

Tối ưu hóa môi trường lên men *Bacillus velezensis* thu nhận CMCase bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

Nguyễn Tiến Dũng^{1,2,*}, Trần Quốc Tuấn^{1,2}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP.Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Liên hệ

Nguyễn Tiến Dũng, Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: ngdung@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 17-8-2024
- Ngày sửa đổi: 09-12-2024
- Ngày chấp nhận: 16-6-2025
- Ngày đăng: 30-9-2025

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v9i3.1405>



Check for updates

Bản quyền

© ĐHQG TP.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



TÓM TẮT

Trong xu hướng của công nghiệp hiện đại với đặc trưng là nền kinh tế tuần hoàn, các nghiên cứu ứng dụng cellulase từ vi sinh vật để chuyển hóa các phụ phẩm từ đồng ruộng, trang trại thành những chất nền có tính kinh tế cao trong lĩnh vực công nghệ nhiên liệu sinh học ngày càng được quan tâm. *Bacillus velezensis*, gần đây nổi lên là một nguyên liệu tốt trong khả năng xử lý các hợp chất lignocellulose với hoạt tính CMCase. Bài báo trình bày việc đánh giá các điều kiện trong quy trình nuôi cấy và tối ưu hóa môi trường thu nhận cellulase từ *B. velezensis* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt theo thiết kế Box–Behnken. Một số điều kiện nuôi cấy thích hợp khi thu nhận hoạt tính CMCase, một dạng cellulase, từ chủng *B. velezensis* được ghi nhận trong quá trình khảo sát: thời gian tăng sinh của chủng vi khuẩn *B. velezensis* trong môi trường LB là 8 giờ; thời gian thích hợp để thu nhận cellulase là 15 giờ, mật độ giống là $1,5 \times 10^7$ CFU/mL, giá trị pH ban đầu của môi trường cảm ứng được cố định ở pH 5. Hoạt tính CMCase được thu nhận sau quá trình tối ưu hóa là $2,342 \pm 0,005$ (UI/mL) với môi trường bao gồm glucose 0,397%; tryptone 1,087%; CMC 0,509%, tăng khoảng 2,8 lần so với trước khi tối ưu hóa. Kết quả khảo sát này có thể góp phần cho những nghiên cứu tiếp theo sâu hơn như thu nhận, tinh sạch và đánh giá hoạt tính cellulase từ chủng *B. velezensis* với các tác nhân từ môi trường cũng như các ứng dụng cellulase từ chủng vi khuẩn này trong việc xử lý nguồn phế phụ phẩm nông nghiệp.

Từ khoá: *Bacillus velezensis*, cellulase, hoạt tính CMCase, phương pháp đáp ứng bề mặt, tối ưu hóa

GIỚI THIỆU

Cellulase có nhiều ứng dụng quan trọng trong nhiều lĩnh vực như nông nghiệp, công nghiệp, thực phẩm, dệt may, sản xuất bia, nhiên liệu sinh học^{1,2}. Lĩnh vực nông nghiệp trong nền kinh tế Việt Nam vẫn đóng vai trò chủ đạo. Với xu hướng kinh tế tuần hoàn, một số phụ phẩm của ngành nông nghiệp như rơm, rạ, trấu, bã mía, vỏ trái cây hiện nay được tận dụng làm nguồn nguyên liệu đầu vào của quá trình sản xuất nhiên liệu sinh học. Quy trình này giúp giảm thiểu ô nhiễm môi trường trên nhiều khía cạnh như: nhiên liệu sinh học là nguồn năng lượng thay thế nhiên liệu hóa thạch, giảm thiểu khí đốt phát thải từ quá trình đốt các phế phụ phẩm.

Cellulase là một phức hợp gồm 3 enzyme là endo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) và β -glucosidase (EC 3.2.1.21)³ có khả năng phân cắt liên kết β -1,4-glycoside trong các đại phân tử như cellulose, hemicellulose và lignocellulose^{4,5}. Các polymer này là thành phần chính trong thành tế bào thực vật, một nguồn sinh khối hữu cơ dồi dào trên trái đất. Cellulase có thể được thu nhận từ một số chi nấm như *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*⁶ nhờ vào hoạt tính cao, tuy nhiên điều kiện thu nhận dài

ngày là một nhược điểm khiến cho nguồn nguyên liệu này không được lựa chọn. Gần đây, cellulase được thu nhận từ vi khuẩn, một nguyên liệu tiềm năng trong phân giải các hợp chất lignocellulose từ sinh khối thực vật, một đối tượng để sản xuất nhiên liệu sinh học². Với ưu thế là tốc độ tăng trưởng nhanh, môi trường nuôi cấy đơn giản, khả năng sinh tổng hợp cellulase tốt, cellulase, thu nhận từ chi *Bacillus*, được nghiên cứu rộng rãi⁷⁻⁹.

