



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.061

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Acetobacter* SP. LÊN MEN TẠO MÀNG CELLULOSE TỪ NƯỚC MÍA

Nguyễn Văn Thành<sup>1\*</sup>, Nguyễn Phú Thành<sup>2</sup> và Nguyễn Ngọc Thạnh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Học viên ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Văn Thành (email: nvthanh@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 14/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

### Title:

Isolation and selection of bacterial cellulose producing *Acetobacter* sp. from sugarcane juice

### Từ khóa:

*Acetobacter xylinum*, màng cellulose, nước mía, vi khuẩn tạo màng cellulose

### Keywords:

*Acetobacter xylinum*, cellulose producing bacteria, bacterial cellulose, sugarcane juice

### ABSTRACT

Nowadays, bacterial cellulose membranes have been used extensively in various technological fields, especially in the medical field such as temporary skin, burns treatment, mask for skin care for people. This study was carried out with the aims of isolating and selecting *Acetobacter* sp. strain which has the ability to produce bacterial cellulose (BC) from sugarcane juice. Twenty-one strains of *Acetobacter* spp. were isolated. Among them, BK3 strain showed the best BC productivity with 134.48 g/200mL (fresh weight) and 1.4 g/200mL (dry weight) after 7 days of fermentation. BK3 strain was used in fermentation with initial mixture of sugarcane juice including Brix 8, pH 5.2 and  $10^7$  cells/mL for 7 days, the biomass of fresh BC reached to 140.26 g/200mL and dried BC was 1.635 g/200 mL. Furthermore, experimental results showed that after 7 days of fermentation at Brix 8.5, pH 5.1 and  $10^6$  cells/mL, the optimal BC weight was obtained 715 g/1000 mL (fresh) and 9.14 g/1000mL (dried). The identification by sequencing of 16S ribosomal RNA gene revealed that BK3 strain had 99% identity to *Acetobacter xylinum*. The study also revealed that the BK3 strain could be used for production of bacterial cellulose which is wisely applied in foods, pharmaceuticals, and cosmetics.

### TÓM TẮT

Ngày nay, màng cellulose vi khuẩn đã được ứng dụng rất nhiều trong các lĩnh vực công nghệ khác nhau, đặc biệt trong lĩnh vực y học như: làm da tạm thời, điều trị bỏng, làm mặt nạ dưỡng da cho người. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn được dòng vi khuẩn *Acetobacter* sp. có khả năng lên men tạo màng cellulose từ nước mía. Kết quả đã phân lập được 21 dòng vi khuẩn *Acetobacter* spp., trong đó, dòng BK3 cho khối lượng cao nhất về màng cellulose tươi (134,48 g/200mL) và màng cellulose khô (1,4 g/200mL) sau bảy ngày lên men. Sử dụng dòng vi khuẩn BK3 lên men với môi trường lên men phối chế ban đầu với nước mía có độ Brix là 8, pH 5,2 và mật số chủng giống vi khuẩn là  $10^7$  tế bào/mL lên men 7 ngày cho kết quả khối lượng màng cellulose tươi là 140,26 g/200mL và màng cellulose khô là 1,635 g/200mL. Hơn nữa, kết quả thí nghiệm cho thấy lên men 7 ngày với các thông số tối ưu (độ Brix 8,5, pH 5,1 và mật số chủng giống vi khuẩn là  $10^6$  tế bào/mL) cho kết quả khối lượng màng cellulose đạt tối ưu 715 g/1000mL (tươi) và 9,14 g/1000mL (khô). Bằng phương pháp giải trình tự, kết quả định danh dòng BK3 đồng hình 99% với vi khuẩn *Acetobacter xylinum*. Kết quả nghiên cứu cho thấy dòng BK3 có thể ứng dụng để lên men sản xuất màng cellulose có thể sử dụng trong thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm.

Trích dẫn: Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Phú Thành và Nguyễn Ngọc Thạnh, 2019. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Acetobacter* sp. lên men tạo màng cellulose từ nước mía. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 193-202.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi sinh vật ngày càng có vai trò rất quan trọng trong nhiều hoạt động sống của con người và môi trường. Tùy vào từng đặc điểm, chức năng và mục đích sử dụng của mỗi loài vi sinh vật mà chúng được con người ứng dụng vào các lĩnh vực khác nhau trong đời sống như: y tế, thực phẩm, mỹ phẩm, bảo vệ môi trường... Một trong những sản phẩm được tạo ra từ vi khuẩn vẫn đang được nghiên cứu và phát triển đó là màng sinh học cellulose vi khuẩn (bacterial cellulose - BC).

Cellulose là thành phần chính cấu tạo nên thành tế bào thực vật, là một trong những polymer hữu cơ phổ biến và là nguồn vật liệu có rất nhiều ứng dụng nhờ đặc tính dày, bền, dễ phân hủy, không ô nhiễm môi trường... Chính vì vậy, cellulose đóng vai trò rất quan trọng trong đời sống hằng ngày. Hơn nữa, cellulose vi khuẩn có bản chất hóa học tương tự cellulose thực vật và nhờ sản xuất dễ dàng, có đặc tính cơ học, độ tinh khiết cao, cấu trúc siêu mịn, xốp, chống nước tốt, tính ổn định dưới hóa chất và nhiệt độ cao nên cellulose vi khuẩn là vật liệu được chọn cho nhiều ứng dụng (Watanabe *et al.*, 1998). Một số nghiên cứu về cellulose từ vi khuẩn đã được ứng dụng ở các lĩnh vực khác nhau trong đời sống hằng ngày, ví dụ như ở lĩnh vực y tế thì BC làm da nhân tạo để hỗ trợ điều trị bỏng, tạo mạch máu nhân tạo trong điều trị bệnh tim mạch (Klemm *et al.*, 2001), lĩnh vực thực phẩm BC được ứng dụng trong sản xuất thạch dừa (Alaban, 1967), màng bao thực phẩm, màng cố định trong sản xuất rượu vang (Yoshinaga *et al.*, 1997), lĩnh vực mỹ phẩm như mặt nạ dưỡng da, chất làm nền cho móng nhân tạo (Sattler and Fiedler, 1990), lĩnh vực môi trường như miếng xốp làm sạch các vết dầu tràn và chất độc hại, màng siêu lọc làm sạch nguồn nước (El-Saied *et al.*, 2004).

Hiện nay, nước dừa khô là nguồn nguyên liệu chính dùng để sản xuất cellulose vi khuẩn ở Việt Nam và hầu hết các nước trên thế giới. Tuy nhiên, nước dừa ngày càng khan hiếm do diện tích trồng dừa ngày càng thu hẹp vì lợi nhuận từ dừa thấp. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm tìm nguồn nguyên liệu mới thay thế góp phần giải quyết vấn đề khan hiếm nguồn nguyên liệu nước dừa, mặt khác có thể làm tăng khả năng tổng hợp màng cellulose vi khuẩn từ một nguồn nguyên liệu mới là nước mía.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Nguyên vật liệu và hóa chất

Mẫu mía được thu tại phường Trung Kiên, quận Thốt Nốt, Thành phố Cần Thơ. Mía phải đạt độ chín tương đồng, không bị nhiễm sâu bệnh (giống mía

ROC 16). Sáu mẫu dịch giống thu từ 6 cơ sở sản xuất Thạch dừa ở tỉnh Bến Tre, 1 mẫu giấm dừa thu tại tỉnh Vĩnh Long, 1 mẫu giấm chuối và 2 mẫu mía thu ở thành phố Cần Thơ.

