

Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sự tăng trưởng và hoạt tính enzyme cellulase của *Bacillus amyloliquefaciens* B17

Trần Thùy Trang^{*1}, Nguyễn Như Hoàn Hảo^{**}, Trần Đức Long^{***}, Trần Thị Phấn^{*}, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt^{*}, Đinh Anh Hòa^{*}, Nguyễn Thị Thùy Dương^{*}, Hà Thị Loan^{*}, Lê Thị Mai Châm^{*}

^{*}Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

^{**}Công ty TNHH Medochemie

^{***}Công ty TNHH Hasan Dermapharm

¹tranthuytrang213@gmail.com

Tóm tắt

Bacillus amyloliquefaciens có vai trò quan trọng trong phát triển nền nông nghiệp tuần hoàn nhờ khả năng phân giải cellulose hiệu quả, góp phần xử lý phụ phẩm nông nghiệp thành phân bón cho cây trồng. *Bacillus amyloliquefaciens* vừa sinh tổng hợp cellulase ngoại bào với hoạt tính cao vừa đối kháng mạnh với tác nhân gây bệnh, đồng thời sinh trưởng mạnh, dễ nuôi cấy trên môi trường nhân tạo. Chủng *B. amyloliquefaciens* B17 đã được phân lập, tuyển chọn nhờ khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase mạnh. Thành phần môi trường nhân nuôi chủng *B. amyloliquefaciens* B17 đã được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng theo thiết kế phức hợp trung tâm (Central Composite Design, CCD). Kết quả cho thấy chủng B17 có khả năng sinh trưởng, phát triển mạnh (mật số $3,3 \times 10^{10}$ (CFU/ml), đồng thời cho hoạt tính cellulase cao (16,41 UI/ml) trên môi trường chứa 30 g/l cao nấm men, 5 g/l rỉ đường, 0,01 g/l MgSO₄, 10 g/l NaCl và 2 g/l K₂HPO₄.

© 2025 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận	12/06/2025
Được duyệt	26/07/2025
Công bố	26/11/2025

Từ khóa

Bacillus amyloliquefaciens B17, cellulase, rỉ đường, cao nấm men.

1. Đặt vấn đề

Chế phẩm vi sinh vật góp phần quan trọng vào sự phát triển của nền nông nghiệp tuần hoàn bền vững. Trong số các vi sinh vật, *Bacillus* spp. được đánh giá cao nhờ khả năng sinh enzyme cellulase hiệu quả, giúp xử lý phụ phẩm nông nghiệp thành phân bón và cải thiện độ phì nhiêu của đất. Cellulose chiếm tỷ lệ lớn trong cấu trúc thành tế bào thực vật. Đây là polysaccharide phổ biến nhất trong tự nhiên, nhưng có cấu trúc bền vững và khó bị phân hủy, nên việc sử dụng nguồn tài nguyên này trong sản xuất còn nhiều hạn chế [1]. Trong số các vi khuẩn sinh enzyme cellulase, *Bacillus amyloliquefaciens* nổi bật nhờ đặc tính sinh trưởng mạnh, dễ nuôi cấy trên môi trường nhân tạo và tiết cellulase ngoại bào với hoạt tính cao [2]. Ngoài ra *B. amyloliquefaciens* có nhiều đặc tính sinh học có lợi như đối kháng với nấm bệnh, kích thích sự phát triển cây trồng, phân giải lân, cố định đạm, ... [3]. Đặc biệt là khả năng sản xuất enzyme cellulase [4] ứng dụng trong xử lý các phế phụ phẩm nông nghiệp. Việc này giúp tạo nguồn phân bón dinh dưỡng cho cây trồng,

hạn chế tối đa việc lạm dụng phân hóa học của nông dân và giải quyết ô nhiễm môi trường.

Tuy nhiên, các yếu tố môi trường nhân nuôi như nguồn carbon, nitơ và khoáng chất ảnh hưởng nhiều đến quá trình phát triển và tổng hợp enzyme cellulase ở vi khuẩn *Bacillus* [5]. Hơn nữa, mỗi chủng vi khuẩn thường có các điều kiện tối ưu riêng biệt để đạt hoạt tính cellulase tốt nhất. Việc chọn môi trường nhân nuôi thích hợp sẽ giúp nâng cao hiệu quả sử dụng chế phẩm vi khuẩn khi ứng dụng thực tế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định ảnh hưởng và tối ưu hóa thành phần môi trường đến sự tăng trưởng và hoạt tính enzyme cellulase của *B. amyloliquefaciens* B17.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B17 từ bộ sưu tập giống Vi sinh vật, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đặc điểm đại thể, vi thể và khả năng phân giải cellulose của B. amyloliquefaciens B17

Xác định đặc điểm đại thể, vi thể

Vi khuẩn được cấy rìa, tạo khuẩn lạc đơn trên TSA (Tryptone Soya Agar). Sau 24 giờ, quan sát đặc điểm hình thái đại thể vi khuẩn và tiến hành nhuộm Gram để kiểm tra đặc điểm vi thể. Tế bào vi khuẩn bắt màu tím là Gram dương, màu hồng là Gram âm [6].