Trong xu thế đó, cellulase thu nhận từ *Bacillus velezensis*, một chủng loài mới được phát hiện¹⁰ có khả năng sản xuất nhiều hợp chất có hoạt lực sinh học như polyketide, lipopeptide, peptide^{11,12}, cho thấy khả năng phân giải carbomethylcellulose cao, một dạng cellulose. Ở Việt Nam có Cẩm Tiên và cộng sự¹³ đã phân lập và khảo sát một số chủng *B. velezensis* sản xuất cellulase cho hoạt tính tốt thông qua phương pháp định tính vòng phân giải. Tuy nhiên, các nghiên cứu đánh giá hoạt tính CMCase từ chủng *B. velezensis* về môi trường cảm ứng và điều kiện thu nhận vẫn còn hạn chế. Bài báo trình bày việc tối ưu hóa môi trường sinh tổng hợp CMCase được thu nhận từ *Bacillus velezensis* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt theo thiết kế Box–Behnken.

Trích dẫn bài báo này: Dũng N.T., Tuấn T.Q. Tối ưu hóa môi trường lên men *Bacillus velezensis* thu nhận CMCase bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2025; 9(3):3416-3424.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hóa chất

Carbomethylcellulose (độ nhớt trung bình), 3,5-dinitrosalicylic acid, congo red, cao nấm men, tryptone, peptone, fructose, lactose, sucrose, maltodextrin của HiMedia, Ấn Độ glucose, acetic acid, sodium acetate, HCl, NaOH, tinh bột, tím kết tinh, safarin, NaCl của Xilong, Trung Quốc $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ của Merck, Đức.

Thiết bị

Tủ an toàn sinh học cấp II loại A2 (Esco), nồi hấp tiệt trùng (WiseClave), tủ ẩm lactic (Labtech), cân phân tích (Ohaus), máy đo pH (Mettler Toledo), máy ly tâm lạnh (Eppendorf), máy quang phổ kế UV/VIS (Metash UV-5100).

Mẫu phân lập

Các mẫu đất được thu thập từ tầng đất mặt ở các khu vực đất ẩm ướt gần kênh rạch tại phường Linh Trung, thành phố Thủ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh vào tháng 12 năm 2020.

Môi trường nuôi cấy và giữ giống

Môi trường tăng sinh Luria Bertani Broth (LB broth): tryptone 1%, cao nấm men 0,5%, NaCl 1%, pH 7.

Môi trường LB agar để giữ giống: tryptone 1%, cao nấm men 0,5%, NaCl 1%, agar 2,5%, pH 7.

Môi trường cảm ứng thu nhận cellulase: glucose 0,25%, cao nấm men 0,5%, CMC 1%, pH 5.

Nuôi cấy và bảo quản giống

Chủng vi khuẩn được bảo quản trong glycerol -80°C để lưu trữ trong thời gian dài. Trong quá trình thực nghiệm, chủng vi khuẩn được hoạt hóa và lưu trữ trong thạch nghiêng LB agar ở -4°C . Thời gian bảo quản 2–3 tuần.

Định tính khả năng sinh cellulase của các chủng vi khuẩn phân lập

Khả năng sinh cellulase của các chủng vi khuẩn được định tính bằng đường kính vòng phân giải sau khi ủ dịch enzyme thô ở điều kiện 24 giờ, 37°C trong đĩa petri chứa môi trường CMC 0,5% và agar 2,5%. Sau 24 giờ, thuốc thử congo red được thêm vào đĩa petri và ủ khoảng 15 phút. Sau khi ủ, rửa bằng dung dịch NaCl 1 M trong 15 phút. Quan sát và ghi nhận vòng phân giải¹⁴.

Định danh vi sinh vật bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA

Chủng được giải trình tự 16S rRNA tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa theo phương pháp Sanger. Kết quả được so sánh với dữ liệu trên NCBI bằng chương trình Blast để chọn kết quả có độ tương đồng cao nhất. Đối chứng được sử dụng là chủng *Pseudomonas boreopolis*. Cây phát sinh loài được xây dựng trên mô hình “General Time Reversible” của phần mềm MEGA11¹⁵.

Xác định hoạt tính cellulase

Hoạt tính cellulase được xác định dựa vào lượng đường khử sinh ra ở khi cơ chất CMC (carboxymethylcellulose) bị phân cắt bởi cellulase trong điều kiện pH 5 và 40°C . Thuốc thử DNS được thêm vào để phản ứng với đường khử tạo dung dịch vàng đến đỏ cam, sau đó được đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ¹⁶. Một đơn vị hoạt tính CMCase tính trên số μmol glucose tạo ra bởi 1 mL dịch enzyme thô trong điều kiện pH 5 và 40°C trong 1 phút.

