

TUYỂN CHỌN VÀ TỐI ƯU HÓA VI KHUẨN KỶ KHÍ SINH TỔNG HỢP ENZYME CELLULASE TRÊN CƠ CHẤT BỘT GIẤY

Trần Non Nước, Võ Văn Song Toàn, Dương Thị Hương Giang và Trần Nhân Dũng¹

ABSTRACT

Optimal selection of strains, fermentation conditions and substrates, which are very important for the successful production of cellulase by bacteria, were investigated in this study. A total of 37 anaerobic bacteria was screened on modified Delafield medium, in which Whatman filter paper powder was used as substrate. The results showed that the isolate VK52 adopted the highest cellulase productivity, illustrated by the largest haloes in diameter (20.5 mm) on Congo red-containing medium. The optimal conditions for cellulase production by VK52 were determined as 30°C, pH 8 and 4-day-incubation on the medium supplemented with 0.4 % yeast extract. Paper and cellulose powder were the most favorable substrates for cellulase production by the isolate VK52 in comparison with rice straw, sugarcane bagasse and rice husk.

Keywords: anaerobic bacteria, cellulase, endoglucanase, exoglucanase, filter paper powder

Title: Selection and optimization of cellulase production by anaerobic bacteria on paper powder substrate

TÓM TẮT

Những yếu tố quan trọng trong việc sản xuất enzyme cellulase từ vi khuẩn như chọn dòng vi khuẩn, tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và chọn lọc nguồn cơ chất đã được tiến hành nghiên cứu. 37 dòng vi khuẩn kỵ khí được đem khảo sát hoạt tính trên môi trường Delafield cải tiến, với việc sử dụng bột giấy lọc Whatman làm cơ chất. Kết quả chọn dòng cho thấy vi khuẩn VK52 cho đường kính vòng tròn thủy phân lớn nhất (20,5 mm) trên môi trường nhuộm Congo-Red. Các điều kiện tối ưu cho việc sinh enzyme của vi khuẩn VK52 được xác định là tại pH 8, nhiệt độ 30⁰C và 4 ngày nuôi với môi trường nuôi cấy được bổ sung hàm lượng dịch trích nấm men là 0,4%. Nghiên cứu cũng thể hiện rằng với điều kiện nuôi cấy như trên, bột giấy và bột cellulose là hai cơ chất tốt nhất cho sự sinh enzyme cellulase từ vi khuẩn VK52 mặc dù hoạt tính enzyme cũng được thể hiện trên cơ chất bột cellulose, bột rơm, bã mía và vỏ trấu.

Từ khóa: Bột giấy, cellulase, endoglucanase, exoglucanase, vi khuẩn kỵ khí

1 GIỚI THIỆU

Cellulose là một trong những sinh khối hữu cơ phong phú và đa dạng trên trái đất này (Tomme *et al.*, 1995). Nó là sản phẩm đầu tiên của sự quang hợp trong các môi trường trên trái đất, và là nguồn tài nguyên sinh học phong phú nhất được sinh ra trong sinh quyển (100 tỷ tấn khối lượng khô/năm) mà có thể tái tạo lại được (Javis, 2003), (Zang và Lynd, 2004).

Cellulose thường được phân hủy bởi enzyme gọi là cellulase. Sự thủy phân cellulose triệt để bằng enzyme cần có sự hoạt động phối hợp đồng thời của 3 loại enzyme cellobiohydrolase (exoglucanase), endoglucanase hay

¹ Viện NC & PTCNSH, Trường Đại học Cần Thơ

carboxymethylcellulase (CMCase) và β -glucosidases (Bhat, 2000). Mặc dù được nghiên cứu sau các enzyme khác như protease, amylase (những năm 1980)...nhưng enzyme cellulase đã đóng vai trò quan trọng trong nhiều lĩnh vực đời sống. Enzyme cellulase được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như xử lý phế phẩm nông nghiệp, trong các ngành công nghiệp như trong sản xuất bia, chất tẩy, dệt, giấy, thực phẩm và cả trong y dược...(Kirk *et al.*, 2002), (Cherry và Fidantsef, 2003).

Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng enzyme cellulase – một hệ enzyme phức tạp - được sinh ra bởi nhiều vi sinh vật, phổ biến là nấm và vi khuẩn (Bahkali, 1996), (Shin *et al.*, 2000) và (Immanuel *et al.*, 2006). Mặc dù những loài nấm sợi thì tỏ ra phân hủy rất tốt các cellulose tự nhiên (Selby *et al.*, 1963), (Mandels và Reese, 1964) thế nhưng vi khuẩn lại có tốc độ sinh trưởng cao hơn so với nấm nên có tiềm năng lớn để được dùng trong việc sản xuất cellulase. Tuy nhiên, việc nghiên cứu khả năng sinh enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn nhìn chung vẫn còn khiêm tốn so với nghiên cứu trên nấm (Crawford, 1986; Li and Gao, 1996, Ekperigin, 2006). Dù vậy, đặc điểm phân giải cellulose của vài giống vi khuẩn như *Cellulomonas*, *Cellobivrio*, *Pseudomonas*, *Sporosphytophaga* spp. (Nakamura và Kappmura, 1982); *Bacillus* và *Micrococcus* (Immanuel *et al.*, 2006) đã được báo cáo.