Dòng vi khuẩn *Acetobacter* sp. làm đối chứng từ bộ giống của Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.

Môi trường phân lập vi khuẩn YPGD (yeast extract-pepton-glycerol-Dglucose) agar: yeast extract (5 g/L), pepton (5 g/L), glycerol (5 g/L), D-glucose (5 g/L), agar (2 g/L). Môi trường nước mía: nước mía (10%), pepton (0,93%), D-glucose (3,65%), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2%), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,8%). Bộ nhuộm Gram (cồn 70%, crystal violet, fushin, iod, nước cất vô trùng), acid acetic, CaCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bromocresol green 0,01%, lugon, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60%, cồn tuyệt đối,...

### 2.2 Phương pháp

2.2.1 Phân lập và định danh sơ bộ vi khuẩn *Acetobacter* spp. từ dịch giống thạch dừa, từ giấm và từ dịch nước mía

Dịch giống thạch dừa thu tại 6 cơ sở nuôi thạch dừa khác nhau tại Bến Tre và 2 mẫu giấm ăn. Do mẫu là dịch giống nên có mật độ vi khuẩn *Acetobacter* sp. cao nên tiến hành cấy trải, không cần tăng sinh. Dịch nước mía tiến hành nuôi tăng sinh bằng môi trường YPGD trong 24 giờ. Pha loãng dịch lên men thạch dừa (10, 100, 1.000, 10.000, 100.000 lần), pha loãng dịch giấm ăn, dịch nước mía (10, 100, 100 lần) và trải đều dịch lên men đã pha loãng lên đĩa petri có sẵn môi trường YPGD agar đã được khử trùng ở 121°C, trong 20 phút. Quá trình cấy trải để phân lập vi khuẩn acetic sử dụng các dụng cụ đã được khử trùng và tiến hành trong tủ cấy vô trùng.

Sau khi cấy xong, ủ mẫu trong tủ ủ vi sinh ở 37°C trong thời gian 24 – 48 giờ. Quan sát sự phát triển của vi sinh vật thể hiện qua các khuẩn lạc. Sau khi quan sát thấy các khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch thì tiến hành cấy chuyển. Dựa vào đặc điểm khác nhau của các khuẩn lạc (hình dạng, màu sắc, kích thước của khuẩn lạc) chọn ra những khuẩn lạc trắng đục, đơn lẻ, khác nhau cấy chuyển vào từng đĩa môi trường khác nhau, ghi ký hiệu (mẫu, nồng độ pha loãng, ngày, tháng).

Tiếp tục cấy chuyển 2 – 3 lần, sau đó tiến hành kiểm tra độ rỗng bằng cách quan sát dưới kính hiển vi. Dòng vi khuẩn acetic được đánh giá rỗng khi hình dạng các tế bào quan sát được dưới kính hiển vi đồng nhất nhau. Khi các dòng vi khuẩn acetic đã rỗng tiến hành trữ giống trên các ống thạch nghiêng ở 4°C để giữ nguyên các đặc tính ban đầu của giống.

Sau khi đã phân lập được những dòng thuần tiến hành nhuộm Gram, thử catalase, nhờ lugon và H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% và cấy lên môi trường YPGD có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub> ở nhiệt độ 37°C.

Những dòng vi khuẩn có đặc điểm như sau được xem xét là thuộc vi khuẩn acid acetic: Gram âm, catalase dương tính, tạo màng cellulose, tạo vòng halo sáng xung quanh khuẩn lạc trên môi trường YPGD có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub>. Những dòng vi khuẩn được xác định là vi khuẩn acid acetic sẽ được chọn và cấy thử khả năng oxy hóa lactate thành CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O trên môi trường YPGD bổ sung bromocresol green 0,01% để phân biệt những dòng vi khuẩn này thuộc giống *Acetobacter* hay *Gluconobacter*. Nếu thuộc giống *Acetobacter* sẽ chuyển màu môi trường từ xanh sang vàng và ngược lại.

### 2.2.2 Tuyển chọn dòng vi khuẩn có hoạt lực tạo màng cellulose cao nhất từ các dòng vi khuẩn *Acetobacter spp.* đã phân lập

Các dòng vi khuẩn *Acetobacter spp.* phân lập được và dòng vi khuẩn *Acetobacter sp.* đối chứng của phòng thí nghiệm được nuôi tăng sinh trên môi trường YPGD không có agar trong 48 giờ sau đó tiếp tục tăng sinh trên môi trường nước mía (nước mía 10%, glucose 3,65%, pepton 0,93%, SA 0,8%, DAP 0,2%, nước cất vừa đủ 100 mL) sau 5 ngày ở nhiệt độ phòng và tiến hành đếm mật số vi khuẩn bằng buồng đếm hồng cầu.

Cho vào khay nhựa (17,3 x 13 x 7,3) cm 200 mL môi trường nước mía đã điều chỉnh về pH 5,2 và độ Brix 8, khử trùng bằng nồi khử trùng nhiệt ướt ở 115°C trong 10 phút để nguội, chủng các dòng vi khuẩn (A1, A2...A22) đã tăng sinh vào khay cùng mật số 10<sup>6</sup> tế bào/mL, ủ trong 144 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiến hành cân khối lượng và đo độ dày của màng cellulose.

Dòng vi khuẩn *Acetobacter sp.* lên men tạo ra khối lượng màng cellulose cao nhất ở cùng thời điểm lên men thì biểu hiện khả năng lên men mạnh nhất.

### 2.2.3 Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình lên men tạo màng cellulose từ dòng vi khuẩn *Acetobacter sp.* phân lập được

Dòng vi khuẩn đã được tuyển chọn từ thí nghiệm trên nuôi tăng sinh trên môi trường YPGD không có agar trong 48 giờ sau đó tiếp tục tăng sinh trên môi trường nước mía (nước mía 10%, đường glucose 3,65%, pepton 0,93%, SA 0,8%, DAP 0,2%, nước cất vừa đủ 100 mL) 5 ngày ở nhiệt độ phòng và xác định mật số vi khuẩn bằng buồng đếm hồng cầu.

Cho vào khay nhựa (17,3 x 13 x 7,3) cm 200 mL môi trường nước mía đã điều chỉnh về pH 5,2 và độ Brix 8, khử trùng bằng nồi khử trùng nhiệt ướt ở

115°C trong 10 phút để nguội, chủng dòng vi khuẩn A đã tăng sinh vào các khay với cùng mật số 10<sup>6</sup> tế bào/mL, ủ ở nhiệt độ phòng với thời gian kết thúc quá trình lên men lần lượt là (B1, B2,..., B10) tương ứng với 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ngày. Xác định khối lượng và độ dày của màng cellulose ở từng thời điểm kết thúc quá trình lên men từ đó chọn ra thời gian B lên men thích hợp nhất.