Xác định khả năng phân giải cellulose

Hút 100 µl dịch tăng sinh trong TSB (Tryptone Soya Broth) vào các giếng trên đĩa thạch chứa 1% CMC. Sau 48 giờ, dung dịch lugol được nhỏ lên bề mặt đĩa nhằm phát hiện và đo kích thước vòng phân giải [7].

2.2.2. Ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy đến mật số và hoạt tính enzyme cellulase

Hút 1 ml dịch khuẩn tăng sinh sau 24 giờ trong TSB cho vào 100 ml sáu loại môi trường đã được vô trùng với thành phần ở Bảng 1 và ủ lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 24 giờ. Ghi nhận mật số (CFU/ml) và hoạt độ enzyme cellulase (UI/ml). Thực hiện 3 lần lặp lại trên 1 nghiệm thức.

Bảng 1 Thành phần các nghiệm thức khảo sát

S T T	Thành phần	Nồng độ các thành phần ở các môi trường (g/l)					
		MT 1	MT 2	MT 3	MT 4	MT 5	MT 6
1	CMC	10	10	10		10	20
2	(NH ₄) ₂ SO ₄	1		5	15	1	
3	K ₂ HPO ₄	1		1,14 5	2,13	1	5
4	MgSO ₄	0,5			1	0,5	
5	NaCl	0,1			7,5	0,00 1	10
6	Tryptone		2				
7	KH ₂ PO ₄		4	1			
8	Na ₂ HPO ₄		4				
9	MgSO ₄ .7H ₂ O		0,2	0,4			0,2
10	CaCl ₂ .2H ₂ O		0,00 1	0,05	0,2		

1	FeSO ₄ .7H ₂ O		0,00 4	0,00 125			
1	Ri đường				10		
1	Cao nấm men						5

Phương pháp đo hoạt độ cellulase

Hoạt độ enzyme (A) được xác định thông qua hàm lượng đường khử do thủy phân cơ chất CMC. Phản ứng tạo màu giữa đường khử và thuốc thử acid dinitrosalicylic (DNS), sau đó được đo mật số quang ở bước sóng 530 nm. Nồng độ đường khử được tính toán dựa trên đường chuẩn glucose [8].

$A = \frac{x.k.V}{v.t}$. Với, A: hoạt độ enzyme cellulase (UI/ml), x: nồng độ glucose (µmole), V: thể tích phản ứng (ml), k: hệ số pha loãng, v: thể tích enzyme phản ứng (ml), t: thời gian phản ứng (phút).

2.2.3. Ảnh hưởng các nguồn carbon đến mật số và hoạt tính enzyme cellulase

Ảnh hưởng thành phần carbon đến mật số và hoạt tính enzyme cellulase

Tiến hành trên 06 loại môi trường có thành phần cacbon khác nhau (CMC, manitol, ri đường, fructose, glucose, sucrose,). Môi trường được chọn ở thí nghiệm 2.2.2, cố định thành phần chất khoáng và nitơ, thay đổi nguồn carbon. Hút 1 ml dịch khuẩn tăng sinh vào 100 ml các nghiệm thức, ủ lắc 200 vòng/phút ở 37°C, 24 giờ. Sau đó xác định mật số và hoạt độ enzyme.

Ảnh hưởng nồng độ carbon đến mật số và hoạt tính enzyme cellulase

Tiến hành khảo sát 10 nồng độ carbon (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% và 5%). Hút 1 ml dịch khuẩn tăng sinh sau 24 giờ vào 100 ml các nghiệm thức, lắc 200 vòng/phút ở 37°C. Sau 24 giờ xác định mật số và hoạt độ enzyme.

2.2.4. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ đến mật số và hoạt tính enzyme cellulase

Ảnh hưởng thành phần nitơ đến mật số và hoạt tính enzyme cellulase

Thực hiện tương tự như 2.2.3 với 6 nghiệm thức thay đổi thành phần nitơ (cao thịt, cao nấm men, tryptone, (NH₄)₂SO₄, peptone và NH₄Cl).

Khảo sát ảnh hưởng nồng độ nitơ đến mật số và hoạt tính enzyme cellulase



Thực hiện tương tự như 2.2.3 với 10 nghiệm thức tương ứng các nồng độ nitơ (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% và 5%).

2.2.5. Ảnh hưởng của các nguồn chất khoáng đến mật số và hoạt tính enzyme cellulase

Thí nghiệm được thiết kế theo phương pháp Plackett-Burman, mỗi yếu tố được khảo sát với 2 mức độ: mức dưới (-) và mức trên (+) (Bảng 2). Các nguồn chất khoáng gồm FeSO_4 , MnSO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl và CaCl_2 . Thí nghiệm có 13 nghiệm thức theo thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman. Xử lý số liệu bằng phần mềm JMP.