Việc sản xuất enzyme được kiểm soát chặt chẽ với các dòng vi sinh vật và các điều kiện nuôi cấy chúng. Khả năng sinh cellulase phụ thuộc vào một quan hệ rất phức tạp liên quan đến nhiều yếu tố như nhiệt độ, pH, chất cảm ứng, chất phụ thêm vào môi trường, sự khuấy, thời gian nuôi cấy,...(Immanuel *et al.*, 2006). Do đó, việc tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme cellulase mạnh và nghiên cứu sự ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của các dòng vi khuẩn đó sẽ giúp ích cho việc sản xuất enzyme cellulase tốt hơn cũng như trong việc cải tiến các sản phẩm vi sinh, đặc biệt là trong các chế phẩm hỗ trợ và xử lý phế phẩm nông nghiệp sau thu hoạch – nơi mà thành phần cellulose chiếm tỷ lệ khá cao (hơn 50%).

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

- Nguyên liệu: Giấy lọc Whatman No.1, bã mía, bã trấu, rom, bột cellulose.
- Nguồn vi sinh vật: 37 dòng vi khuẩn kỵ khí là tập đoàn giống đã được phân lập từ bã mía, trấu, dạ cỏ và phân trâu, bò do Võ Chí Đức và Nguyễn Văn Chắc (2009) thực hiện và trữ lạnh ở 40C trong môi trường có chứa glycerol.
- Hóa chất: K_2HPO_4 (Merck), $MgSO_4.7H_2O$ (Merck), Congo Red (Merck), yeast extract (Ấn Độ), bột cellulose (Ấn Độ), Carboxylemethyl Cellulose (CMC) (Merck), $(NH_4)_2SO_4$ (Merck), Tris- HCl (Sigma), NaOH (Merck), NaCl, Agar,...
- Môi trường nuôi vi khuẩn là môi trường Delafield (Ryckeboer *et al.*, 2003).
- Các thiết bị và dụng cụ dùng trong phòng thí nghiệm CNSH vi sinh vật, Công nghệ enzyme và Sinh hóa.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Tuyển chọn dòng vi khuẩn kỵ khí có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất

Với mục đích so sánh và tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp cellulase, các dòng thuần được khảo sát khả năng này trong môi trường thạch Delafield (Ryckeboer *et al.*, 2003). Từng dòng vi khuẩn trong ống nghiệm giống trữ trong glycerol được đem cấy chuyển sang các đĩa thạch môi trường Delafield với cơ chất bột giấy rồi đem ủ ở 30°C trong 3 ngày để kích hoạt lại khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase. Tiếp theo, các dòng vi khuẩn kỵ khí đó tiếp tục được chuyển sang nuôi trong môi trường Delafield cơ chất bột giấy (không có agar) ở nhiệt độ và thời gian như trên. Sau đó, 20 µl dịch nuôi của mỗi dòng vi khuẩn được cho vào các giếng đã được khoét sẵn trên môi trường thạch bột giấy, rồi đem ủ kỵ khí ở 30°C. Sau 5 ngày ủ, các đĩa trên được lấy ra khỏi bình ủ kỵ khí và đem nhuộm Congo Red để đánh giá khả năng thủy phân cellulose có trong bột giấy của các dòng vi khuẩn kỵ khí thông qua độ lớn của đường kính vòng tròn thủy phân. Việc kiểm tra hoạt tính cellulase bằng việc đo đường kính vòng tròn thủy phân được tiến hành theo phương pháp đã miêu tả bởi Laurent *et al.* (2000).

2.2.2 Khảo sát sự ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp cellulose của dòng vi khuẩn đã chọn

Dòng vi khuẩn cho đường kính vòng tròn thủy phân cao nhất được tuyển chọn từ thí nghiệm 2.2.1 tiếp tục được đem đi tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng sinh enzyme cellulase của chúng. 20 µl dịch nuôi của dòng vi khuẩn đã chọn được đem chủng vào các đĩa thạch môi trường bột giấy có pH thay đổi từ 4 đến 11. Sau đó, các đĩa được đem ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C. Tương tự thí nghiệm 2.2.1, sau 5 ngày ủ, khả năng sinh enzyme cellulase của dòng vi khuẩn vẫn được đo bằng phương pháp nhuộm Congo Red theo mô tả của Lauren *et al.* (2000).

2.2.3 Khảo sát sự ảnh hưởng của dịch trích nấm men lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn đã chọn

Với mục đích xác định hàm lượng dịch trích nấm men thích hợp thêm vào môi trường nuôi cấy cho sự sinh tổng hợp cellulase tốt nhất của dòng vi khuẩn, 300 µl dịch vi khuẩn đã chọn được chủng vào các ống falcon 15ml môi trường bột giấy (không có agar) đã bổ sung các hàm lượng dịch trích nấm men khác nhau 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%. Trong đó, pH của môi trường đã được chỉnh về pH chọn được ở thí nghiệm 2.2.2. Sau thời gian nuôi 3 ngày ở nhiệt độ chọn được ở thí nghiệm 2.2.2, dịch enzyme thô được thu nhận bằng cách ly tâm lạnh 7000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Hoạt tính enzyme cellulase và hàm lượng protein sinh ra lần lượt được đo bằng phương pháp Nelson – Somogyi (1944) và Bradford (1976).