Phương pháp thu nhận enzyme

Chủng *B. velezensis* được tăng sinh trong môi trường LB trong 8 giờ. Sau đó được chuyển qua môi trường cảm ứng với mật độ giống là $1,5 \times 10^7$ CFU/mL (nồng độ cuối). Thời gian cảm ứng là 15 giờ. Kết thúc thời gian cảm ứng, thu dịch nổi sau khi ly tâm loại sinh khối tế bào ở 10°C , 10000 rpm trong 10 phút. Dịch enzyme thô được bảo quản ở -4°C và ghi nhận hoạt tính trong ngày.

Khảo sát điều kiện nuôi cấy

Các thông số thời gian tăng trưởng trong môi trường LB, thời gian cảm ứng, mật độ giống và pH ban đầu của chủng *B. velezensis* lần lượt được khảo sát như sau. Thời gian tăng trưởng trong môi trường LB được khảo sát từ 0 giờ đến 24 giờ. Thời gian cảm ứng được khảo sát từ 0 giờ đến 21 giờ trong môi trường cơ bản thu nhận cellulase. Mật độ giống được khảo sát trong khoảng $0,5 \times 10^7$ CFU/mL đến 3×10^7 CFU/mL (nồng độ cuối). Giá trị pH ban đầu được khảo sát từ pH 4 đến pH 6.

Khảo sát các tác nhân nguồn dinh dưỡng

Các nguồn dinh dưỡng trong môi trường như các nguồn khoáng, carbon, nitrogen được khảo sát đồng thời dựa trên môi trường cơ bản bao gồm glucose 0,25%; cao nấm men 0,5%; CMC 1%, pH 5. Sáu nghiệm thức nguồn khoáng khác nhau được khảo sát: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, tổ hợp và nghiệm thức đối chứng không

bổ sung khoáng. Sáu nghiệm thức nguồn carbon khác nhau được khảo sát ở nồng độ 0,25%: glucose, fructose, lactose, sucrose, maltodextrin, tinh bột và nghiệm thức đối chứng không bổ sung carbon. Năm nguồn nitrogen khác nhau được khảo sát ở nồng độ 0,5%: cao nấm men, tryptone, peptone, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃ và nghiệm thức đối chứng không bổ sung nitrogen.

Sau khi cố định nguồn dinh dưỡng, môi trường cơ bản thu nhận cellulase có thành phần glucose 0,25%, tryptone 0,5%, CMC 1% được chọn làm môi trường chuẩn. Khảo sát nồng độ các yếu tố để xác định các giá trị biên (–1) và (+1) và giá trị trung tâm (0). Nồng độ glucose được khảo sát từ 0% đến 1,5%. Nồng độ tryptone được khảo sát từ 0% đến 2,5%. Nồng độ CMC được khảo sát từ 0% đến 2%.

Thiết kế Box–Behnken

Thiết kế Box–Behnken là mô hình được chọn để đánh giá bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). RSM là phương pháp thể hiện mối quan hệ giữa các yếu tố ảnh hưởng đến thí nghiệm (biến độc lập) và kết quả định lượng đầu ra (biến phụ thuộc). Trong đó, biến độc lập là các yếu tố môi trường đã được mã hóa bao gồm A (% glucose), B (% tryptone), C (% CMC); biến phụ thuộc Y là hoạt tính CMCase (UI/mL). Dưới đây là phương trình bậc hai mô tả mối liên hệ giữa các biến độc lập và biến phụ thuộc:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{11}A^2 + \beta_{12}B^2 + \beta_{13}C^2 + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC$$

Sử dụng phần mềm Design Expert 11, 15 thí nghiệm tương ứng là 15 môi trường tổ hợp các yếu tố khác nhau được thiết lập.

Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu được lặp lại 3 lần. Dữ liệu thô được xử lý và phân tích thống kê trên phần mềm Microsoft® Excel® for Microsoft 365 MSO và IBM SPSS Statistics 26. Dữ liệu được mô tả dưới dạng Giá trị trung bình (Mean) ± Độ lệch chuẩn (Standard deviation). Các nghiệm thức được phân tích Post hoc bằng kiểm định Tukey.

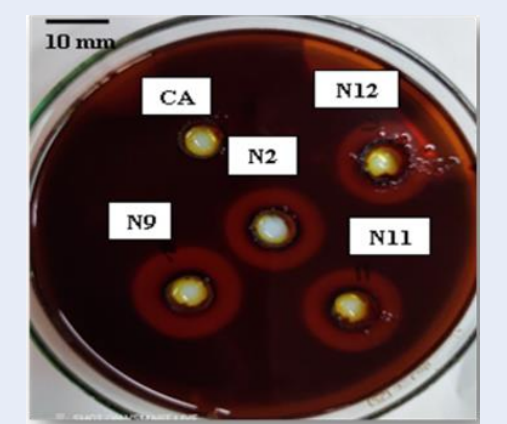
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng sinh cellulase

Cellulose là một nguồn carbon dồi dào trong sinh khối của trái đất. Vi khuẩn phân giải các hợp chất cellulose phân bố nhiều môi trường đa dạng khác nhau như từ đất^{17,18}, gỗ mục¹⁹, bọt biển²⁰, chất thải của gia súc²¹.