### 2.2.4 Ảnh hưởng của các nhân tố (độ Brix, pH và mật số vi khuẩn ban đầu) đến quá trình lên men tạo màng cellulose từ môi trường nước mía

Môi trường nước mía lên men được điều chỉnh độ Brix về các giá trị 6, 8 và 10 bằng đường sucrose. Các mức pH 4,7; 5,2 và 5,7 bằng dung dịch acid acetic, sau đó khử trùng môi trường lên men ở 115°C trong 10 phút. Chủng vi khuẩn được tuyển chọn vào các khay nhựa với các mức mật số 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>7</sup> tế bào/mL.

Chủng vi khuẩn A được nuôi tăng sinh trên môi trường YPGD trong 48 giờ sau đó tiếp tục tăng sinh trên môi trường nước mía (nước mía 10%, đường glucose 3,65%, pepton 0,93%, SA 0,8%, DAP 0,2%, nước cất vừa đủ 100 mL) 5 ngày và đếm mật số bằng buồng đếm hồng cầu.

Khi quá trình lên men kết thúc tiến hành thu nhận khối lượng tươi và khô, đo độ dày màng cellulose, đo độ Brix, pH sau lên men rồi phân tích các chỉ tiêu, chọn nghiệm thức phù hợp nhất về độ Brix, pH và mật số vi khuẩn *Acetobacter sp.* để lên men tạo màng cellulose từ nước mía.

### 2.2.5 Thiết lập quy trình lên men tạo màng cellulose từ môi trường nước mía qua các thông số tối ưu tính toán được dựa theo phương trình hồi quy

Pha khoảng 4 lít môi trường lên men nước mía (nước mía 10%, đường sucrose 3,65%, pepton 0,93%, SA 0,8%, DAP 0,2%, nước cất vừa đủ 100 mL) và điều chỉnh độ Brix=8,5, pH=5,1 khử trùng bằng nồi khử trùng nhiệt ướt ở 115°C trong 10 phút sau đó để nguội cho vào 3 khay nhựa, mỗi khay nhựa có kích thước (17,3 x 13 x 7,3) cm 198 mL môi trường nước mía và 3 khay nhựa lớn, mỗi khay nhựa có kích thước (25 x 16 x 9) cm 990 mL môi trường nước mía.

Chủng dòng vi khuẩn BK3 được tăng sinh trên môi trường YPGD trong 48 giờ sau đó tiếp tục tăng sinh trên môi trường nước mía (nước mía 10%, đường glucose 3,65%, pepton 0,93%, SA 0,8%, DAP 0,2%, nước cất vừa đủ 100 mL) 5 ngày vào mỗi khay với mật số vi khuẩn là 10<sup>6</sup> tế bào/mL ở nhiệt độ phòng sau 7 ngày và tiến hành thu sản phẩm màng cellulose.

2.2.6 Định danh dòng vi khuẩn *Acetobacter* sp. tuyển chọn được bằng phương pháp giải trình tự

Sau khi lên men tạo màng cellulose chọn được dòng vi khuẩn *Acetobacter* sp. tốt nhất với các thông số tối ưu để giải trình tự gen 16S rRNA, sau đó so sánh đối chiếu trên ngân hàng gene (NCBI) từ đó xác định đến cấp loài dòng vi khuẩn đã phân lập.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Kết quả phân lập và định danh sơ bộ vi khuẩn *Acetobacter* spp. từ dịch lên men tạo màng cellulose

Tổng cộng có 21 dòng vi khuẩn đã được tách rông trên môi trường YPGD từ 6 mẫu dịch giống tại 6 cơ sở sản xuất thạch dừa ở tỉnh Bến tre, 2 mẫu

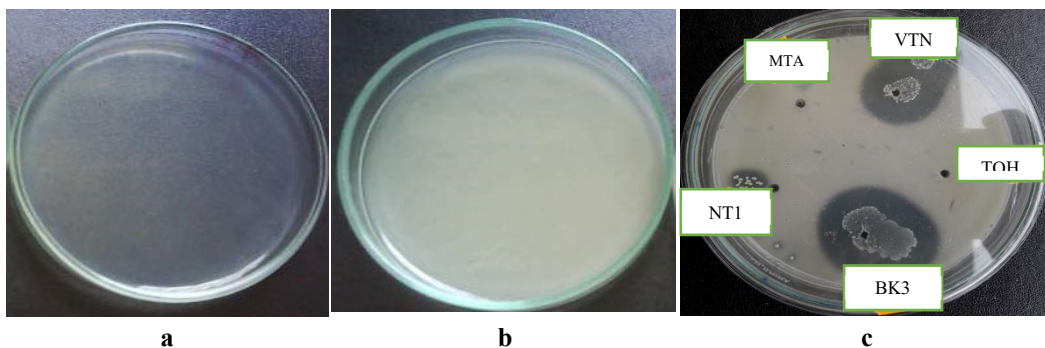
giảm ăn và 2 mẫu mía thu tại Cần Thơ và Vĩnh Long.

#### Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn

Khuẩn lạc các dòng vi khuẩn phân lập được đều hình tròn, nhô và màu trắng sữa. Đồng thời, khuẩn lạc phân lập được đều nằm trên đường cấy chuyên và không lẫn với những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc lạ. Tế bào các dòng vi khuẩn phân lập được khi quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính E100 đều có dạng hình que ngắn, kết đôi, di chuyển chậm.

#### Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa

Thứ khả năng tạo vòng halo sáng xung quanh khuẩn lạc trên môi trường YPGD có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub> (Hình 1).



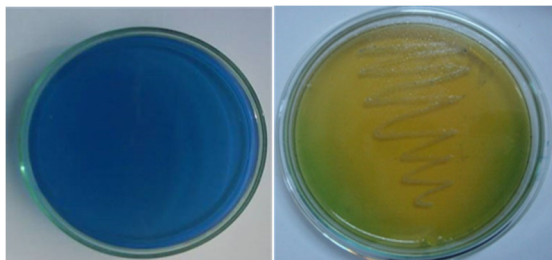
Hình 1: Môi trường không có CaCO<sub>3</sub> (a), môi trường có CaCO<sub>3</sub> (b), khuẩn lạc tạo vòng halo trên môi trường có CaCO<sub>3</sub> (c)

Bảng 1: Kết quả kiểm tra sinh lý, sinh hóa của 21 dòng phân lập

STT	Dòng vi khuẩn	Catalase	Nhuộm Gram	Tạo vòng halo	Bromocresol green
1	PN1	+		+	+
2	PN2	+	-	+	+
3	NT1	+	-	+	+
4	NT2	+	-	+	+
5	MTA1	+	-	+	+
6	MTA2	+	-	+	+
7	BK1	+	-	+	+
8	BK2	+	-	+	+
9	BK3	+	-	+	+
10	TQH1	+	-	+	+
11	TQH2	+	-	+	+
12	VTN1	+	-	+	+
13	VTN2	+	-	+	+
14	D1	+	-	+	+
15	D2	+	-	+	+
16	C1	+	-	+	+
17	C2	+	-	+	+
18	CT1	+	-	+	+
19	CT2	+	-	+	+
20	TN1	+	-	+	+
21	TN2	+	-	+	+

Ghi chú: (+) dương tính, (-) âm tính

Thử khả năng oxy hóa lactate thành CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O trên môi trường YPGD bổ sung bromocresol green 0,01% (Hình 2).