2.2.4 Khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian nuôi đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn đã chọn

Dòng vi khuẩn đã chọn được chủng vào các ống falcon 15ml môi trường dinh dưỡng bột giấy đã bổ sung hàm lượng dịch trích nấm men đã chọn được ở thí nghiệm 2.2.3, với giá trị pH đã hiệu chỉnh phù hợp và nhiệt độ ủ đã chọn được ở

thí nghiệm 2.2.2. Các enzyme sinh ra được thu nhận bằng cách ly tâm như trình bày ở trên sau 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ngày nuôi. Sau đó, hoạt tính enzyme cellulase và hàm lượng protein sinh ra được xác định như đã trình bày ở trên.

2.2.5 Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy chọn được cho dòng vi khuẩn trên các môi trường bột giấy, bột cellulose, bột rom, bã mía, vỏ trấu

Các cơ chất có chứa cellulose khác nhau gồm bột giấy, bột cellulose, bột vỏ trấu, bột bã mía, bột rom, được sử dụng như là các nguồn carbon trong môi trường dinh dưỡng sinh tổng hợp cellulase. 300 μ l dịch vi khuẩn được đem chủng vào các ống falcon có chứa hàm lượng dịch trích nấm men đã chọn, rồi đem đi ủ nuôi với các điều kiện đã chọn ở các thí nghiệm trên. Sau đó, hoạt tính enzyme thô và hàm lượng protein sinh ra cũng được xác định như đã trình bày ở trên.

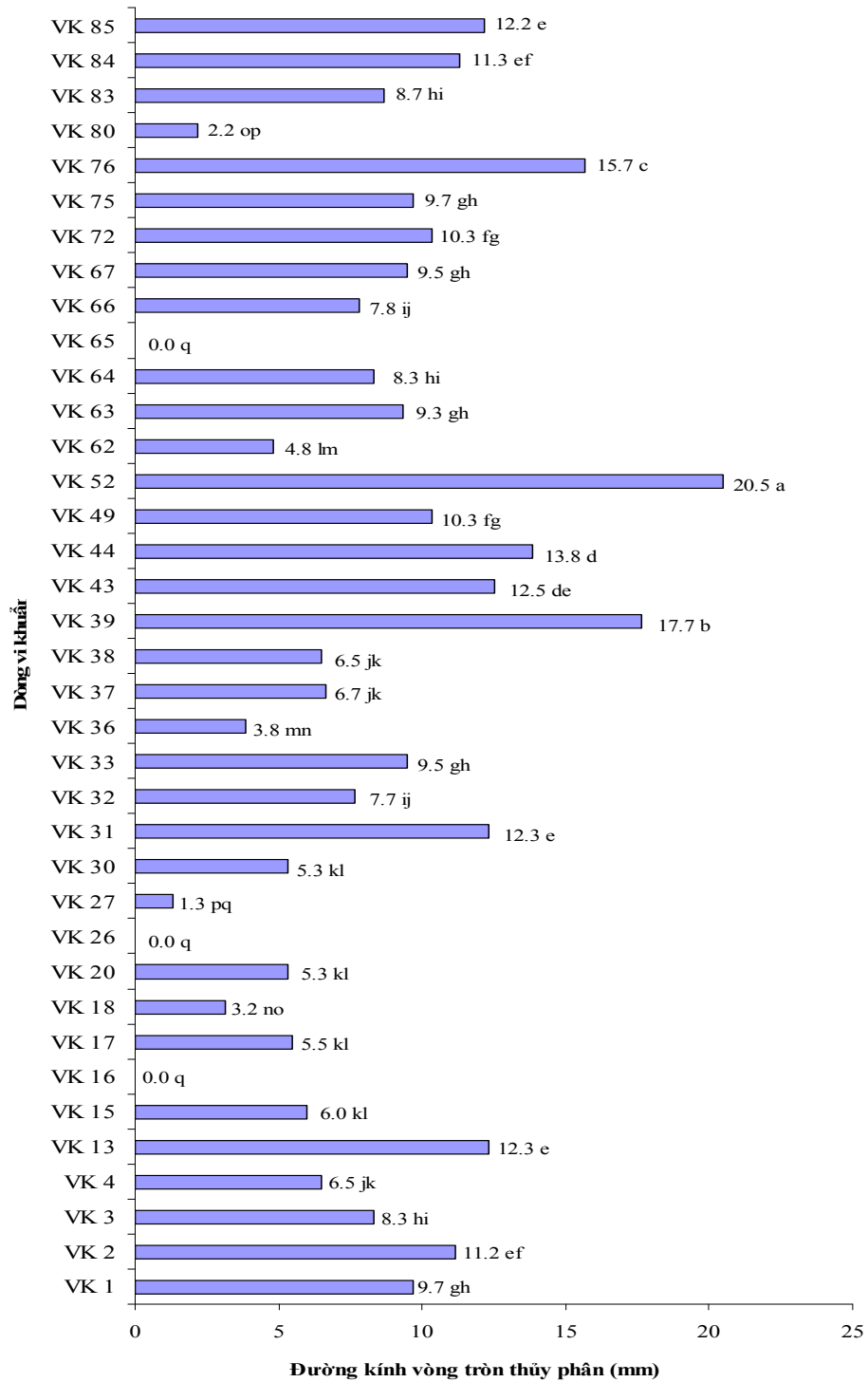
2.3 Bố trí thí nghiệm và phân tích thống kê

