enzyme cellulase của *Bacillus subtilis* TH-VK22

Hình 5A thể hiện hoạt tính cellulase của dịch nuôi cấy *B. subtilis* TH-VK22 tăng dần theo thời gian và đạt cực đại sau 48 giờ nuôi cấy. Trong đó, chủng TH-VK22 khi được nuôi ở điều kiện nhiệt độ 35°C cho cellulase có hoạt tính cao nhất là $13417,8 \pm 122,9$ U/mL, hoạt tính ở điều kiện nhiệt độ 30, 40°C lần lượt là $11395,6 \pm 215,0$ và $10062,2 \pm 334,9$ U/mL, trong khi hoạt tính của cellulase thấp nhất khi chủng TH-VK22 được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 25°C với chỉ $5795,6 \pm 451,2$ U/mL. Tuy nhiên, ở nhiệt độ nuôi cấy 35°C, hoạt tính của cellulase trong dịch nuôi cấy có xu hướng giảm sau 60 giờ nuôi cấy, trong khi hoạt tính này vẫn được duy trì cùng khoảng thời gian ở các nhiệt độ 25, 30 và 40°C. Ngoài ra, 35°C cũng được ghi nhận là nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sản xuất cellulase của chủng vi khuẩn *Bacillus albus* và *Bacillus velezensis* M2 trong nghiên cứu của Emad A. Abada và cộng sự [29], và Feng Li và cộng sự [30]. Ngoài ra, kết quả thống kê ANOVA (độ tin cậy 95%) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hoạt tính

của cellulase từ chủng *B. subtilis* TH-VK22 khi được nuôi ở 35°C so với các nhiệt độ khảo sát còn lại. Vì vậy, *B. subtilis* TH-VK22 khi nuôi cấy trên môi trường thích hợp trong các thí nghiệm trên ở điều kiện nhiệt độ 35°C có khả năng sinh tổng hợp cellulase có hoạt tính cao nhất.

Kết quả Hình 5B cho thấy khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *B. subtilis* TH-VK22 có hoạt tính cao nhất khi được nuôi trong môi trường có pH ban đầu là 5,0 với hoạt tính là 12966,7±66,7 U/mL, trong khi khoảng pH 6,0-8,0 cho hoạt tính cellulase trong dịch nuôi cấy xấp xỉ nhau là 11233,3±202,8, 11655,6±402,5 và 11288,9±33,9 U/mL, giảm khoảng 11% so với điều kiện pH 5,0 sau 48 giờ nuôi cấy. Khi nâng pH lên 9,0, hoạt tính của cellulase được thu nhận từ dịch nuôi cấy là 10544,4±103,2 U/mL, giảm nhẹ so với điều kiện pH 6,0-8,0. Bên cạnh đó, pH 3,0 và 4,0 thể hiện sự không thích hợp cho sự sản xuất cellulase khi hoạt tính thu được chỉ đạt 4322,2±147,5 và 4022,2±135,9 U/mL. Kết quả cho thấy chủng này có khả năng hoạt động tốt trong khoảng pH rộng từ 5,0-9,0, trong đó pH tốt nhất là 5,0. Ngoài ra, pH 5,0 cũng được ghi nhận là pH thích hợp nhất cho sự sinh tổng hợp cellulase của chủng *Bacillus velezensis* M2, *Penicillium* sp. và *Bacillus* sp. MKAL6 được báo cáo trong nghiên cứu của Feng Li và cộng sự [30], H. N. Prasanna và cộng sự [31], và A. L. Mokale Kognou và cộng sự [32]. Bên cạnh đó, kết quả thống kê ANOVA (độ tin cậy 95%) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hoạt tính của cellulase có trong dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* TH-VK22 trong điều kiện pH 5,0 so với các điều kiện pH còn lại. Do đó, pH 5,0 là pH ban đầu thích hợp nhất cho quá trình sinh tổng hợp cellulase của *B. subtilis* TH-VK22 trong môi trường thích hợp đã được thực hiện trong các thí nghiệm trên.