Bốn chủng vi khuẩn sau khi được phân lập từ đất ẩm ướt và làm thuần được mã hóa số liệu bao gồm: N12,

N2, N9, N11 được khảo sát định tính hoạt tính cellulase bằng phương pháp vòng phân giải. Kết quả được thể hiện ở Hình 1 cho thấy 4 chủng đều có khả năng phân giải CMC, trong đó nghiên cứu ghi nhận chủng vi khuẩn N9 có kết quả vòng phân giải cao nhất là 13 mm (Bảng 1). Từ kết quả trên, chủng N9 được chọn làm đối tượng chính trong nghiên cứu này. Chủng sau khi tiến hành định danh sẽ được điều tra sự ảnh hưởng của các thành phần môi trường đến hoạt tính CMCase.



Hình 1: Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi khuẩn. CA: Chủng âm (nước cất).

Bảng 1: Đường kính vòng phân giải của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng phân giải
CA	0
N2	11
N9	13
N11	10
N12	10

Ghi chú: CA: Chủng âm (Nước cất)

Định danh và mô tả hình thái vi khuẩn

Dựa vào kết quả ở Hình 2, chủng vi khuẩn N9 được nhận định là *Bacillus velezensis*. Mô tả hình thái *B. velezensis* trên đĩa thạch và kính hiển vi. Nhận thấy khuẩn lạc có màu trắng đục, viền có màu trắng bao quanh, khuẩn lạc lồi. Khi quan sát trên kính hiển vi, vi khuẩn *B. velezensis* có dạng que, thuộc nhóm Gram dương vì thành tế bào bắt màu xanh tím đặc trưng Hình 2A, Hình 2B). Sau khi giải trình tự gene 16S-rRNA, chủng N9 cho thấy có sự tương đồng 99,93 % của chủng *Bacillus velezensis* EN01. Từ đó đã xây dựng cây phát sinh loài dựa trên cơ sở dữ liệu NCBI

bằng phần mềm BLAST với 8 chủng *Bacillus* khác. Đối chứng được sử dụng là chủng *Pseudomonas boreopolis* (Hình 2C).

Khảo sát điều kiện nuôi cấy

Hình 3A cho thấy sau 8 giờ tăng sinh vi khuẩn *B. velezensis* đang ở giữa pha tăng trưởng. Do đó, thời điểm 8 giờ được cố định để thực hiện việc tăng sinh vi khuẩn cho các khảo sát. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Zhi Cai và cộng sự²², sau 10 giờ tăng sinh, chủng *B. velezensis* Z2.6 được cấy vào môi trường hoạt hóa thu nhận cellulase. Sau 8 giờ tăng sinh trong môi trường LB, khảo sát khả năng tăng trưởng và hoạt tính cellulase từ chủng vi khuẩn trong môi trường cảm ứng. Hình 3B thể hiện hoạt tính cellulase tăng dần từ 0 giờ tới 15 giờ, sau đó giảm dần. Ở thời gian 15 giờ, hoạt tính cellulase cho kết quả cao nhất là $0,831 \pm 0,022$ (UI/mL). Tương ứng, sinh khối vi khuẩn tăng rõ rệt từ thời gian 0 giờ đến 6 giờ; mật độ vi khuẩn ổn định đến 15 giờ và đi xuống sau khoảng thời gian này. Nhận thấy, *B. velezensis* thể hiện khả năng sản xuất cellulase trong suốt thời gian tăng trưởng và đạt hoạt tính cao nhất ở cuối pha cân bằng (15 giờ). Từ đó cho thấy, cellulase tham gia vào quá trình biến dưỡng của *B. velezensis* như một chất biến dưỡng sơ cấp. Đồng thời hoạt tính enzyme được thu nhận tối đa ở giai đoạn ổn định của quá trình sinh trưởng của vi khuẩn²³. So sánh với các nghiên cứu khác, thời gian thu nhận cellulase thường từ 48 giờ đến 72 giờ^{22,24}. Kết quả này cho thấy chủng *B. velezensis* có ưu thế trong việc rút ngắn thời gian thu nhận enzyme.