Tất cả số liệu thu được trong đề tài được phân tích thống kê ANOVA (Analysis of Variance) dưới bố trí thí nghiệm hoàn toàn ngẫu nhiên CRD (Completely Randomized Design). Tất cả thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị trung bình được so sánh bằng việc kiểm tra thống kê khác biệt có ý nghĩa LSDT (Least Significant Difference Test) bằng phần mềm *Statgraphic version 3.0*.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tuyển chọn dòng vi khuẩn kỵ khí có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất

Hình 1 thể hiện khả năng sinh enzyme cellulase của 37 dòng vi khuẩn kỵ khí thông qua việc đo đường kính vòng tròn thủy phân. Sau 5 ngày ủ ở nhiệt độ 30⁰C trên môi trường thạch, ngoại trừ một số dòng vi khuẩn như 16, 26, 65 là không thể hiện hoạt tính cellulase, các dòng vi khuẩn còn lại trong bộ giống đều thể hiện hoạt tính. Nhìn chung, đa số các dòng vi khuẩn này đều thể hiện hoạt tính khá thấp với sự biểu hiện đường kính vòng tròn thủy phân đều dưới 10 mm. Chẳng hạn như các dòng vi khuẩn số 1, 3, 15, 17, 27, 32, 64, 80, 83... tương ứng các giá trị đạt được là 9,7; 8,3; 6,0; 5,5; 1,3; 7,7; 8,3; 2,2; 8,7 mm... Bên cạnh đó, một số dòng vi khuẩn sinh tổng hợp cellulase khá tốt với đường kính vòng tròn thủy phân cao hơn 10 mm như dòng 2, 13, 84, 85... Trong đó, hoạt tính được biểu hiện khá mạnh ở các dòng vi khuẩn 44, 76, 39 tương ứng với các giá trị đường kính vòng tròn thủy phân là 13,8; 15,7; 17,7 mm, đặc biệt hoạt tính cellulase sinh ra cao nhất ở dòng vi khuẩn được ký hiệu là 52 tương ứng với giá trị đường kính vòng tròn thủy phân là 20,5 mm. Như vậy dòng vi khuẩn ký hiệu 52 được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.



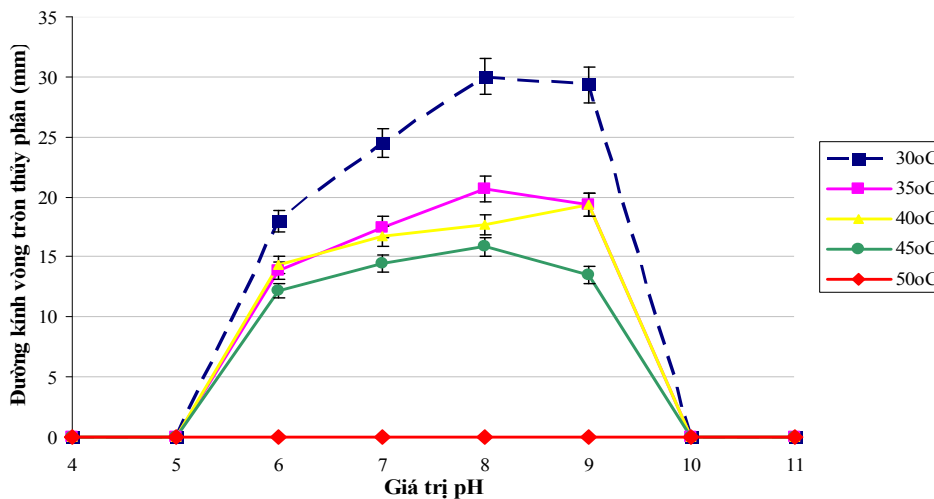
Hình 1: Đường kính vòng tròn thủy phân các dòng vi khuẩn đem khảo sát

Ghi chú: Trong cùng một dòng vi khuẩn, các giá trị thu được đều đã được trừ đi đường kính lỗ đục và được xử lý thống kê sự khác biệt có ý nghĩa ở mức độ 5%. Số liệu là giá trị của 3 lần lặp lại.

3.2 Ảnh hưởng của điều kiện pH và nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn 52

Hình 2 trình bày sự tương tác giữa pH và nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn 52. Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng có sự tương tác ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn 52. Trong đó, tại các giá trị pH thấp (4 và 5) hoặc kiềm (10 và 11) thì dòng vi khuẩn không thể hiện hoạt tính cellulase ở tất cả các nhiệt độ sau 5 ngày ủ. Việc sinh tổng hợp cellulase bắt đầu thể hiện ở pH 6 và quan sát khá rõ đường tròn thủy phân ở pH 7 và đạt giá trị cao nhất tại pH 8 và giảm nhẹ tại pH 9 với sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95% tại mọi nhiệt độ trong bố trí thí nghiệm.

Về sự ảnh hưởng của nhiệt độ, sự thay đổi đường kính thủy phân cũng tương tự như với ảnh hưởng của giá trị pH. Giá trị trung bình đường kính vòng tròn thủy phân đạt cao nhất tại nhiệt độ 30⁰C sau đó giảm dần ở các nhiệt độ còn lại với mọi giá trị pH thay đổi. Tuy nhiên, đặc biệt là tại nhiệt độ 40⁰C, giá trị đường kính vòng tròn thủy phân ở giá trị pH 9 cao hơn của giá trị tối ưu pH 8 (tương ứng với giá trị 19,3 mm và 17,7 mm) trong khi đó tại các nhiệt độ khác thì đường kính vòng tròn thủy phân ở giá trị pH 8 luôn cao hơn của pH 9.