3. KẾT LUẬN

Thông qua quá trình khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp, chủng *Bacillus subtilis* TH-VK22 thể hiện khả năng sinh tổng hợp cellulase có hoạt tính cao khi được nuôi cấy trong môi trường BHM có bổ sung 11% maltodextrin, 2% peptone, 0,5% rơm. Ngoài việc sử dụng rơm làm nguồn cơ chất cảm ứng có thể làm giảm ô nhiễm môi trường do dư lượng phế phụ phẩm nông nghiệp sau khi thu hoạch, thì nghiên cứu này còn sử dụng maltodextrin, một oligosaccharide giá rẻ làm nguồn carbon để sản xuất cellulase có hoạt tính tương đối cao từ *B. subtilis* TH-VK22. Bên cạnh đó, chủng *B. subtilis* TH-VK22 còn thể hiện sự hình thành cellulase có hoạt tính tốt khi sinh trưởng trong điều kiện pH 5,0 và nhiệt độ 35°C. Đây là nhiệt độ thích hợp để sử dụng *B. subtilis* TH-VK22 trong các quy trình công nghiệp ở Việt Nam mà không cần tiêu tốn quá nhiều năng lượng để nuôi cấy chủng này. Hơn nữa, chủng *B. subtilis* TH-VK22 cũng thể hiện khả năng hoạt động tương đối ổn định trong khoảng pH rộng từ 5,0-9,0. Qua đó, *B. subtilis* TH-VK22 có thể được ứng dụng để chống chịu với sự thay đổi pH của môi trường lên men trong khi xử lý các vật liệu cellulose. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy của chủng này cũng không cần phải tiêu hao nhiều hóa chất để điều chỉnh giá trị pH ban đầu. Do đó, với những ưu điểm trên, cellulase từ *B. subtilis* TH-VK22 cho thấy tiềm năng ứng dụng rộng rãi của mình trong các ngành như công nghiệp giấy, tẩy rửa, thức ăn chăn nuôi, nông nghiệp, thực phẩm, y dược, ... và nhiên liệu sinh học. Ngoài ra, cellulase từ *B. subtilis* TH-VK22 còn có thể nghiên cứu sâu hơn về các đặc điểm hóa sinh, cấu trúc, ... nhằm tạo cơ sở, cung cấp thêm dữ liệu để so sánh, đối chiếu các nghiên cứu trong và ngoài nước về enzyme này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. V. Mohite and S. V. Patil, "A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications," *Biotechnol Appl Biochem*, vol. 61, no. 2, pp. 101-10, Mar-Apr 2014, doi: 10.1002/bab.1148.
- [2] S. Jayasekara and R. Ratnayake, "Microbial cellulases: an overview and applications," *Cellulose*, vol. 22, 2019.
- [3] E. A. Bayer, E. Morag, and R. Lamed, "The cellulosome—a treasure-trove for biotechnology," *Trends in biotechnology*, vol. 12, no. 9, pp. 379-386, 1994.
- [4] L. Ma *et al.*, "Cloning and characterization of low-temperature adapted GH5-CBM3 endo-cellulase from *Bacillus subtilis* 1AJ3 and their application in the saccharification of switchgrass and coffee grounds," *AMB Express*, vol. 10, no. 1, pp. 1-11, 2020.
- [5] L. S. Ma, Y.-M. Koo, "Pilot-Scale Production of Cellulase Using *Trichoderma reesei* Rut C-30 Fed-Batch Mode," *Microbiology and Biotechnology*, vol. 11, no. 2, pp. 229-233, 2001.
- [6] R. Gaur and S. Tiwari, "Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07," *BMC Biotechnol*, vol. 15, p. 19, Mar 19 2015, doi: 10.1186/s12896-015-0129-9.