**Hình 2: Môi trường bổ sung bromocresol green (trái), vi khuẩn làm đổi màu môi trường từ xanh lam sang vàng (phải)**

Kết quả kiểm tra sinh lý, sinh hóa như: catalase, nhuộm Gram, tạo vòng halo trên môi trường bổ sung CaCO<sub>3</sub>, chuyển môi trường bổ sung bromocresol green từ xanh lam sang vàng của 21 dòng vi khuẩn được trình bày ở Bảng 1.

Qua các thử nghiệm trên có thể kết luận các dòng vi khuẩn phân lập được thuộc nhóm *Acetobacter* dựa trên các cơ sở sau: Gram âm, có enzyme

catalase, tế bào vi khuẩn có dạng hình que, tạo vòng sáng halo trên môi trường YPGD có bổ sung CaCO<sub>3</sub>, chuyển màu môi trường YPGD có bổ sung bromocresol green từ xanh lam sang vàng và ngược lại.

### 3.2 Tuyển chọn dòng vi khuẩn có hoạt lực tạo màng cellulose cao nhất trên cơ chất nước mía từ các dòng đã phân lập

Các dòng vi khuẩn phân lập sau khi nuôi tăng sinh và xác định mật số được tiến hành thí nghiệm khảo sát khả năng lên men trong khay nhựa trên cơ chất nước mía 10 °Brix, pH 5,2 ở nhiệt độ phòng. Kết quả đánh giá đặc điểm và khối lượng của màng cellulose do các dòng vi khuẩn tổng hợp được thể hiện sau 6 ngày lên men. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy khối lượng cellulose của 22 dòng vi khuẩn *Acetobacter* spp. có sự khác biệt khi lên men từ cơ chất nước mía. Chủng vi khuẩn BK3 có khả năng lên men tạo sản lượng cellulose cao nhất (134,48 g/200mL) và có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê với chủng đối chứng TB của phòng thí nghiệm cũng như các chủng được phân lập còn lại ở độ tin cậy 95%.

**Bảng 2: Khối lượng màng cellulose thu được của 22 dòng vi khuẩn sau 6 ngày lên men**

STT	Tên dòng	Khối lượng tươi (g/200mL)	Khối lượng khô (g/200mL)
1	PN1	104,92 <sup>b</sup>	1,15 <sup>b</sup>
2	PN2	40,26 <sup>g</sup>	0,42 <sup>h</sup>
3	NT1	21,92 <sup>h</sup>	0,23 <sup>i</sup>
4	NT2	59,37 <sup>ef</sup>	0,58 <sup>fg</sup>
5	MTA1	94,73 <sup>c</sup>	0,98 <sup>c</sup>
6	MTA2	60,22 <sup>c</sup>	0,64 <sup>f</sup>
7	BK1	52,37 <sup>ef</sup>	0,57 <sup>g</sup>
8	BK2	109,56 <sup>b</sup>	1,11 <sup>b</sup>
9	BK3	134,48 <sup>a</sup>	1,4 <sup>a</sup>
10	TQH1	79,60 <sup>d</sup>	0,81 <sup>de</sup>
11	TQH2	47,47 <sup>fg</sup>	0,45 <sup>h</sup>
12	VTN1	55,09 <sup>ef</sup>	0,59 <sup>fg</sup>
13	VTN2	78,01 <sup>d</sup>	0,77 <sup>c</sup>
14	D1	14,24 <sup>hi</sup>	0,13 <sup>j</sup>
15	D2	0 <sup>j</sup>	0 <sup>k</sup>
16	C1	9,04 <sup>i</sup>	0,07 <sup>j</sup>
17	C2	0 <sup>j</sup>	0 <sup>k</sup>
18	CT1	0 <sup>j</sup>	0 <sup>k</sup>
19	CT2	0 <sup>j</sup>	0 <sup>k</sup>
20	TN1	0 <sup>j</sup>	0 <sup>k</sup>
21	TN2	0 <sup>j</sup>	0 <sup>k</sup>
22	TB (ĐC)	82,7 <sup>d</sup>	0,86 <sup>d</sup>
CV (%)		10,6	7,7

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại; Các giá trị có cùng mẫu tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%

**3.3 Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình lên men tạo màng cellulose của dòng vi khuẩn BK3 từ cơ chất nước mía**

Chủng BK3 được tuyển chọn ở thí nghiệm trên có khả năng tạo ra sản lượng cellulose cao nhất. Mật số vi khuẩn môi trường tăng sinh là  $5,8 \times 10^8$  tế bào/mL. Quá trình lên men được thực hiện ở các mức thời gian 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ngày. Kết quả ở Bảng 3 cho thấy nghiệm thức ngày 4, 5, 6, 7, 8, 9 lên men tạo khối lượng cellulose cao, khác biệt không ý nghĩa thống kê so với nhau nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại ở độ tin cậy 95%. Trong đó nghiệm thức ngày 7 tạo ra khối lượng cellulose cao nhất, khác biệt không có ý nghĩa

với nghiệm thức ngày 8, ngày 6 và ngày 9 nhưng khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức ngày 4 và ngày 5 ở độ tin cậy 95%. Xét về độ dày, các nghiệm thức ngày 4, 5, 6, 7, 8, 9 đều tạo ra màng cellulose có độ dày cao, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với nhau nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại ở độ tin cậy 95%. Trong đó nghiệm thức ngày 6, ngày 7 và ngày 8 lên men tạo ra màng cellulose có độ dày cao nhất khác biệt không có ý nghĩa thống kê với nhau nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức ngày 4, ngày 5 và ngày 9 ở độ tin cậy 95%. Từ kết quả độ dày và khối lượng màng cellulose cho thấy nghiệm thức ngày 7 đạt kết quả cao nhất so với các nghiệm thức còn lại.

**Bảng 3: Khối lượng cellulose lên men từ cơ chất nước mía ở các mức thời gian**

Ngày	Độ dày (cm)	Khối lượng tươi (g/200mL)	Khối lượng khô (g/200mL)
3	0,53 <sup>d</sup>	78,67 <sup>c</sup>	0,9 <sup>c</sup>
4	0,80 <sup>b</sup>	113,50 <sup>c</sup>	1,31 <sup>c</sup>
5	0,85 <sup>b</sup>	118,51 <sup>bc</sup>	1,37 <sup>bc</sup>
6	0,97 <sup>a</sup>	125,24 <sup>abc</sup>	1,44 <sup>abc</sup>
7	1,03 <sup>a</sup>	135,98 <sup>a</sup>	1,58 <sup>a</sup>
8	0,97 <sup>a</sup>	128,22 <sup>ab</sup>	1,47 <sup>ab</sup>
9	0,87 <sup>b</sup>	123,79 <sup>abc</sup>	1,43 <sup>bc</sup>
10	0,63 <sup>c</sup>	100,15 <sup>d</sup>	1,15 <sup>d</sup>
CV (%)	6,3	6,5	6,4

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại; Các giá trị có cùng mẫu tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%

Kết quả khối lượng khô đạt được 1,58 g/200mL sau 7 ngày lên men ở Bảng 3 cao hơn với nghiên cứu của Nguyễn Thúy Hương và Phạm Thành Hồ (2003) đạt 1,43 g/200mL khi lên men dòng vi khuẩn *Acetobacter xylinum* P.16 sau 6 ngày trên môi trường nước mía và thấp hơn nghiên cứu của Chawla *et al.* (2008) đã lên men dòng *Acetobacter xylinum* sp. *sucrofermentans* BPR2001 trên môi trường có fructose sau 5 ngày và khối lượng khô đạt được là 1,74 g/200mL.