Hình 3C và Hình 3D cho thấy *B. velezensis* sinh hoạt tính cellulase cao nhất khi cố định ở mật độ giống ở 15×10^6 (CFU/mL) và pH ban đầu ở giá trị pH 5, tương ứng là $0,871 \pm 0,022$ (CFU/mL) và $0,874 \pm 0,021$ (CFU/mL). Các giá trị này cho thấy mật độ giống và pH ban đầu ảnh hưởng đến giá trị hoạt tính cellulase thu nhận. Trong khảo sát, mật độ giống được cố định cụ thể bằng cách xây đường tương quan tuyến tính giữa giá trị ΔOD_{600nm} và mật độ vi khuẩn (CFU/mL). Điều này khác biệt so với nhiều nghiên cứu đã thực hiện khi chỉ cố định tỷ lệ giống cấy cho vào môi trường theo tỷ lệ thể tích (v/v). Nhận thấy, hoạt tính CMCase bắt đầu tăng dần từ 5×10^6 CFU/mL và đạt đỉnh ở 15×10^6 CFU/mL, sau đó giảm dần. Mật độ giống quá cao có thể đẩy nhanh quá trình tiêu thụ oxygen hòa tan và chất dinh dưỡng trong môi trường, làm biến đổi môi trường không phù hợp cho khả năng sản xuất enzyme²². Về yếu tố pH ban đầu của môi trường, cellulase được sản xuất bởi *B. velezensis* trong khảo sát đã thể hiện hoạt tính tối đa ở pH 5 và không có nhiều sự thay đổi ở các mức pH được khảo sát. Nhiều báo cáo trước đây cho thấy khả năng thích ứng dải pH rộng trong việc xử lý cellulase của *B. velezensis*^{21,22,25}.

Khảo sát nguồn dinh dưỡng

Carbohydrate, nitrogen, khoáng chất là các thành phần dinh dưỡng đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển sinh khối và hoạt động cellulase của vi khuẩn. Từ các đại diện khác nhau của carbohydrate và nitrogen thường được sử dụng trong thu nhận cellulase từ các nghiên cứu trước^{21,22,26} nhằm chọn ra thành phần gia tăng hoạt tính cellulase tối ưu nhất, cơ chất là CMC được cố định ở các môi trường khảo sát. Kết quả ở Hình 4A cho thấy ở ba nghiệm thức đối chứng không bổ sung khoáng, tổ hợp các nguồn khoáng, $CaCl_2$ không có ý nghĩa về mặt thống kê đối với khả năng phân giải cellulase. Trong khi đó hoạt tính enzyme giảm đáng kể khi thành phần môi trường được bổ sung $MgSO_4$, KNO_3 và K_2HPO_4 . Dựa vào kết quả trên, môi trường không bổ sung khoáng thích hợp để thu nhận cellulase.