- [7] S. A. Ladeira, E. Cruz, A. B. Delatorre, J. B. Barbosa, and M. L. L. Martins, "Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility," *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 18, no. 2, pp. 110-115, 2015, doi: 10.1016/j.ejbt.2014.12.008.
- [8] F. Islam, "Isolation and Characterization of Cellulase-producing Bacteria from Sugar Industry Waste," *American Journal of BioScience*, vol. 7, no. 1, 2019, doi: 10.11648/j.ajbio.20190701.13.
- [9] L. Liang, Z. Zhang, M. Wu, Y. Wu, and J. X. Feng, "Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1," *Biomed Res Int*, vol. 2014, p. 512497, 2014, doi: 10.1155/2014/512497.
- [10] Kunst *et al.*, "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*," *Nature*, vol. 390, no. 6657, pp. 249-256, 1997.
- [11] B. Arun K. Ray, Keka Sarkar Ghosh, and Sukanta K. Sen, "Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut," vol. 37, no. 1, pp. 47-53.
- [12] Muinat Olanike Kazeem, Kamoldeen A. Ajijolakewu, and N. A. A. Rahman, "Cellulase Production by Co-culture of *Bacillus licheniformis* and *B. paralicheniformis* over Monocultures on Microcrystalline Cellulose and Chicken Manure-supplemented Rice Bran Media," *Peer-reviewed Article*, vol. 16, no. 4, pp. 6850-6869, 2021.
- [13] Anu, S. Kumar, A. Kumar, V. Kumar, and B. Singh, "Optimization of cellulase production by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* JJBS300 and biocatalytic potential in saccharification of alkaline-pretreated rice straw," *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, vol. 51, no. 7, pp. 697-704, 2021.
- [14] A. I. Akintola, O. Oyedeji, I. O. Adewale, M. K. J. J. o. M. Bakare, Biotechnology, and F. Sciences, "Production and physicochemical properties of thermostable, crude cellulase from *Enterobacter cloacae* IP8 isolated from plant leaf litters of *Lagerstroemia indica* Linn," vol. 2021, pp. 989-994, 2021.
- [15] M. Islam, P. K. Sarkar, A. K. M. Mohiuddin, and M. Suzaudulla, "Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from *Bacillus* sp.," *Malaysian Journal of Halal Research*, vol. 2, no. 2, pp. 19-24, 2019, doi: 10.2478/mjhr-2019-0009.
- [16] M. O. Baltaci, "Enhancement of cellulase production by co-culture of *Streptomyces ambofaciens* OZ2 and *Cytobacillus oceanisediminis* OZ5 isolated from rumen samples," *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 40, no. 2, pp. 144-152, 2022, doi: 10.1080/10242422.2022.2038581.
- [17] R. C. Kuhad, R. Gupta, and A. Singh, "Microbial cellulases and their industrial applications," *Enzyme Res*, vol. 2011, p. 280696, 2011, doi: 10.4061/2011/280696.
- [18] R. S. Singh, T. Singh, and A. Pandey, "Microbial Enzymes—An Overview," in *Advances in Enzyme Technology*, 2019, pp. 1-40.
- [19] N. N. Ân, N. M. Tấn, N. T. T. Hiền, N. T. D. Hạnh, and P. T. Việt, "Phân lập và khảo sát điều kiện sinh tổng hợp cellulase của hai chủng vi khuẩn TH-VK22 và TH-VK24," *Journal of Science and Technology-IUH*, vol. 39, no. 03, 2019.
- [20] P. Bernfeld, "[17] Amylases, α and β ," 1955.
- [21] S. Singh, V. S. Moholkar, and A. Goyal, "Isolation, Identification, and Characterization of a Cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain SS35 from Rhinoceros Dung," *ISRN Microbiol*, vol. 2013, p. 728134, 2013, doi: 10.1155/2013/728134.
- [22] Y. S. Mostafa, S. A. Alamri, M. Hashem, N. A. Nafady, K. A. M. Abo-Elyousr, and Z. A. Mohamed, "Thermostable Cellulase Biosynthesis from *Paenibacillus alvei* and its Utilization in Lactic Acid Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation," *Open Life Sci*, vol. 15, pp. 185-197, 2020, doi: 10.1515/biol-2020-0019.
- [23] A. N. Goutam Banerjee and A. K. Ray, "Effect of Culture Parameters on Protease and Cellulase Production by Two Bacterial Strains, *Corynebacterium alkanolyticum* Ath3 and *Bacillus licheniformis* Cbh7 Isolated from Fish Gut," *Biotropia*, vol. 24, no. 3, pp. 192-201, 2017, doi: 10.11598/btb.201.
- [24] Saraswati Bai, M. Ravi kumar, D.J. Mukesh kumar, and M. D. B. k. P. Balashanmugam, P.T. Kalaichelvan, "Cellulase Production by *Bacillus subtilis* isolated from Cow Dung," *Archives of Applied Science Research*, vol. 4, no. 1, pp. 269-279, 2012.
- [25] S. K. Pramanik *et al.*, "Fermentation optimization of cellulase production from sugarcane bagasse by *Bacillus pseudomycoides* and molecular modeling study of cellulase," *Curr Res Microb Sci*, vol. 2, p. 100013, Dec 2021, doi: 10.1016/j.crmicr.2020.100013.
- [26] H. Ikram *et al.*, "Evaluation, Characterization and Molecular Analysis of Cellulolytic Bacteria from Soil in Peshawar, Pakistan," *Microbiology and Biotechnology Letters*, vol. 50, no. 2, pp. 245-254, 2022, doi: 10.48022/mbl.2201.01006.
- [27] Mohamed Ali Abdel-Rahman, Essam H. Abdel-Shakour, Mohamed Nour El-Din, Bahgat M. Refaat, and H. M. A. A. Emad El-Din Ewais, "A Novel Promising Thermotolerant Cellulase-Producing *Bacillus licheniformis* 1-1v Strain Suitable for Composting of Rice Straw," *International Journal of Advanced Research*, vol. 3, no. 12, pp. 413-423, 2015.