**3.4 Ảnh hưởng của độ Brix, pH và mật số vi khuẩn của dòng BK3 đến quá trình lên men tạo màng cellulose từ cơ chất nước mía**

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của các yếu tố: độ Brix, pH và mật số vi khuẩn ban đầu thích hợp cho quá trình lên men tạo ra sản lượng cellulose từ môi trường nước mía, thời gian lên men 7 ngày được trình bày ở Bảng 4. Nghiệm thức 15 (Brix 8 – pH 5,2 – mật số  $10^7$ ) lên men trên cơ chất nước mía đạt khối lượng cellulose tươi là 140,26 g/200mL, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức 24

(Brix 10 – pH 5,2 – mật số  $10^7$ ) đạt khối lượng 134,37 g/200mL và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại với độ tin cậy 95%. Các nghiệm thức cho kết quả cao kế tiếp là 23 (Brix 10 – pH 5,2 – mật số  $10^5$ ), 14 (Brix 8 – pH 5,2 – mật số  $10^5$ ), 5 (Brix 6 – pH 5,2 – mật số  $10^5$ ), 22 (Brix 10 – pH 5,2 – mật số  $10^3$ ), đạt khối lượng màng cellulose sau khi lên men lần lượt là 133,67, 132,66, 131,82, 130,60 g/200mL, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với nhau và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại với độ tin cậy 95%.

Về khối lượng khô thì nghiệm thức 15 (Brix 8 – pH 5,2 – mật số  $10^7$ ) lên men trên cơ chất nước mía đạt khối lượng cellulose là 1,635 g/200mL, khác biệt có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức 24 (Brix 10 – pH 5,2 – mật số  $10^7$ ), 14 (Brix 8 – pH 5,2 – mật số  $10^5$ ), 23 (Brix 10 – pH 5,2 – mật số  $10^5$ ), đạt khối lượng lần lượt là 1,55, 1,54, 1,53 g/200mL và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại với độ tin cậy 95%.

**Bảng 4: Kết quả khảo sát ảnh hưởng của độ Brix, pH và mật số vi khuẩn ban đầu đến khối lượng cellulose của chủng vi khuẩn BK3 trên cơ chất nước mía**

Nghiệm thức	Brix – pH -Mật số vi khuẩn(tb/mL)	Brix sau lên men	pH sau lên men	Độ dày (cm)	Khối lượng cellulose tươi (g/200mL)	Khối lượng cellulose khô (g/200mL)
1	6 – 4,7– 10 <sup>3</sup>	4,05 <sup>i</sup>	3,32 <sup>h</sup>	0,35 <sup>h</sup>	52,33 <sup>l</sup>	0,6 <sup>m</sup>
2	6 – 4,7 – 10 <sup>5</sup>	3,5 <sup>m</sup>	3,37 <sup>h</sup>	1,0 <sup>cd</sup>	120,67 <sup>def</sup>	1,385 <sup>def</sup>
3	6 – 4,7 – 10 <sup>7</sup>	4,15 <sup>i</sup>	3,32 <sup>h</sup>	0,5 <sup>g</sup>	81,29 <sup>j</sup>	0,94 <sup>j</sup>
4	6 – 5,2 – 10 <sup>3</sup>	3,7 <sup>klm</sup>	3,60 <sup>de</sup>	0,7 <sup>f</sup>	97,55 <sup>i</sup>	1,135 <sup>i</sup>
5	6 – 5,2 – 10 <sup>5</sup>	4,0 <sup>jk</sup>	3,56 <sup>ef</sup>	1,1 <sup>ab</sup>	131,82 <sup>bc</sup>	1,515 <sup>bc</sup>
6	6 – 5,2 – 10 <sup>7</sup>	3,65 <sup>lm</sup>	3,68 <sup>c</sup>	0,9 <sup>e</sup>	107,72 <sup>h</sup>	1,24 <sup>h</sup>
7	6 – 5,7 – 10 <sup>3</sup>	3,95 <sup>kl</sup>	3,66 <sup>cd</sup>	0,95 <sup>de</sup>	118,69 <sup>efg</sup>	1,365 <sup>efg</sup>
8	6 – 5,7 – 10 <sup>5</sup>	3,9 <sup>kl</sup>	3,79 <sup>a</sup>	0,2 <sup>i</sup>	39,12 <sup>m</sup>	0,445 <sup>n</sup>
9	6 – 5,7 – 10 <sup>7</sup>	3,85 <sup>kl</sup>	3,76 <sup>ab</sup>	0,35 <sup>h</sup>	63,47 <sup>k</sup>	0,735 <sup>l</sup>
10	8 – 4,7 – 10 <sup>3</sup>	6,05 <sup>d</sup>	3,36 <sup>h</sup>	0,45 <sup>g</sup>	75,86 <sup>j</sup>	0,87 <sup>jk</sup>
11	8 – 4,7 – 10 <sup>5</sup>	6,1 <sup>d</sup>	3,31 <sup>h</sup>	0,9 <sup>e</sup>	114,56 <sup>fg</sup>	1,325 <sup>fg</sup>
12	8 – 4,7 – 10 <sup>7</sup>	5,85 <sup>de</sup>	3,34 <sup>h</sup>	0,95 <sup>de</sup>	116,55 <sup>efg</sup>	1,345 <sup>efg</sup>
13	8 – 5,2 – 10 <sup>3</sup>	4,8 <sup>i</sup>	3,48 <sup>g</sup>	1,0 <sup>cd</sup>	125,66 <sup>cd</sup>	1,445 <sup>cd</sup>
14	8 – 5,2 – 10 <sup>5</sup>	5,3 <sup>gh</sup>	3,50 <sup>fg</sup>	1,1 <sup>ab</sup>	133,67 <sup>b</sup>	1,54 <sup>b</sup>
15	8 – 5,2 – 10 <sup>7</sup>	5,05 <sup>hi</sup>	3,53 <sup>fg</sup>	1,15 <sup>a</sup>	140,26 <sup>a</sup>	1,635 <sup>a</sup>
16	8 – 5,7 – 10 <sup>3</sup>	5,1 <sup>ghi</sup>	3,82 <sup>a</sup>	0,9 <sup>e</sup>	114,99 <sup>fg</sup>	1,325 <sup>fg</sup>
17	8 – 5,7 – 10 <sup>5</sup>	4,85 <sup>i</sup>	3,76 <sup>ab</sup>	0,7 <sup>f</sup>	96,72 <sup>i</sup>	1,115 <sup>i</sup>
18	8 – 5,7 – 10 <sup>7</sup>	5,25 <sup>gh</sup>	3,76 <sup>ab</sup>	0,45 <sup>g</sup>	75,08 <sup>j</sup>	0,865 <sup>k</sup>
19	10 – 4,7 – 10 <sup>3</sup>	6,6 <sup>c</sup>	3,31 <sup>h</sup>	0,9 <sup>e</sup>	119,04 <sup>efg</sup>	1,345 <sup>efg</sup>
20	10 – 4,7 – 10 <sup>5</sup>	6,1 <sup>d</sup>	3,33 <sup>h</sup>	1,0 <sup>cd</sup>	121,97 <sup>de</sup>	1,405 <sup>de</sup>
21	10 – 4,7 – 10 <sup>7</sup>	5,8 <sup>de</sup>	3,33 <sup>h</sup>	0,9 <sup>e</sup>	113,41 <sup>gh</sup>	1,295 <sup>gh</sup>
22	10 – 5,2 – 10 <sup>3</sup>	6,0 <sup>d</sup>	3,55 <sup>ef</sup>	1,0 <sup>cd</sup>	130,60 <sup>bc</sup>	1,505 <sup>bc</sup>
23	10 – 5,2 – 10 <sup>5</sup>	5,65 <sup>ef</sup>	3,55 <sup>ef</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	132,66 <sup>b</sup>	1,53 <sup>b</sup>
24	10 – 5,2 – 10 <sup>7</sup>	5,4 <sup>fg</sup>	3,51 <sup>fg</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	134,37 <sup>ab</sup>	1,55 <sup>b</sup>
25	10 – 5,7 – 10 <sup>3</sup>	7,35 <sup>a</sup>	3,70 <sup>bc</sup>	0,1 <sup>j</sup>	14,89 <sup>n</sup>	0,165 <sup>o</sup>
26	10 – 5,7 – 10 <sup>5</sup>	6,75 <sup>bc</sup>	3,69 <sup>c</sup>	0,2 <sup>i</sup>	35,10 <sup>m</sup>	0,405 <sup>de</sup>
27	10 – 5,7 – 10 <sup>7</sup>	7,0 <sup>b</sup>	3,71 <sup>bc</sup>	0,35 <sup>h</sup>	63,93 <sup>k</sup>	0,765 <sup>l</sup>
CV (%)		2,93	0,91	4,06	3,08	3,2