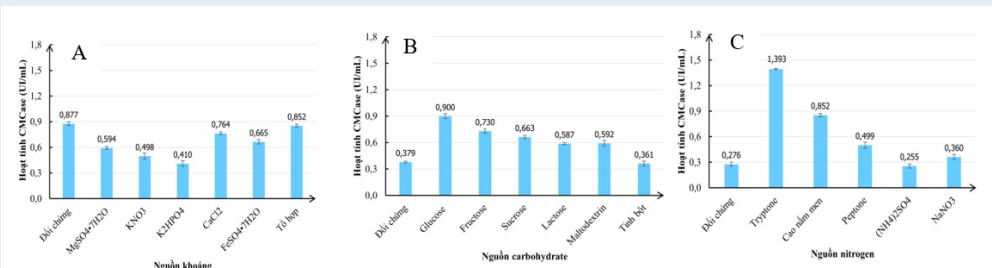
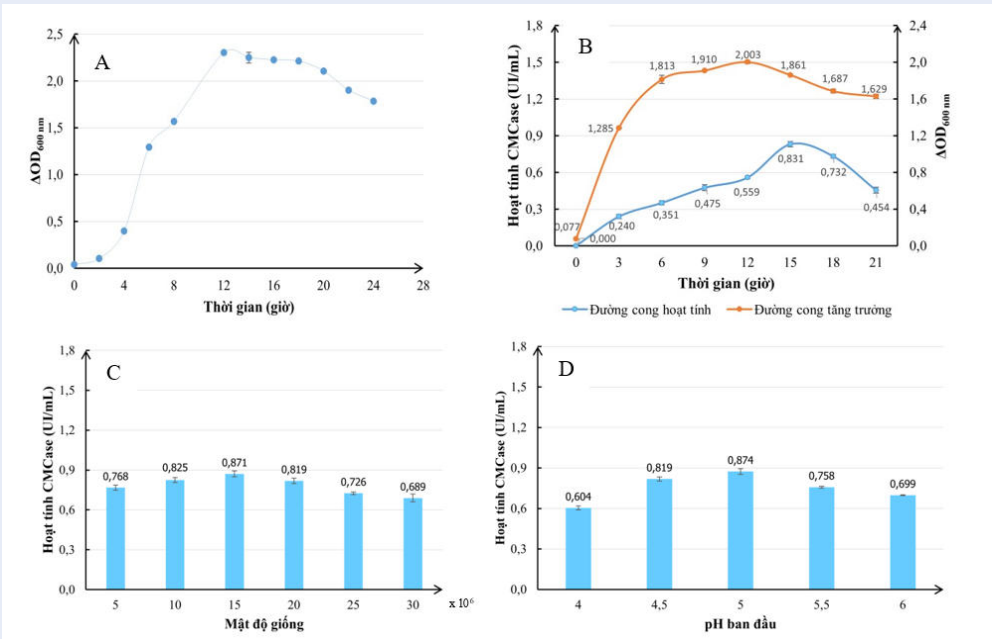
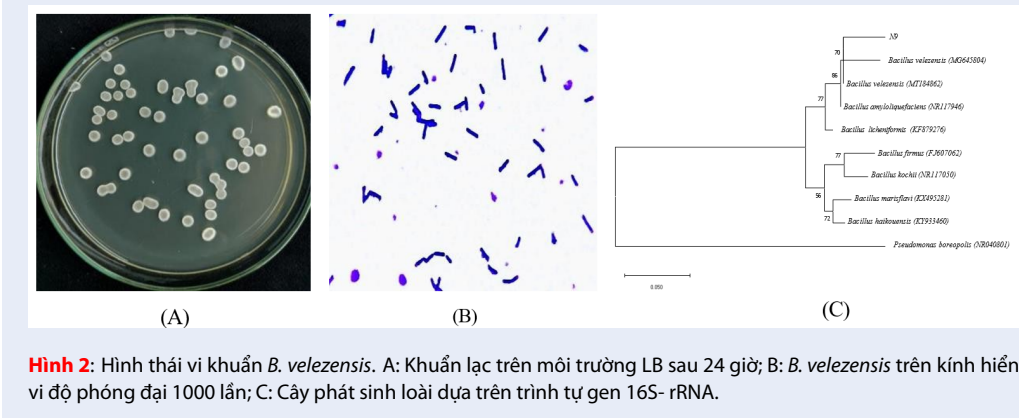
Để đơn giản hóa, môi trường thu nhận cellulase đã không có thành phần khoáng. Tiếp theo, kết quả khảo sát chỉ ra rằng glucose và tryptone là nguồn carbohydrate và nitrogen ưa thích của chủng *B. velezensis* khi sản sinh cellulase (Hình 4B, Hình 4C), kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Zhi Cai và cộng sự²². Bên cạnh đó, nhận thấy rằng khả năng tiêu thụ carbohydrate ảnh hưởng đến hoạt tính cellulase giảm dần từ đường monosaccharide, disaccharide, polysaccharide, kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước^{22,27}. Kết quả cũng thể hiện nguồn nitrogen hữu cơ (tryptone, cao nấm men, peptone) tác động tích cực đến hoạt tính cellulase hơn nhiều lần so với nguồn nitrogen vô cơ như $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ ^{24,28}.

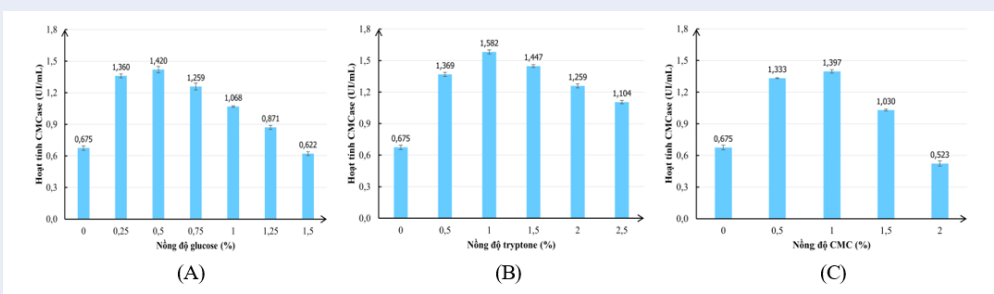
Tóm lại, môi trường khảo sát bao gồm các thành phần: glucose, tryptone, CMC được cố định để tiến hành các giá trị (-1); (0); (+1) chuẩn bị cho thiết kế Box-Behnken.

Thiết kế Box-Behnken

Kết quả khảo sát yếu tố biến thành phần môi trường thu nhận CMC với ba giá trị (-1), (0), (+1) cho 3 biến số thành phần (nồng độ glucose (%): 0,25, 0,50 và 0,75; nồng độ tryptone (%): 0,5, 1,0 và 1,5; nồng độ CMC (%): 0,5, 1,0 và 1,5) được trình bày trên Hình 5. Thử nghiệm 15 môi trường được phần mềm Design Expert đề xuất, dữ liệu được mô tả ở Bảng 2.