Hình 2: Ảnh hưởng tương tác pH và nhiệt độ đến sự sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn 52

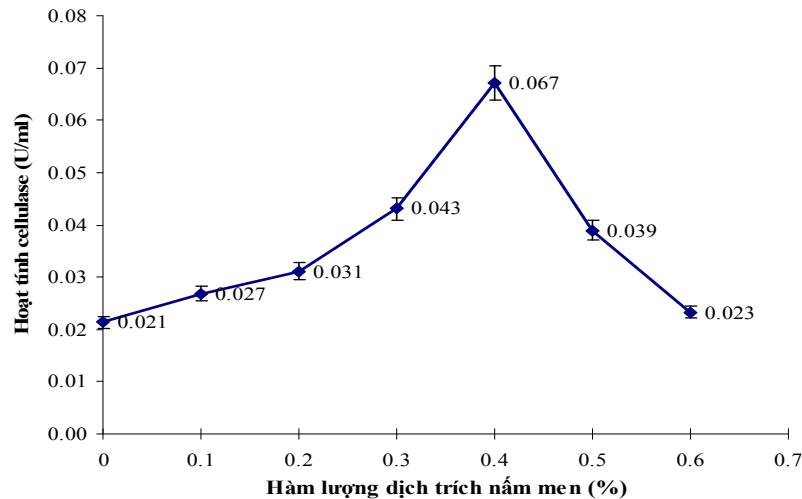
Tóm lại, kết quả thí nghiệm đã chỉ ra rằng có sự ảnh hưởng tương tác giữa nhân tố pH và nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn 52. Giá trị pH 8 và nhiệt độ là 30⁰C được chọn là tối ưu cho việc sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn (ứng với giá trị đường kính vòng tròn thủy phân là 30 mm) và được sử dụng bố trí cho các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả của thí nghiệm này tương tự với một số nghiên cứu trên thế giới trong việc khảo sát sự ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng sinh cellulase của các dòng vi khuẩn. Sự ảnh hưởng của các yếu tố môi trường và dinh dưỡng lên sự sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của *Bacillus alcalophilus* S39 và *Bacillus amyloliquefaciens* C2₃ cũng đã được nghiên cứu (Abou-Taleb et al., 2009). Kết

quả của bài báo chỉ ra rằng giá trị pH là 7 được thấy là tối ưu cho sự sinh trưởng và sản sinh cellulase. Nhiệt độ ủ tối ưu để đạt hoạt tính cao nhất của enzyme cellulase lần lượt là 30⁰C và 45⁰C cho các dòng *Bacillus alcalophilus* S39 và *Bacillus amyloliquefaciens* C23. Tương tự, Fred (1972) cũng đã nghiên cứu rằng giá trị pH tối ưu cho sự sinh tổng hợp enzyme cellulase bởi *Thermomonospora curvata* là 8.

3.3 Ảnh hưởng dịch trích nấm men đến sự sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn

Dịch trích nấm men thường được xem là thành phần bổ sung dinh dưỡng trong các môi trường nuôi cấy vi sinh vật. Hàm lượng dịch trích nấm men được thêm vào các môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng tích cực đến khả năng sinh trưởng và sự sinh tổng hợp các enzyme của các dòng vi sinh vật. Tuy nhiên, tùy mỗi loài vi sinh vật mà lượng dịch trích nấm men tối ưu cần thêm vào là khác nhau.



Hình 3: Ảnh hưởng của dịch trích nấm men đến sự sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn 52

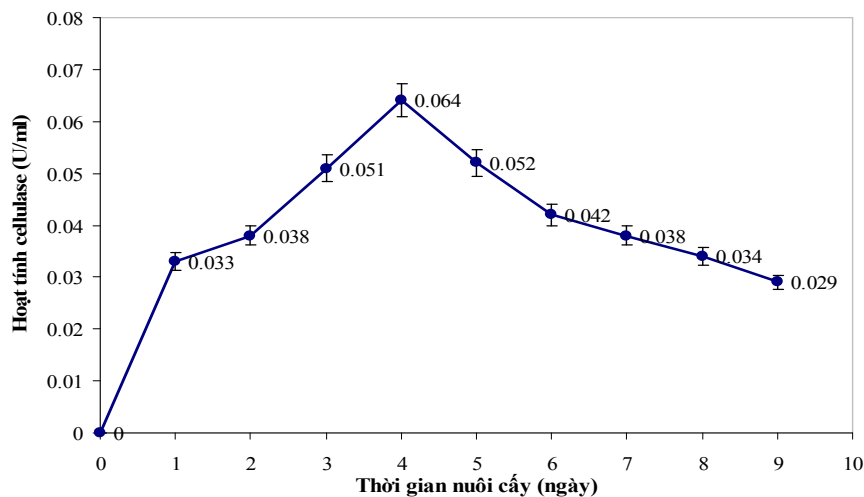
Ảnh hưởng của dịch trích nấm men đến sự sinh tổng hợp enzyme cellulase của dòng vi khuẩn 52 được trình bày trong hình 3. Kết quả cho thấy rằng có sự khác biệt rất rõ giữa nghiệm thức có bổ sung dịch trích nấm men và không có bổ sung dịch trích nấm men. Trong trường hợp không có sự bổ sung dịch trích nấm men thì hoạt tính cellulase đạt được là 0,021 U/ml, trong khi với sự bổ sung dịch trích nấm men thì nhìn chung hoạt tính cellulase tăng lên đáng kể. Trong đó, hoạt tính cao nhất đạt được là 0,067 U/ml tại giá trị dịch trích nấm men bổ sung vào là 0,4 % (gấp 3 lần so với không bổ sung dịch trích nấm men). Sau đó hoạt tính giảm dần từ hàm lượng 0,5 % đến 0,6 % (tương ứng với giá trị hoạt tính là 0,039 và 0,023 U/ml). Việc giảm hoạt tính cellulase bắt đầu từ hàm lượng 0,5 % và 0,6 % có thể là do hàm lượng dinh dưỡng bổ sung vào quá nhiều làm cho sự tăng trưởng và sinh tổng hợp cellulase tốt dẫn đến lượng đường khử sinh ra nhiều quay lại làm ức chế hoạt động của cellulase (Howell and Mangat, 1978).