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là kết quả trung bình của 2 lần lặp lại; Các giá trị có cùng mẫu tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%

Từ kết quả thống kê cho thấy đa số các nghiệm thức có pH trước lên men là 5,2 đều cho khối lượng cellulose cao hơn các nghiệm thức còn lại. Độ Brix trước lên men dao động từ 6 đến 10, pH sau lên men dao động từ 3,31 đến 3,82 chứng tỏ trong quá trình lên men vi khuẩn sử dụng đường tạo ra acid gluconic làm cho pH giảm và độ Brix sau khi lên men đều giảm 1,85 đơn vị so với độ Brix ban đầu chứng tỏ vi khuẩn sử dụng glucose chuyển hóa trực tiếp thành cellulose và lượng đường bổ sung là nguồn cung cấp carbon và năng lượng cho quá trình lên men của vi khuẩn.

Xét về kết quả thống kê độ dày của màng cellulose tạo ra sau khi lên men thì nghiệm thức 15 (Brix 8 – pH 5,2 – mật số 10<sup>7</sup>) có độ dày 1,15 cm, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức 14 (Brix 8 – pH 5,2 – mật số 10<sup>5</sup>), 5 (Brix 6 – pH 5,2 – mật số 10<sup>5</sup>) đạt độ dày 1,0 cm nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại

với mức độ tin cậy 95%. Từ kết quả thống kê khối lượng và độ dày của màng cellulose chứng tỏ nghiệm thức 15 với độ Brix là 8°, pH 5,2 và mật số vi khuẩn là 10<sup>7</sup> tế bào/mL đạt khối lượng và độ dày cao nhất.

Theo nghiên cứu của Bielecki *et al.* (2001), trong quá trình tổng hợp cellulose, sự oxy hóa glucose xảy ra cung cấp cho quá trình trao đổi chất các điện tử làm cho phần glucose dùng cho việc tạo thành cellulose giảm. Các sản phẩm phụ được tạo ra khi glucose bị oxy hóa bởi một số enzyme, có thể giải thích tại sao từ các nguồn carbon khác nhau thì chủng vi sinh vật lên men tổng hợp cellulose cũng khác nhau ở các giá trị pH khác nhau. Theo nghiên cứu của Chawla *et al.* (2008), *Acetobacter xylinum* tạo được màng cellulose cao nhất khi pH trong khoảng 4,0 - 6,0. Với giá trị pH 5,2 lên men tạo màng cellulose tươi đạt tổng khối lượng cao nhất là 126,03 g/200 mL cũng phù hợp với nghiên cứu của

Nguyễn Thúy Hương (2006) và Phạm Văn Phiến (2014) khi lên men tạo màng cellulose tươi đạt khối lượng cao nhất là 109,8 g/200mL sau 4 ngày từ vi khuẩn *Acetobacter xylinum* trên môi trường nước mía với pH 5,2. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Nguyễn Thúy Hương (2006) đạt 140 g/200mL sau 6 ngày và Phạm Văn Phiến (2014) đạt 109,8 g/200mL sau 4 khi lên men tạo màng cellulose tươi trên môi trường nước mía, Lê Thị Lin (2010) đạt 150,25 g/200 mL sau 7 ngày lên men trên môi trường nước dừa với mật số  $10^6$  tạo ra khối lượng màng cao nhất.

Kết quả thí nghiệm cho thấy tổ hợp nghiệm thức độ Brix 8 – pH 5,2 – mật số  $10^7$  thì dòng vi khuẩn BK3 lên men tốt nhất tạo ra khối lượng màng cellulose cao nhất là 140,26 g/200mL trên môi trường nước mía trong thời gian 7 ngày, và kết quả trên là kết quả thực nghiệm. Với mong muốn đạt được kết quả tốt hơn thì các thông số độ Brix, pH, mật số tối ưu phải được tìm thông qua phân tích hồi quy dựa trên số liệu thu thập được bằng chương trình Statgraphics Centurion XV.I với độ chính xác 95%. Ta có được phương trình hồi quy sau:

$$\begin{aligned} \text{Khối lượng cellulose} = & -7120,82 + 378,914*\text{brix} \\ & + 414,333*\text{msvk} + 2188,07*\text{pH} - 162,437*\text{pH}*\text{pH} \\ & - 78,6029*\text{pH}*\text{msvk} - 60,6851*\text{pH}*\text{brix} \\ & - 4,27875*\text{brix}*\text{brix} - 43,8101*\text{brix}*\text{msvk} \\ & - 1,485*\text{msvk}*\text{msvk} + 8,67844*\text{msvk}*\text{pH}*\text{brix} \end{aligned}$$

Thay vào phương trình với H: khối lượng cellulose, X: pH, Y: msvk, Z: độ Brix và cố định Z = 8, ta có phương trình hồi quy sau:

$$\begin{aligned} H = & -7120,82 + 37,914*8 + 414,333*Y + \\ & 2188,07*X - 162,437*X*X - 78,6029*X*Y - \\ & 60,6851*X*8 - 4,27875*8*8 - 43,8101*8*Y - \\ & 1,485*Y*Y + 8,67844*Y*X*8 \end{aligned}$$