Bảng 2 Các biến trong ma trận Plackett-Burman

Yếu tố (g/L)	Kí hiệu	Mức	
		Dưới (-) 1)	Trên (+) (+1)
FeSO_4	X1	0,05	2
MnSO_4	X2	0,01	0,1
K_2HPO_4	X3	0,05	5
MgSO_4	X4	0,2	4
NaCl	X5	1	15
CaCl_2	X6	0,05	3

2.2.6. Xác định môi trường tối ưu tác động đến mật số và hoạt tính cellulase

Dựa vào phương pháp đáp ứng bề mặt theo thiết kế CCD để chọn nồng độ tối ưu các thành phần môi trường.

Hút 1 ml dịch khuẩn tăng sinh sau 24 giờ trong TSB cho vào 100 ml môi trường cần khảo sát nồng độ tối ưu theo thiết kế CCD, lắc 200 vòng/phút, ở 37°C. Sau 24 giờ, xác định mật số và hoạt độ enzyme.

2.2.7. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Tiến hành với môi trường trước và sau khi tối ưu. Hút 1 ml dịch khuẩn tăng sinh sau 24 giờ trong TSB cho vào 100 ml các môi trường, lắc 200 vòng/phút, ở 37°C. Sau 24 giờ xác định mật số và hoạt độ enzyme.

2.2.8. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu CRD, 3 lần lặp lại trên một nghiệm thức. Số liệu được xử lý trên phần mềm SAS version 9.1, Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2019), JMP 10 (JMP Statistical Discovery, SAS).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đặc điểm hình thái đại thể, vi thể và khả năng phân giải cellulose của chủng B17

Chủng *B. amyloliquefaciens* B17 trên môi trường TSA có màu trắng đục, tròn (Hình 1A). Sau khi nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 1.000

lần, tế bào có hình que, hai đầu tròn, đứng đơn lẻ hoặc kết thành từng chuỗi ngắn, Gram dương (Hình 1B). Vòng phân giải cellulose của chủng B17 có đường kính là 26,66 mm (Hình 1C).

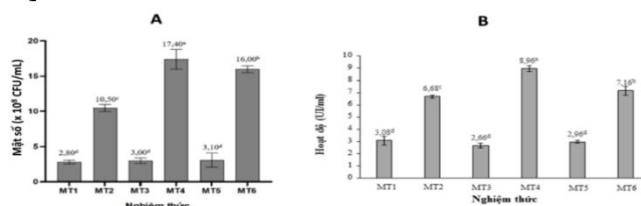


Hình 1 Hình ảnh đại thể (A), vi thể (B) và khả năng phân giải cellulose của chủng *B. amyloliquefaciens* B17 (C)

3.2. Ảnh hưởng của các môi trường nhân nuôi sinh khối dạng lỏng đến mật số và hoạt tính enzyme cellulase

Chủng *B. amyloliquefaciens* B17 có khả năng phát triển trong cả 6 loại môi trường với mật số dao động trong khoảng 2,8 – 17,4 CFU/ml (Hình 2A). Sự khác nhau giữa các nghiệm thức có ý nghĩa về mật thống kê với độ tin cậy 95%. MT4 có mật số $17,4 \times 10^8$ CFU/ml, đạt phân hạng cao nhất, tiếp theo lần lượt là MT6 (16×10^8 CFU/ml) và MT2 ($10,5 \times 10^8$ CFU/ml), các nghiệm thức còn lại MT1, MT3 và MT5 có giá trị mật số phân hạng thống kê thấp nhất với mật số lần lượt ($2,8 \times 10^8$ CFU/ml; 3×10^8 CFU/ml và $3,1 \times 10^8$ CFU/ml).

Hoạt độ cellulase cũng có sự khác biệt đáng kể (Hình 2B), với MT3 cho hoạt độ thấp nhất (2,66 UI/ml), và MT4 cho hoạt độ cao nhất (8,96 UI/ml). Như vậy, MT4 có mật số và hoạt độ cellulase cao nhất. Kết quả này khá tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đó về việc sử dụng rỉ đường làm nguồn dinh dưỡng cho sự phát triển của vi khuẩn [9] bởi có chứa sucrose, glucose và fructose là nguồn dinh dưỡng dễ hấp thu hơn so với CMC trong các môi trường còn lại. Ngoài ra, cũng ghi nhận sự tăng trưởng tương đối ở hai môi trường MT2 và MT4 bởi hai môi trường này có chứa tryptone và cao nấm men, đây cũng là nguồn dinh dưỡng quan trọng giúp vi sinh vật phát triển. Do sự tăng trưởng của vi khuẩn thường tỷ lệ thuận với việc sản xuất enzyme nên hoạt độ enzyme cellulase của chủng *B. amyloliquefaciens* B17 cũng cho thấy xu hướng tương tự [10].