Sau khi thực nghiệm 15 nghiệm thức, phần mềm đã cho những thông số được thể hiện ở Bảng 3. Sau khi phân tích, nhận thấy mô hình có ý nghĩa thống kê khi giá trị p-value < 0,0001. Các nhân tố glucose, tryptone và CMC đều có giá trị p-value < 0,05. Bên cạnh đó, giá trị Lack of Fit > 0,05 chứng minh không có ý nghĩa thống kê. Phương trình thực nghiệm được phần mềm phân tích thể hiện ở Phương trình (1).





Hình 5: Kết quả khảo sát yếu tố biến thành phần môi trường thu nhận CMC

Bảng 2: Hoạt tính CMCase của nghiệm thức môi trường được phần mềm Design Expert để xuất

Nghiệm thức	Nồng độ glucose (%)	Nồng độ tryptone (%)	Nồng độ CMC (%)	Hoạt tính CMCase (UI/mL)
1	0,75	1,50	1,00	0,546
2	0,25	1,50	1,00	0,733
3	0,50	1,00	1,00	2,245
4	0,25	0,50	1,00	0,691
5	0,50	0,50	1,50	0,309
6	0,50	0,50	0,50	1,069
7	0,50	1,00	1,00	2,198
8	0,25	1,00	0,50	2,086
9	0,75	1,00	1,50	1,029
10	0,75	0,50	1,00	0,371
11	0,25	1,00	1,50	0,655
12	0,50	1,00	1,00	2,148
13	0,50	1,50	0,50	1,477
14	0,75	1,00	0,50	1,502
15	0,50	1,50	1,50	0,569

Hoạt tính CMCase = − 9,199 Glucose² − 4,148 Tryptone² − 1,215 CMC² + 0,265 Glucose.Tryptone + 1,916 Glucose.CMC − 0,147 Tryptone.CMC + 6,660 Glucose + 8,531Tryptone + 0,726 CMC (1).

Đáp ứng bề mặt của các nhân tố môi trường ảnh hưởng đến hoạt tính CMCase được trình bày ở Hình 6.

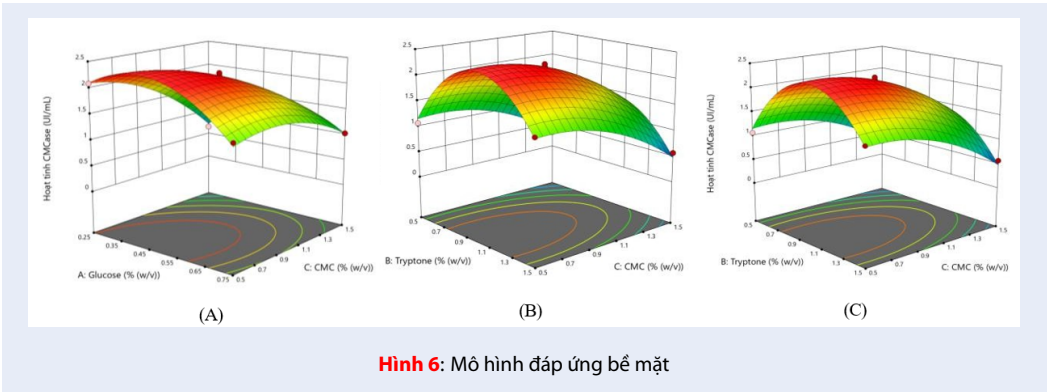
Kết quả dự đoán hoạt tính CMCase từ môi trường để xuất của phần mềm Design Expert và kết quả thực nghiệm được lặp lại 5 lần được thể hiện ở Bảng 4. Nhận thấy rằng môi trường thực nghiệm (glucose 0,397%, tryptone 1,087%, CMC 0,509%) cho kết quả hoạt tính CMCase thu được là 2,342 ± 0,005 (UI/mL) không có sự khác biệt nhiều hơn 5% so với môi trường dự đoán là 2,254 UI/mL. So sánh với các báo cáo trước

đây, nghiên cứu của Zhi Cai và cộng sự ghi nhận hoạt tính cellulase từ chủng *B. velezensis* Z2.6 đạt 3,03 UI/mL; trong khi chủng ASN-1 ghi nhận 2,42 UI/mL²⁹. Một trùng hợp ngẫu nhiên là trong các nghiên cứu trên và khảo sát này, hoạt tính enzyme được ghi nhận sau quá trình tối ưu hóa đều xấp xỉ gấp 3 lần so với trước tối ưu.

Kết quả khảo sát đã xác định chủng *B. velezensis* một chủng vi khuẩn thích hợp sản xuất cellulase trên quy mô công nghiệp với ưu thế thành phần môi trường chi phí tiết kiệm cùng thời gian tăng trưởng nhanh, đặc biệt quan trọng là hoạt tính cellulase ghi nhận ở mức cao.