Từ phương trình hồi quy, lần lượt lấy đạo hàm theo từng biến số, ta được hệ:

$$H'(X) = -324,874X - 9,17538Y + 1702,5892$$

$$H'(Y) = -9,17538X - 2,97Y + 63,8522$$

Cho  $H'(X) = 0$  và  $H'(Y) = 0$ , giải hệ phương trình thu được nghiệm:  $X = 5,1$  và  $Y = 6,0$ . Thay  $X = 5,1$  vào phương trình hồi quy, lần lượt lấy đạo hàm theo từng biến số còn lại, ta được hệ:

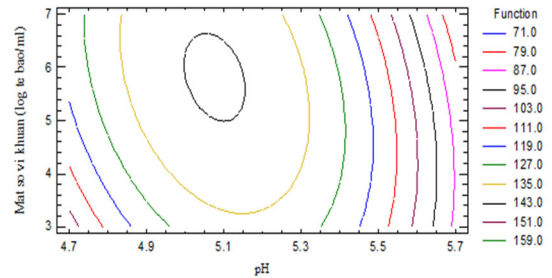
$$H'(Y) = -2,97Y + 0,2763752Z + 15,030268$$

$$H'(Z) = +0,2763752Y - 8,5575Z + 70,633692$$

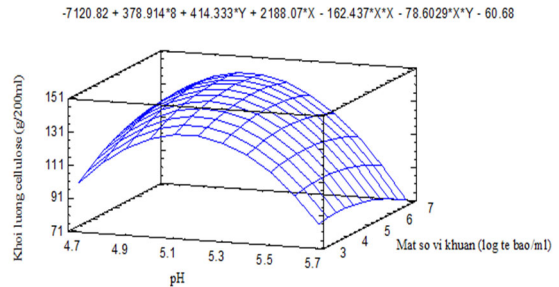
Cho  $H'(Y) = 0$  và  $H'(Z) = 0$ , giải hệ phương trình thu được nghiệm:  $Y = 6,0$  và  $Z = 8,5$ . Từ X, Y, Z thay vào phương trình hồi quy ta được  $H = 144,59$  g.

Như vậy khối lượng cellulose tối ưu tính toán với độ Brix là 8,5, pH tối ưu là 5,1 và mật số vi khuẩn

tối ưu là  $10^6$ . Các thông số tối ưu này có giá trị pH và mật số vi khuẩn tương đương với các thông số của nghiệm thức tốt nhất thí nghiệm, chứng tỏ thí nghiệm được bố trí tối ưu.



**Hình 3: Biểu đồ đường mức thể hiện sự tương quan giữa mật số vi khuẩn và pH ban đầu đến quá trình tạo màng cellulose**



**Hình 4: Biểu đồ mặt đáp ứng thể hiện sự tương quan giữa mật số vi khuẩn và pH ban đầu đến quá trình tạo màng cellulose**

Từ kết quả tính toán dựa trên phương trình hồi quy cho thấy khối lượng cellulose tối ưu trên tính toán (144,59 g/200mL) lớn hơn so với khối lượng cellulose đạt được trên thực tế (140,26 g/200mL). Như vậy, điều kiện tối ưu lên men tạo cellulose của chủng vi khuẩn BK3 trên cơ chất nước mía là độ Brix 8,5, pH 5,1 và mật số vi khuẩn  $10^6$  tế bào/mL.

### 3.5 Thiết lập quy trình lên men tạo màng cellulose từ môi trường nước mía qua các thông số tối ưu tính toán được dựa theo phương trình hồi quy

Thí nghiệm được tiến hành với các chỉ tiêu tối ưu độ Brix 8,5; pH 5,1; mật số vi khuẩn dòng BK3 là  $10^6$  tế bào/mL. Kết quả lên men tạo màng cellulose từ môi trường nước mía thời gian 7 ngày được trình bày trong Bảng 5. Quá trình lên men từ các thông số tối ưu với độ Brix 8,5; pH 5,1; mật số vi khuẩn là  $10^6$  tế bào/mL trên các khay 200 mL và khay lớn 1000 mL kết quả khối lượng màng cellulose thu được ở các khay 200 mL (trung bình đạt 144,33 g/200mL tươi và 1,76 g/200mL khô) và 1000 mL (trung bình đạt 715 g/1000mL tươi và 9,14 g/1000mL khô), cao hơn so với các thông số khi bố



trí thí nghiệm với độ Brix 8; pH 5,2; mật số vi khuẩn là  $10^7$  tế bào/mL chỉ đạt 140,26 g/200mL tươi và 1,635 g/200mL khô (tương đương với kết quả khối

lượng cellulose tươi tối ưu khi tính toán sau khi giải phương trình hồi quy là 144,59 g/200mL).

**Bảng 5: Kết quả lên men tạo màng cellulose từ những thông số tối ưu trên các khay lớn từ môi trường nước mía**

STT		Độ dày(cm)	Brix sau lên men	pH sau lên men	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
200 mL	Khay 1	1,1	5,5	3,66	142	1,75
	Khay 2	1,2	5,5	3,68	147	1,78
	Khay 3	1,1	5,5	3,65	144	1,76
1000 mL	Khay 1	1,4	5,0	3,53	712	9,11
	Khay 2	1,5	5,0	3,52	718	9,17
	Khay 3	1,4	5,0	3,53	715	9,14

Khi lên men từ các thông số tối ưu kết quả khối lượng cellulose khô đạt được trung bình của 3 lần lặp lại là 9,14 g/1000mL cũng tương đương với nghiên cứu của Yoshinaga *et al.*, (1997) đạt 9,15 g/1000 mL khi lên men dòng vi khuẩn *Acetobacter xylinum* sp. (BPR2002) trên môi trường có đường sucrose và cao hơn so với nghiên cứu của Chawla *et al.*, (2008) đạt 8,7 g/1000mL khi lên men vi khuẩn *Acetobacter xylinum* sp. *sucrofermentans* BPR2001 trên môi trường có fructose và Nguyễn Thúy Hương (2006) là 7,53 g/1000mL khi lên men vi khuẩn *Acetobacter xylinum* trên môi trường nước mía.

Như vậy, dòng BK3 là dòng vi khuẩn có hoạt lực lên men tạo màng cellulose cao nhất trên cơ chất nước mía.