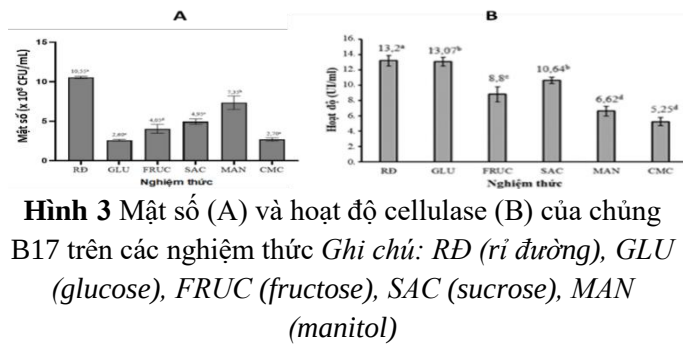
Hình 2 Mật số (A) và hoạt độ cellulase (B) của *B.*

amyloliquefaciens B17 ở các nghiệm thức

3.3. Ảnh hưởng của các nguồn carbon đến mật số và hoạt tính cellulase của chủng B17

3.3.1. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến mật số và hoạt tính cellulase

Hình 3A thể hiện chủng *B. amyloliquefaciens* B17 đều phát triển ở các nguồn carbon khảo sát. Trong đó, mật số ở môi trường có ri đường đạt mật số và phân hạng thống kê cao nhất ($1,1 \times 10^9$ CFU/ml), mật số ở nghiệm thức glucose và CMC có phân hạng thống kê thấp nhất (mật số lần lượt ở mức $2,6 \times 10^8$ CFU/ml và $2,7 \times 10^8$ CFU/ml). Trong 6 môi trường, ri đường có hoạt độ enzyme đạt cao nhất (13,2 UI/ml) (Hình 3B). Nghiệm thức có hoạt độ cellulase thấp nhất là manitol và CMC. Như vậy, trong môi trường ri đường, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* B17 đạt mật số và hoạt động enzyme cellulase cao nhất trong các nghiệm thức. Đây là nguồn nguyên liệu có chi phí thấp, thường được sử dụng trong quá trình lên men vi sinh vật.

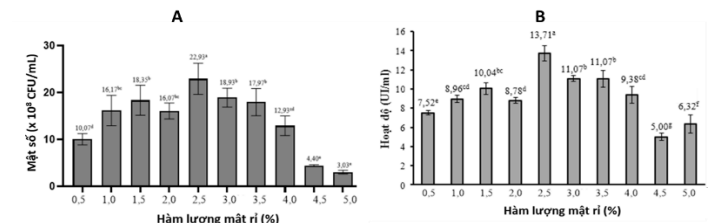


Hình 3 Mật số (A) và hoạt độ cellulase (B) của chủng B17 trên các nghiệm thức *Ghi chú: RD (ri đường), GLU (glucose), FRUC (fructose), SAC (sucrose), MAN (manitol)*

3.3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng carbon đến mật số và hoạt tính cellulase

Hình 4A cho thấy chủng *B. amyloliquefaciens* B17 có thể phát triển ở các nghiệm thức khảo sát. Cụ thể, mật số vi khuẩn tăng tỉ lệ thuận với nồng độ mật ri từ 0,5% đến 2,5%, sau đó mật số giảm dần khi tiếp tục tăng nồng độ mật ri. Khả năng sinh trưởng của chủng *B. amyloliquefaciens* B17 mạnh nhất ($2,3 \times 10^9$ CFU/ml) ở nồng độ ri đường 2,5% và đặc biệt giảm mạnh khi tăng mật ri lên 4,5% và 5%. Như vậy, mật ri là nguồn dinh dưỡng tốt khi sử dụng ở nồng độ thấp [10]. Nếu sử dụng nồng độ quá cao sẽ có kìm hãm sự phát triển của vi sinh vật. Thực tế, khi nồng độ mật ri tăng sẽ làm giảm nồng độ oxy hòa tan, từ đó làm giảm sự tăng trưởng của vi khuẩn [9]. Ngoài ra, trong mật ri còn chứa polyphenol có khả năng gây tổn thương vách và màng tế bào vi khuẩn, cũng như hợp chất phenolic có khả năng ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn [9]. Do sự tăng trưởng của vi khuẩn

thường tỷ lệ thuận với việc sản xuất enzyme nên hoạt độ enzyme cellulase của chủng *B. amyloliquefaciens* B17 cũng cho thấy xu hướng tương tự (Hình 4B) [10]. Cụ thể, hoạt độ đạt thấp nhất khi nhân nuôi ở điều kiện mật ri 4,5% (5 UI/ml) và có giá trị đạt phân hạng thống kê cao nhất ở nồng độ 2,5% (hoạt độ đạt 13,71 UI/ml). Như vậy, khi bổ sung ri đường 2,5% chủng B17 cho mật số và hoạt độ enzyme cao nhất.