Như vậy, dịch trích nấm men được bổ sung vào môi trường nuôi cấy như là chất kích thích khả năng sinh tổng hợp cellulase ở dòng vi khuẩn 52. Hàm lượng dịch trích nấm men tối ưu thêm vào được chọn là 0,4 %.

Kết quả của thí nghiệm phù hợp với các nghiên cứu khác trên thế giới, và hầu hết các bài nghiên cứu đều chỉ ra rằng khi dịch trích nấm men được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đóng vai trò là chất kích thích sự tăng trưởng cũng như khả năng sinh tổng hợp cellulase của vi sinh vật (Amtul, 1989), (Azzaz, 2009), (Abou-Taleb et al., 2009). Sự bổ sung hàm lượng dịch trích nấm men tối ưu được thay đổi tùy theo các dòng vi khuẩn khác nhau tại các điều kiện nuôi cấy khác nhau. Amtul (1989) công bố rằng hàm lượng dịch trích nấm men tối ưu thêm vào môi trường nuôi cấy dòng vi khuẩn *Cellulomonas flavigena* là 0,2% tương ứng với giá trị hoạt tính CMCase đạt cao nhất là 10 U/ml, trong khi đó tác giả Abou-Taleb đã nghiên cứu rằng hàm lượng 0,7 % dịch trích nấm men là tối ưu cho dòng *B. alcalophilus* S39 và *B. amyloliquefaciens* C23 ứng với giá trị hoạt tính CMCase cao nhất đạt được lần lượt là 2,35 và 2,30 U/ml (Abou-Taleb et al., 2009). Lee và Blackburn (1975) đã chỉ ra rằng hoạt tính CMCase đạt giá trị cao nhất là 0,124 U/ml của dòng vi khuẩn ưa nhiệt *Clostridium sp.* M7 với việc bổ sung 0,5% dịch trích nấm men mặc dù ở hàm lượng 0,2 và 0,3% việc sinh tổng hợp cellulase trên mỗi tế bào có cao hơn ở hàm lượng 0,5%.

3.4 Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn

Thời gian nuôi cấy cũng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng mạnh đến sự sinh tổng hợp cellulase của vi sinh vật. Vì thế, thí nghiệm khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian được tiến hành trên dòng vi khuẩn 52 đã chọn.



Hình 4: Sự thay đổi hoạt tính cellulase theo thời gian nuôi cấy

Hình 4 biểu diễn sự thay đổi hoạt tính cellulase qua 9 ngày nuôi cấy trong các điều kiện nuôi cấy tối ưu pH, nhiệt độ và hàm lượng dịch trích nấm men bổ sung đã chọn được ở các thí nghiệm trên. Nhìn chung, hoạt tính của enzyme tăng lên nhanh chóng trong 4 ngày đầu. Trong đó, ở 3 ngày đầu thì hoạt tính enzyme tăng nhẹ ứng với các giá trị 0,033; 0,038; 0,051 U/ml. Hoạt tính cellulase đạt giá trị cực đại là 0,064 U/ml ở ngày thứ 4. Sau đó, hoạt tính bắt đầu giảm rõ rệt từ ngày nuôi cấy thứ 5 (ứng với giá trị là 0,052 U/ml) đến ngày thứ 9 đạt giá trị hoạt tính giảm còn thấp nhất là 0,029 U/ml. Sự giảm hoạt tính sau 4 ngày có thể là do sự biến tính của

enzyme, bắt đầu từ sự thay đổi pH (Krishna, 1999) và sự trao đổi chất của tế bào (Liu và Yang, 2007) trong suốt quá trình lên men. Ngoài ra, sau 4 ngày thì hàm lượng dinh dưỡng và cơ chất cảm ứng trong môi trường đã giảm đi dẫn đến sự giảm việc sinh tổng hợp cellulase của vi khuẩn (Laurent et al., 2000). Một lời giải thích khác nữa là do sự ảnh hưởng do tích lũy cellobiose, được công bố là gây nên sự ức chế hoạt động của cả endoglucanase và β -glucosidase (Howell và Mangat, 1978).