- [28] V. Goyal, A. Mittal, A. K. Bhuwal, G. Singh, A. Yadav, and N. K. Aggarwal, "Parametric optimization of cultural conditions for carboxymethyl cellulase production using pretreated rice straw by *Bacillus* sp. 313SI under stationary and shaking conditions," *Biotechnology research international*, vol. 2014, 2014.
- [29] E. Abada, R. Elbaz, H. Sonbol, and S. korany, "Optimization of Cellulase Production from *Bacillus albus* (MN755587) and Its Involvement in Bioethanol Production," *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 30, no. 3, pp. 2459-2466, 2021, doi: 10.15244/pjoes/129697.
- [30] F. Li *et al.*, "Screening of cellulose degradation bacteria from Min pigs and optimization of its cellulase production," *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 48, pp. 29-35, 2020, doi: 10.1016/j.ejbt.2020.09.001.
- [31] H. N. Prasanna, G. Ramanjaneyulu, and B. Rajasekhar Reddy, "Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp," *3 Biotech*, vol. 6, no. 2, p. 162, Dec 2016, doi: 10.1007/s13205-016-0483-x.
- [32] A. L. Mokale Kognou *et al.*, "Characterization of Cellulose-Degrading Bacteria Isolated from Soil and the Optimization of Their Culture Conditions for Cellulase Production," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 194, no. 11, pp. 5060-5082, Nov 2022, doi: 10.1007/s12010-022-04002-7.

CULTURE CONDITIONS FOR CELLULASE PRODUCTION FROM *Bacillus subtilis* TH-VK22

MOC-TAN NGUYEN, NGOC-AN NGUYEN, HANH THI-DIEU NGUYEN, TAN-VIET PHAM*

Institute of Biotechnology and Food technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, 12 Nguyen Van Bao Street, Go Vap District, Ho Chi Minh City, Vietnam.

**phamtanviet@iuh.edu.vn*

Abstract: The majority of cellulase enzymes available today are derived from microorganisms. Given their capacity for fast growth and synthesizing of a wide variety of extracellular enzymes, bacteria in particular have emerged as a class of organisms with high potential for cellulase production and application. In this study, the *Bacillus subtilis* TH-VK22 strain was investigated for its capacity to produce cellulase in basal Bushnell Haas Medium medium (BHM) supplemented with different types of carbon and nitrogen sources as well initial pH, inoculation temperature and time. The results showed that growing of *B. subtilis* TH-VK22 in BHM medium supplemented with 11.0% maltodextrin, 2.0% peptone, and 0.5% rice straw, with an initial pH of 5.0, 48 hours of inoculation at 35°C gave rise to the highest cellulase production. In addition, *B. subtilis* TH-VK22 were shown to be able to produce high amount of cellulases in a wide range of initial pH from 5.0 to 9.0. This finding highlights *B. subtilis* TH- VK22 potential in a variety of sectors, including biofuel production, food processing, waste treatment and bioremediation.

Keyword: extracellular enzyme, cellulase, bacteria, *Bacillus subtilis*, culture condition

Ngày nhận bài: 13/01/2023

Ngày chấp nhận đăng: 07/04/2023