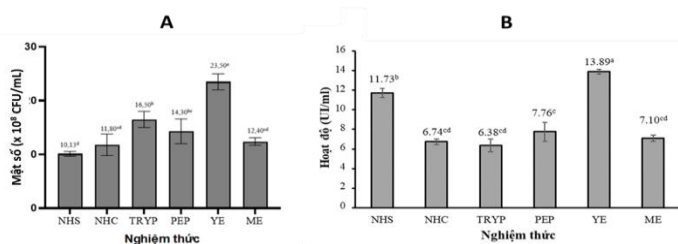


Hình 4 Mật số (A) và hoạt độ cellulase (B) của chủng *B. amyloliquefaciens* B17 ở các hàm lượng mật ri khác nhau

3.4. Ảnh hưởng của thành phần nitơ đến mật số và hoạt tính cellulase của chủng B17

3.4.1. Ảnh hưởng của thành phần nitơ đến mật số và hoạt tính cellulase

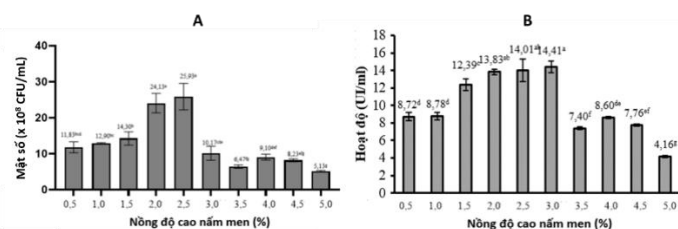
Kết quả ở Hình 5A cho thấy, chủng B17 đều có mật số đạt trên 10^9 CFU/ml ở các nghiệm thức. Trong đó, khi phát triển trong môi trường chứa cao nấm men, vi khuẩn có giá trị mật số phân hạng thống kê cao nhất ($23,5 \times 10^9$ CFU/ml). Tương tự, Hình 5B cho thấy, hoạt độ enzyme các nghiệm thức có giá trị từ 6,38 – 13,89 UI/ml. Trong số đó, nghiệm thức sử dụng cao nấm men cho kết quả cao nhất về mặt thống kê. Các dạng hợp chất nitơ khác nhau ảnh hưởng không giống nhau đến quá trình tổng hợp enzyme cellulase. Cụ thể $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ được xác định là nguồn cung cấp nitơ tối ưu cho quá trình sinh enzyme cellulase của các vi khuẩn phân lập ở đất [11]. Trong khi đó, Abou-Taleb và cộng sự (2009) khi tối ưu hóa môi trường sản xuất enzyme cellulase cho hai chủng *B. alcalophilus* S39 và *B. amyloliquefaciens* đã chọn cao nấm men làm nguồn nitơ thích hợp [12]. Do đó, từng chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp cellulase khác nhau tùy thuộc vào loại nguồn nitơ được cung cấp trong môi trường nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, chủng *B. amyloliquefaciens* B17 thể hiện khả năng tăng sinh khối và sản xuất enzyme cellulase mạnh nhất khi được nuôi trong môi trường chứa cao nấm men.



Hình 5 Mật số (A) và hoạt độ cellulase (B) của *B. amyloliquefaciens* B17 ở các nghiệm thức. Ghi chú: NHS ((NH₄)₂SO₄), NHC (NH₄Cl), TRYP (tryptone), PEP (peptone), YE (cao nấm men), ME (cao thịt)

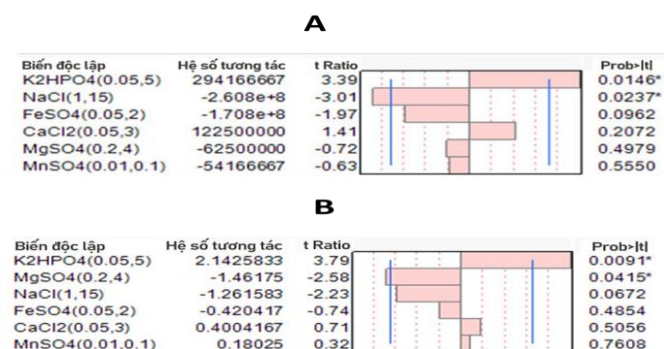
3.4.2. Ảnh hưởng của hàm lượng nitơ đến mật số và hoạt tính cellulase