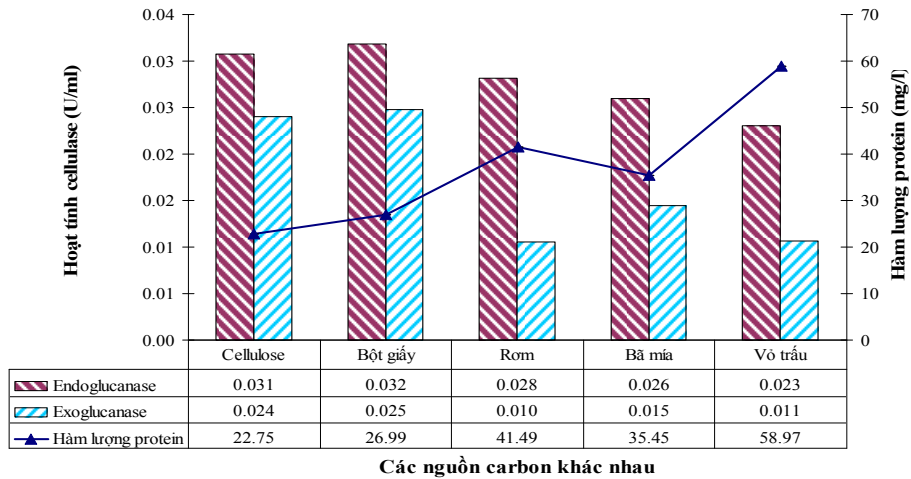
Kết quả của thí nghiệm tương tự với nghiên cứu của Ray et al. (2007), đã cho rằng việc sinh tổng hợp cellulase tối ưu đạt được tại 96 giờ nuôi cấy cho 2 dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CY5 và *Bacillus circulans* TP3 ứng lần lượt các giá trị hoạt tính là 30,5 và 25 U/ml, sau đó, hoạt tính enzyme giảm dần theo thời gian.

Tuy nhiên, thời gian nuôi tối ưu cũng tùy thuộc và đặc trưng cho từng dòng vi khuẩn cũng như môi trường cơ chất cảm ứng khác nhau. Chẳng hạn như dòng *Cellulomonas flavigena* thì hoạt tính CMCase và Avicelase của dòng đạt cao nhất lần lượt là 10 và 1,2 U/ml sau 72 giờ lên men (Amtul, 1989), trong khi đó Abhaykumar (1992) phát hiện rằng hoạt tính CMCase của dòng *Vibrio agarliquefaciens* đạt giá trị cực đại là 0,09 IU/ml tại ngày nuôi thứ 9 tại pH 7. Ngoài ra, Azzaz (2009) cũng đã công bố rằng sự sinh cellulase bởi *A. niger* và *A. flavus* NRL 5521 trên cơ chất bột cellulose đạt giá trị cực đại sau 48 giờ ủ.

3.5 Khảo sát các nguồn carbon cơ chất nuôi khác nhau đến sự sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn

Hình 5 biểu diễn hoạt tính của enzyme cellulase (endoglucanase và exoglucanase) và hàm lượng protein sinh ra trong dịch nuôi cấy của dòng vi khuẩn 52 với sự thay đổi của các nguồn carbon trong các điều kiện tối ưu đã chọn. Trong số tất cả các nguồn carbon được dùng, bột giấy và bột cellulose được xác định là nguồn carbon tốt nhất cho việc sinh enzyme endoglucanase (0,032 U/ml và 0,031 U/ml) và exoglucanase (0,025 U/ml và 0,024 U/ml). Trong khi đó, các cơ chất còn lại như rơm, bã mía, vỏ trấu cũng có vai trò là chất cảm ứng cho việc sinh các enzyme cellulase nhưng ở mức độ thấp hơn. Nổi bật là cơ chất rơm với việc cho hoạt tính endoglucanase tương đối cao (0,028 U/ml) so với bã mía và vỏ trấu (0,026 U/ml và 0,023 U/ml). Trong khi đó, hàm lượng protein sinh ra trong dịch nuôi cấy trên cơ chất rơm, bã mía và vỏ trấu lần lượt là 41,49; 35,45 và 58,97 μ g/ml, cao hơn nhiều so với bột giấy và bột cellulose (26,99 và 22,75 μ g/ml). Điều này có thể giải thích là trên các cơ chất như rơm, bã mía, vỏ trấu có chứa lignin, hemicellulose và xylan...bao bọc quanh cấu trúc cellulose; vì thế, khi phân hủy cơ chất này vi khuẩn cần phải có sự phối hợp hoạt động thêm của các loại enzyme khác như ligninase, hemicellulase hay xylanase...để phá vỡ cấu trúc bền vững này; từ đó, các enzyme cellulase mới thể hiện hoạt tính được. Sự xuất hiện và hoạt động đồng thời của nhiều loại enzyme cùng lúc dẫn đến sự ức chế hoạt động lẫn nhau của các enzyme đồng thời làm tăng lên hàm lượng protein trong dịch nuôi cấy (Badhan et al., 2004).

Kết quả thí nghiệm đã chỉ ra rằng cơ chất bột giấy và bột cellulose là nguồn carbon tốt cảm ứng cho việc sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn 52. Ngoài ra, trên các nguồn cơ chất như rơm, bã mía và vỏ trấu, hoạt tính cellulase đạt được cũng cho kết quả khá tốt.