**3.6 Định danh dòng vi khuẩn BK3 tuyển chọn được bằng phương pháp giải trình tự**

Kết quả giải trình tự dòng vi khuẩn BK3 gồm 912 base với cặp primer 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT- 3') và 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC - 3')

GRGSGCWGCTTACACATGCAGTCGCAC  
 GAACCTTGCCGATGGCGTGGTGATCACCCC  
 GTCGCATAACCCGCCGGAAGATGGCGGCT  
 ACAAGTACAATCCCCCCATGGCGGCCCGG  
 CGGATACCGACATCACCAAGGTGGTGAA  
 ACTGCGGCAACGACTACATGGCCAAAA  
 GATGGAAGGCGTGAAGCGCGTCAGTTTCG  
 AGGACGCGCTGAAGGCCCCACCACGAAG  
 CGCCATGACTACATCACGCCGTATGTGGAT  
 GACCTGGCCCGCGTGGTGGACATGGACGTG

ATCCGTGAATCCGGCGTGTCCATCGGCATT  
 GATCCGCTGGGTGGGGCCGCAGTGGATTAC  
 TGGCAGCCGATCATCGACAAATACGGCATT  
 AACGCCACGATCGTCAGCAAGGAAGTGGA  
 CCCGACCTTCCGCTTCATGACCGCTGACTG  
 GGACGGGCAGATCCGCATGGACTGTTCCCTC  
 CCCCTACGCCATGGCGCGCCTTGTCGGGAT  
 GAAGGACAAATTCGACATCGCCTTCGCCAA  
 TGATACCGATGCCGACCGCCATGGCATCGT  
 ATCGGGCAAGTACGGGCTTATGAACCCCAA  
 CCACTATCTGGCTGTCGCGATTGAATACCT  
 GTTCAACAATCGCGAAAACCTGGAATGCCA  
 GCGCGGGCGTGGGCAAGACGGTGGTCAGC  
 AGCAGCATGATCGACCGCGTGGCCAAGGA  
 AATCGGCCGCAAGCTGGTGGAAGTGCCGG  
 TCGGGTTCAAGTGGTTTTGTCGATGGGCTGT  
 ACAACGGCACGCTGGGCTTTGGCGGTGAA  
 GAAAGCGCGGGCGCGTCCCTTCCCTGCGCCGT  
 GCCGGCACGGTGTGGAGCACGGACAATGT  
 AAGCCTGTATTCCAGGGTGGAAATCCGAGG  
 ACCTTAMGGTCGCATGCTTGCTGCCAG

Trình tự đoạn gen được giải gồm 912 base nitrogen và đoạn gen này được so sánh vi khuẩn trên Genbank (NCBI) với phần mềm nucleotide BLAST (Hình 5). Sau khi giải trình tự và BLAST trên NCBI cho thấy có nhiều dòng vi khuẩn cho kết quả phù hợp với dòng BK3 và E value là 0,0. Tuy nhiên, danh sách mô tả thể hiện kết quả theo thứ tự từ phù hợp nhất đến ít phù hợp nhất với độ tương đồng cao 99% (822/823), mức độ sai lệch không đáng kể so với trình tự 16S rRNA của *Acetobacter xylinum* phosphoglucosyltransferase (celB) gene, complete cds với số đăng ký trên GenBank là L24077.1.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Acetobacter xylinum phosphoglucomutase (celB) gene, complete cds</a>	1515	1515	90%	0.0	99%	<a href="#">L24077.1</a>
<a href="#">Gluconacetobacter xylinus E25, complete genome</a>	1371	1371	90%	0.0	97%	<a href="#">CP004360.1</a>
<a href="#">Komagataeibacter rhaeticus strain iGEM genome assembly, chromosome_1</a>	977	977	90%	0.0	88%	<a href="#">LT575493.1</a>
<a href="#">Acetobacter pasteurianus subsp. ascendens strain LMG 1590, complete genome</a>	952	952	89%	0.0	88%	<a href="#">CP015164.1</a>
<a href="#">Acetobacter pasteurianus subsp. paradoxus strain LMG 1591, complete genome</a>	946	946	90%	0.0	87%	<a href="#">CP015168.1</a>

**Hình 5: So sánh trình tự vi khuẩn BK3 trên Genbank sử dụng nucleotide BLAST**

Như vậy, kết quả định danh dòng vi khuẩn BK3 tương đồng với vi khuẩn *Acetobacter xylinum*.

#### 4 KẾT LUẬN

Kết quả đã phân lập được 21 dòng vi khuẩn *Acetobacter* spp. Trong đó, dòng BK3 cho kết quả khối lượng màng cellulose tươi (134,48 g/200mL) và màng khô (1,4 g/200mL) cao nhất. Thời gian thích hợp cho quá trình lên men cho khối lượng màng cellulose cao nhất là 7 ngày. Sử dụng dòng vi khuẩn BK3 lên men với môi trường lên men phối chế ban đầu là Brix 8, pH 5,2 và mật số vi khuẩn là  $10^7$  tế bào/mL lên men 7 ngày cho kết quả khối lượng màng cellulose tươi là 140,26 g/200mL và màng khô là 1,635 g/200mL. Hơn nữa, lên men 7 ngày với các thông số tối ưu (độ Brix 8,5, pH 5,1 và mật số vi khuẩn là  $10^6$  tế bào/mL) cho kết quả sản lượng màng cellulose đạt 715 g/1000mL (tươi) và 9,14 g/1000mL (khô). Bằng phương pháp giải trình tự, kết quả định danh dòng BK3 đồng hình 99% với vi khuẩn *Acetobacter xylinum*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alaban, C. A., 1967. Studies on the optimum conditions for "Nata de coco" bacterium or 'nata' formation in coconut water. The Philippine Agriculturist, 45: 490-515.

Bielecki, P. D., Krystynowicz, D.E., Mariannaturkiewicz, P.D., and Kalinowska, H., 2001. Bacterial cellulose. Institute of Technical Biochemistry, Technical Chemistry of Łódź, Stefanowskiego, 37-46.

Chawla, P. R., Bajaj, I.B., Survase, S.A. and Singhal, R.S., 2009. Microbial cellulose: Fermentative production and applications. Food technology & Biotechnology, 47(2): 107-124.

El-Saied, H., Basta, A.H., and Gobran, H.R., 2004. Research progress in friendly invironmental technology for the production of cellulose

products (bacterial and its application). Polymer-plastic Technology and Engineering, 43: 797-820.

Klemn, D., Schumann, D., Udhardt U. and Marsch, S., 2001. Bacterial cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. Progress in Polymer Science, 26(9): 1561-1603.

Lê Thị Lin, 2010. Nghiên cứu các yếu tố tạo cellulose của *Acetobacter* trong sản xuất thạch dừa. Luận văn tốt nghiệp đại học ngành Công nghệ sinh học. Viện nghiên cứu và phát triển công nghệ sinh học. Đại học Cần thơ.

Nguyễn Thúy Hương, 2006. Tuyển chọn và cải thiện các chủng *Acetobacter xylinum* tạo cellulose vi khuẩn để sản xuất và ứng dụng ở quy mô pilot. Luận án tiến sĩ. Trường Đại học Bách Khoa Tp.HCM.

Nguyễn Thúy Hương, Phạm Thành Hồ, 2003. Thử nghiệm sản xuất bacterial cellulose từ nguyên liệu ri đường và nước mía. Báo cáo hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, 296-299.

Phạm Văn Phiến, 2014 Nghiên cứu tối ưu hoá quá trình lên men thu nhận Bacterial cellulose từ môi trường ri đường và môi trường nước mía. Trường Đại học Bách Khoa , Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Sattler, K. and Fiedler, S., 1990. Production and application of Bacterial cellulose. Zentralbl microbiol, 45: 247-252.

Yoshinaga, F., 1997. Production of Baterial cellulose by agitation culture systems. Pure and application chemistry. 69: 2453-2458.

Yoshinaga, F., Kojima, Y., Tsuchida, T. and Tonouchi, N., 1997. High rate production in static culture of bacterial cellulose from sucrose by *Acetobacter xylinum*. Biochem J, 56: 315-322

Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y. and Yoshinaga, F., 1998. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. Cellulose, 5: 187-200.