Hình 6A cho thấy nghiệm thức với nồng độ 2% và 2,5% mật số có phân hạng thống kê cao nhất (tương ứng là $2,4 \times 10^9$ CFU/ml và $2,6 \times 10^9$ CFU/ml). Ngược lại, môi trường chứa 5% cao nấm men, mật số khuẩn lạc có phân hạng thống kê thấp nhất ($5,1 \times 10^8$ CFU/ml). Điều này cho thấy, việc bổ sung cao nấm men ở mức 2% và 2,5% phù hợp nhất để thúc đẩy sự phát triển của chủng *B. amyloliquefaciens* B17 trong điều kiện nuôi cấy. Thực tế cho thấy ở nồng độ cao nấm men tăng sẽ gây ức chế sự tăng trưởng và làm giảm hoạt tính enzyme của vi khuẩn [13]. Tuy nhiên, mỗi vi khuẩn sẽ có khoảng nồng độ cao nấm men tối ưu khác nhau để phát triển. Do sự tăng trưởng của vi khuẩn thường tỷ lệ thuận với việc sản xuất enzyme nên hoạt độ enzyme cellulase của chủng *B. amyloliquefaciens* B17 cũng cho thấy xu hướng tương tự (Hình 6B) [10], ngoại trừ nồng độ 3% cao nấm men, mặc dù có sự tăng trưởng giảm rõ rệt nhưng hoạt tính cellulase ghi nhận được ở mức cao. Nhìn chung các nghiệm thức 2%, 2,5% và 3% có hoạt độ enzyme đạt phân hạng cao nhất (tương ứng ở mức 13,83; 14,01 và 14,41 UI/ml). Ngược lại, nghiệm thức sử dụng 5% cho hoạt độ thấp nhất. Như vậy, với nồng độ ở mức 2%, 2,5% là thích hợp cho quá trình phát triển và sinh tổng hợp cellulase của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B17. Vì vậy, để tiết kiệm chi phí, nồng độ 2% được lựa chọn để tiến hành nhân nuôi chủng vi khuẩn này trong các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 6 Mật số (A) và hoạt độ enzyme cellulase (B) của chủng *B. amyloliquefaciens* B17 ở các nghiệm thức

3.5. Sàng lọc các yếu tố khoáng ảnh hưởng đến mật số và hoạt tính cellulase theo thiết kế Plackett-Burman
Kết quả Hình 7A cho thấy, hai yếu tố ảnh hưởng chính đến mật số của vi khuẩn là muối K₂HPO₄ và NaCl (Hình 7A). Nồng độ K₂HPO₄ tỉ lệ thuận với mật số, trong khi đó NaCl tỉ lệ nghịch. Tương tự, ở Hình 7B hai yếu tố khoáng K₂HPO₄, MgSO₄ có tác động có ý nghĩa đến hoạt độ cellulase của vi khuẩn ($p < 0,05$). Trong đó, K₂HPO₄ tác động tỉ lệ thuận, còn MgSO₄ tỉ lệ nghịch với hoạt độ cellulase.



Hình 7 Ảnh hưởng của các loại khoáng lên mật số (A) và hoạt độ cellulase (B) của chủng *B. amyloliquefaciens* B17

Như vậy, MgSO₄, K₂HPO₄ và NaCl có tác động có đáng kể đến mật số và hoạt độ enzyme cellulase của *B. amyloliquefaciens* B17. Mặc dù, NaCl và MgSO₄ có tác động âm đến sự tăng trưởng và hoạt độ enzyme nhưng đây là nguồn cung cấp các ion khoáng cần thiết cho quá trình trao đổi chất ở vi khuẩn và được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để duy trì cân bằng áp suất thẩm thấu [14]. Do vậy, cả 3 yếu tố khoáng này đều được chọn trong thí nghiệm tối ưu hóa môi trường bằng phương pháp Central Composite Design (CCD).

3.6. Tối ưu hóa các thành phần ảnh hưởng đến mật số và hoạt tính enzyme cellulase bằng phương pháp CCD

Từ các kết quả trên cho thấy 5 thành phần tác động chính đến mật số và hoạt tính cellulase của chủng *B. amyloliquefaciens* B17, là rỉ đường, cao nấm men, K₂HPO₄, NaCl và MgSO₄ (Bảng 3). Theo phương pháp CCD có tổng số 28 tổ hợp nghiệm thức được đưa ra.

Bảng 3 Nồng độ các yếu tố trong CCD

Yếu tố (g/L)	Kí hiệu	Mức		
		Dưới	Trung bình	Trên
Rỉ đường	X1	5	22,5	40

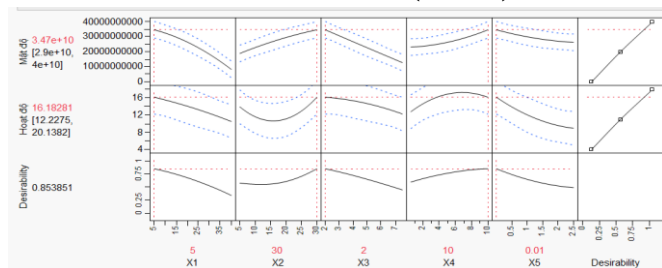
Cao nấm men	X2	5	17,5	30
K ₂ HPO ₄	X3	2	4,75	7,5
NaCl	X4	0,5	5,25	10
MgSO ₄	X5	0,01	1,255	2,5

3.6.1. Tối ưu các thành phần môi trường ảnh hưởng đến mật số vi khuẩn B17

Trong các nghiệm thức, mật số vi khuẩn đạt cao nhất ($3,57 \times 10^{10}$ CFU/ml) ở thành phần môi trường: rỉ đường 5 gam/lít; cao nấm men 30 gam/lít; K₂HPO₄ 2g/l; NaCl 5,25 gam/lít, MgSO₄ 0,01 gam/lít, và thấp nhất (5×10^8 CFU/ml) với thành phần: rỉ đường 40 gam/lít; cao nấm men 30 gam/lít; K₂HPO₄ 7,5 gam/lít; NaCl 10 gam/lít, MgSO₄ 0,01 gam/lít.