Hình 5: Ảnh hưởng của các nguồn carbon cơ chất khác nhau lên sự sinh tổng hợp cellulase (endoglucanase và exoglucanase) của dòng vi khuẩn 52 với các điều kiện nuôi tối ưu đã chọn

4 KẾT LUẬN

Trong 37 dòng vi khuẩn kỵ khí đem khảo sát hoạt tính, đề tài đã chọn được dòng vi khuẩn 52 có khả năng sinh tổng hợp cellulase cao nhất trên môi trường cơ chất bột giấy. Việc sinh enzyme cellulase của dòng vi khuẩn đạt cao nhất với hàm lượng dịch trích nấm men thêm vào môi trường nuôi là 0,4%, với thời gian nuôi 4 ngày ở nhiệt độ 30⁰C tại giá trị pH 8.

Nghiên cứu cho thấy rằng dòng vi khuẩn 52 không những có tiềm năng trong việc sinh tổng hợp cellulase trên cơ chất bột giấy mà còn có thể được ứng dụng trong việc xử lý các phế phẩm nông nghiệp sau thu hoạch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abhaykumar, V.K. and H.C. Dube, 1992. Cellulases of *Vibrio agar-liquefaciens* isolated from sea mud. *Microbiol. and Biotechnol.* (8): 313-315.
- Abou-Taleb, A.A. Khadiga, W.A. Mashhoor, A. Sohair, M.S. Sharaf and H.M. Hoda, 2009. Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic *Bacilli*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(3): 2429-2436.
- Amtul, J. S., 1989. Purification and Characterization of Microbial Cellulolytic Enzymes. Ph.D. Thesis, Institute of Chemistry, University of the Punjab Lahore – 1, Pakistan, pp: 176.
- Ariffin, H, N. Abdullah, M.S.U. Kalsom, Y. Shirai, M.A. Hassan, 2006. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *Int. J. Eng. Tech.* 3(1):47-53.
- Azzaz, H.H., 2009. Effect of cellulolytic enzymes addition to diets on the productive performance of lactating goats. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt, pp: 141.
- Badhan, A.K., B.S. Chadha, K.G. Sonia, H.S. Saini and M.K. Bhat, 2004. Functionally diverse multiple xylanases of thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* IMI 387099. *Enz. and Microbiol. Technol.* 35, 460–466.
- Bahkali, A.H., 1996. Influence of various carbohydrates on xylanase production by *V. tricorpus*. *Bioresource Technol.* 33(3): 265 - 268.

- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotech. Adv.* 18: 355-383. 20
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 142-146.
- Cherry, J.R. and A.L. Fidantsef, 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 438-443.
- Fred, J. S., 1972. Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata*: Nutritional requirements for cellulase production. *Journal of American Society for Microbiol.* 24 (1): 77-82.
- Howell, J.A. and M. Mangat, 1978. Enzyme deactivation during cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 847-863.
- Immanuel, G., R. Dhanusa, P. Prema and A. Palavesam, 2006. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 3(1): 25-34.
- Jarvis, M., 2003. Cellulose stacks up. *Nature* 426: 611-612.
- Kirk, O., T.V. Borchert and C.C. Fuglsang, 2002. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 345-351.
- Knowles, J., P. Lethovaara and T. Teeri, 1987. Cellulase families and their genes. *Trends Biotechnol.* 5: 255-261.
- Krishna, C., 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresour. Technol.* 69, 231-239.
- Laurent P., L. Buchon, J.F.G. Michel, N. Orange, 2000. Production of pectate lyases and cellulases by *Chryseomonas luteola* strain MFCL0 depends on the growth temperature and the nature of the culture medium: evidence for two critical temperatures. *App. and Env. Micro.* 66 (4) 1538- 1543.
- Lee B. H. and T. H. Blackburn, 1975. Cellulase Production by a Thermophilic Clostridium Species. *App. Micro.* 30 (3) 346-353.
- Lynd L.R., P.J. Weimer, W.H. Zyl and I.S. Pretorius, 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 66: 506-577.
- Nakamura K. and K. Kppamura, 1982. Isolation and identification of crystalline cellulose hydrolyzing bacterium and its enzymatic properties. *J. Ferment. Technol.* 60(4): 343 - 348.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem.* 153: 375-80.
- Ray, A.K., A. Bairagi, K.S. Ghosh and S.K. Sen, 2007. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyol. Piscat.* 37 (1): 47-53.
- Ryckeboer J., J. Megaert, J. Coosemans, K. Deprins and J. Swings, 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Jour of Appl. Microbiol* 94: 127 – 137.
- Shin, C.S., J.P. Lee, P.S. Lee and S.C. Park, 2000. Enzyme production of *Trichoderma reesi* Rut C-30 on a various lingocellulosic substrates. *Appl. Biochem and Biotechnol.* 84-86: 237-245.
- Teeri, T. T., 1997. Crystalline cellulose degradation: New insights into the function of cellobiohydrolases. *Trend Biotechnol.* 15: 160-167.
- Tomme, P., R.A. Warren and N.R. Gilkes, 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 37: 1-81.
- Wood, T.M. and V. Garica-Campayo, 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1: 147-161.
- Zhang, Y.H.P. and L.R. Lynd, 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88: 797-824.