3.6.2. Tối ưu môi trường ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme cellulase

Cũng theo mô hình này, hoạt độ cellulase cao nhất 16,53 UI/ml ở thành phần môi trường: rỉ đường 5 gam/lít; cao nấm men 30 gam/lít; K₂HPO₄ 2 gam/lít; NaCl 5,25 gam/lít, MgSO₄ 0,01 gam/lít, và thấp nhất 4,52 UI/ml ở môi trường có rỉ đường 22,5 gam/lít; cao nấm men 17,5 gam/lít; K₂HPO₄ 2 gam/lít; NaCl 5,25 gam/lít và MgSO₄ 1,255 gam/lít. Như vậy, khi thành phần môi trường chứa: rỉ đường 5 gam/lít; cao nấm men 30 gam/lít; K₂HPO₄ 2 gam/lít; NaCl 5,25 gam/lít, MgSO₄ 0,01 gam/lít sẽ cho mật số khuẩn lạc và hoạt độ enzyme đều đạt cao nhất. Mô hình dự đoán với công thức môi trường này, chủng vi khuẩn B17 sẽ đạt hoạt độ cao nhất với 16,18UI/ml và mật số khuẩn lạc là $3,5 \times 10^{10}$ CFU/ml (Hình 8).



Hình 8 Giá trị tối ưu các thành phần nuôi cấy chủng *B. amyloliquefaciens* B17. Ghi chú: X1 (rỉ đường), X2 (cao nấm men), X3 (K₂HPO₄), X4 (NaCl), X5 (MgSO₄)

Như vậy, nồng độ các yếu tố dinh dưỡng như nguồn carbon, nitơ và khoáng chất có tác động tích cực đến mật số và hoạt độ cellulase của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B17. Kết quả này củng cố thêm khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Bacillus*. Bên cạnh đó, ảnh hưởng các chất khoáng NaCl, K₂HPO₄ và MgSO₄ đến hoạt tính cellulase

cũng được ghi nhận. NaCl ở nồng độ thích hợp có thể làm tăng tính thẩm thấu, hỗ trợ quá trình bài tiết enzyme ra môi trường [15].

3.7. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Theo mô hình dự đoán, môi trường tối ưu cho chủng *B. amyloliquefaciens* B17 là NT7 (Bảng 4) có hoạt độ enzyme đạt 16,18 UI/ml và mật số $3,5 \times 10^{10}$ CFU/ml. Sau khi thực hiện kiểm tra lại thực tế tại các giá trị tối ưu trên, các giá trị về mật số và hoạt độ cellulase ghi nhận thực tế khá tương đồng với kết quả dự đoán. Cụ thể, chủng *B. amyloliquefaciens* B17 có hoạt độ cellulase là 16,41 UI/ml (xấp xỉ 1,01 lần so với dự đoán) và đạt mật số là $3,3 \times 10^{10}$ CFU/ml (xấp xỉ 0,94 so với dự đoán). Ngoài ra, môi trường sau khi tối ưu tốt hơn 1,62 lần về hoạt độ và 20,44 lần về mật số (Bảng 4) so với môi trường ban đầu.

Bảng 4 Mật số và hoạt độ cellulase của vi khuẩn B17 thực tế

Nghiệm thức	Môi trường sau tối ưu	Môi trường ban đầu
Mật số ($\times 10^9$ CFU/ml)	33,11 $\pm$ 3,95	1,62 $\pm$ 0,72
Hoạt độ (UI/ml)	16,41 $\pm$ 0,37	10,12 $\pm$ 0,42

4. Kết luận

Thí nghiệm đơn yếu tố cho thấy, *B. amyloliquefaciens* B17 có khả năng phát triển và tổng hợp cellulase tốt trong môi trường bổ sung rỉ đường và cao nấm men. Sàng lọc theo thiết kế Plackett-Burman cho thấy các chất khoáng NaCl, MgSO₄ và K₂HPO₄ có ảnh hưởng chính đến các chỉ tiêu này. Thông qua phương pháp CCD đã xác định được môi trường chứa: rỉ đường 5 gam/lít; cao nấm men 30 gam/lít; K₂HPO₄ 2 gam/lít; NaCl 5,25 gam/lít, MgSO₄ 0,01 gam/lít, với dự đoán hoạt độ enzyme đạt 16,18 UI/ml, mật số $3,5 \times 10^{10}$ CFU/ml và thực tế thí nghiệm đạt hoạt độ enzyme 16,41 UI/ml, mật số là $3,3 \times 10^{10}$ CFU/ml. Tuy nhiên, nghiên cứu này mới dừng lại ở quy mô nhỏ. Do vậy, cần triển khai trên mô hình nuôi cấy lớn hơn trong bồn lên men để có những đánh giá chính xác và đầy đủ hơn về tính ứng dụng của môi trường sau tối ưu.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. HCM.

Tài liệu tham khảo

1. Y.H.P Zhang, L.R. Lynd. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 797.
2. A. Idris, A. Bukhari. (2012). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 2563.
3. J. Li, H. Xie, W. Sun, W. Qiao, Y. Yang. (2023). Biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* HSE-12 against peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 10601714.
4. A. Fouda, K. Alshallash, H. Atta, M. El-Gamal, M. Bakry, M. Alghonaim, S. Salem. (2023). A thermo-tolerant cellulase enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M7, an insight into synthesis, optimization, characterization, and bio-polishing activity. *Green Processing and Synthesis*, 12, 20230127.
5. M. Shyaula, S. Regmi, D. Khadka, R.C. Poudel, A. Dhakal, D. Koirala, J. Sijapati, A. Singh, J. Maharjan. (2023). Characterization of Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* PANG L Isolated from the Himalayan Soil. *International journal of microbiology*, 2023, 3615757.
6. Bùi Đoàn Phương Linh, Trần Thị Thủy Tiên, Nguyễn Ngọc Hà, Huỳnh Thanh Hùng. (2018). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân vô cơ khó tan từ đất tại huyện Xuân Lộc, tỉnh Đồng Nai. *Tạp chí Khoa học - Đại học Đồng Nai*, 2018, 2354.
7. Trần Kim Thoa, Nguyễn Thị Thu Nguyên, Lương Hải Trân, Lê Hoàng Khiêm, Trương Văn Xạ. (2024). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ ruột giun đất. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 2024, 22, 1069.
8. Lê Thị Thu Thảo. (2008). *Phân lập vi khuẩn phân hủy rom rạ*. Luận văn Đại học, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.
9. K.C. Tyas Sofyan, J. Anjaini, T.B. Pramono, L. Setiyaningsih. (2025). Effect of different molasses doses in bacterial growth (commercial probiotics). *Journal of Aquaculture Science*, 10, 9.
10. P. Shirazian, S. Asad, M.A. Amoozegar. (2016). The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-asparaginase and L-glutaminase. *EXCLI journal*, 15, 268.
11. S. Sethi, A. Datta, B.L. Gupta, S. Gupta. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN Biotechnology*, 2013, 985685.
12. K. Abou-Taleb, W.A. Mashhoor, S. Nasr. (2009). Nutritional and environmental factors affecting cellulase production by two strains of cellulolytic Bacilli. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3, 3190.
13. Cao Xuan Bach, Nguyen Bao Chau, La Thi My Hanh, Do Thi Yen, Nguyen Van Tuan, Dinh Thi My Hang, Nguyen Thanh Thuy. (2024). Effects of yeast extract and Ca^{2+} , Fe^{3+} ions on the growth and sporulation of *Bacillus coagulans*. Hội Nghị Khoa Học Toàn Quốc Về Công Nghệ Sinh Học.
14. S. Hu, Y. Li, B. Wang, L. Yin, X. Jia. (2022). Effects of NaCl Concentration on the behavior of *Vibrio brasiliensis* and Transcriptome Analysis. *Foods*, 11, 840.
15. Y. Zhang, Y. Zeng, Y. Wu. (2013). Effect of salt concentration on cellulase activity of *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 312.

Investigating the effects of medium composition on the growth and cellulase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* B17

Tran Thuy Trang* 1, Nguyen Nhu Hoan Hao**, Tran Duc Long***, Tran Thi Phan*, Nguyen Thi Anh Nguyet*, Dinh Anh Hoa*, Nguyen Thi Thuy Duong*, Ha Thi Loan*, Le Thi Mai Cham*

*Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

**Medochemie Co. Ltd

***Hasan Dermapharm Co. Ltd



Abstract *Bacillus amyloliquefaciens* has played an important role in the development of circular agriculture due to its effective hydrolysis of cellulose, which contributes to converting agricultural by-products into plant fertilizers. The bacterium not only synthesizes extracellular cellulase with high activity but also strongly grows and can be easily cultured on artificial media. The *B. amyloliquefaciens* B17 strain was isolated and selected thanks to its high synthesis of cellulase. The medium composition was optimized for the isolate B17 according to the response surface methodology by Central Composite Design (CCD) methods. The results showed that the strain B17 grew very well, reach at a density of 3.3×10^{10} (CFU/ml) and produced the highly active cellulase at 16.41 UI/ml on the medium made up of 5 g/l molasses, 30 g/l yeast extract, 2 g/l K_2HPO_4 , 10 g/l NaCl, and 0.01 g/l $MgSO_4$.

Keywords *Bacillus amyloliquefaciens* B17, cellulase, molasses, yeast extract.