Bảng 3: Giá trị thống kê của mô hình trong thiết kế Box - Behnken

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F- value	p- value	
Model	7,01	9	0,7789	80,75	< 0,0001	Có ý nghĩa thống kê
A (Glucose)	0,0642	1	0,0642	6,65	0,0495	
B (Tryptone)	0,0979	1	0,0979	10,15	0,0244	
C (CMC)	1,6	1	1,6	165,39	< 0,0001	
AB	0,0044	1	0,0044	0,455	0,5299	
AC	0,2294	1	0,2294	23,78	0,0046	
BC	0,0054	1	0,0054	0,5621	0,4872	
A ²	1,22	1	1,22	126,53	< 0,0001	
B ²	3,97	1	3,97	411,58	< 0,0001	
C ²	0,3406	1	0,3406	35,31	0,0019	
Residual	0,0482	5	0,0096			
Lack of Fit	0,0435	3	0,0145	6,07	0,1446	Không có ý nghĩa thống kê
Pure Error	0,0048	2	0,0024			
Cor Total	7,06	14				



Bảng 4: Kết quả thu nhận hoạt tính CMCase từ môi trường dự đoán và môi trường thực nghiệm

Kết quả	Nồng độ glucose (%)	Nồng độ tryptone (%)	Nồng độ CMC (%)	Hoạt tính CMCase (UI/mL)
Môi trường dự đoán	0,397	1,087	0,509	2,254
Môi trường thực nghiệm	0,397	1,087	0,509	2,342 ± 0,005

KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn N9 cho kết quả vòng phân giải cao nhất (13 mm) trong các chủng vi khuẩn được phân lập. Sau khi định danh, xác định chủng vi khuẩn là *Bacillus velezensis* dựa trên phân tích trình tự gene 16S rRNA sau khi so sánh với NCBI. Chủng *B. velezensis* thu nhận cellulase thích hợp tăng trưởng trong điều kiện pH 5 ban đầu, mật độ giống là $1,5 \times 10^7$ CFU/mL (nồng độ cuối), 37°C, tốc độ lắc

200 rpm trong 15 giờ. Khảo sát môi trường tối ưu trong điều kiện nuôi cấy trên ghi nhận ở môi trường có thành phần bao gồm glucose 0,397%, tryptone 1,087%, CMC 0,509% thì hoạt tính CMCase đạt kết quả cao nhất là $2,342 \pm 0,005$ (UI/mL), tăng khoảng 2,8 lần so với trước khi tối ưu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG-HCM thông qua đề tài mã số T2021-16. Tác giả trân trọng cảm ơn.

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả đồng ý không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Nguyễn Tiến Dũng thực hiện các thí nghiệm, thu thập, xử lý các dữ liệu và viết bản thảo.

Trần Quốc Tuấn định hướng của nghiên cứu, góp phần thảo luận các kết quả của nghiên cứu và hoàn chỉnh bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ejaz U, Sohail M, Ghanemi A. Cellulases: From bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*. 2021;6(3):44. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>.
- Siqueira JGW, et al. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: a review. *Biomass and Bioenergy*. 2020;132:105419. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>.
- Singhania RR, et al. Cellulases. In *Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier. 2017;p. 73–101.
- Liu L, et al. Diversity of cellulolytic microorganisms and microbial cellulases. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2021;163:105277. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105277>.
- Mafa MS, Pletschke BJ, Malgas S. Defining the frontiers of synergism between cellulolytic enzymes for improved hydrolysis of lignocellulosic feedstocks. *Catalysts*. 2021;11(11):1343. Available from: <https://doi.org/10.3390/catal11111343>.
- Singh A, et al. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*. 2021;14:100652. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>.
- Malik WA, Javed S. Biochemical characterization of cellulase from *Bacillus subtilis* strain and its effect on digestibility and structural modifications of lignocellulose rich biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:800265. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.800265>.
- Pramanik SK, et al. Fermentation optimization of cellulase production from sugarcane bagasse by *Bacillus pseudomycoides* and molecular modeling study of cellulase. *Current Research in Microbial Sciences*. 2021;2:100013. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2020.100013>.
- Yang G, et al. A novel thermostable cellulase-producing *Bacillus licheniformis* A5 acts synergistically with *Bacillus subtilis* B2 to improve degradation of Chinese distillers' grains. *Biore-source Technology*. 2021;325:124729. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124729>.
- Ruiz-Garcia C, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55(1):191–195. Available from: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63310-0>.
- Rabbee MF, et al. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*. 2019;24(6):1046. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>.
- Ye M, et al. Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. *ACS Chemical Biology*. 2018;13(3):500–505. Available from: <https://doi.org/10.1021/acschembio.7b00874>.
- Tiên HTC, Thế HV. Phân lập và định danh một số chủng *Bacillus* spp. có hoạt tính cao trong tăng đất mật được thu thập từ tỉnh Bình Thuận, Tạp chí Khoa học Đại học Công Thương. Tạp chí Khoa học Đại học Công Thương. 2019;18(2):48–62.
- Wita A, et al. The influence of temperature and nitrogen source on cellulolytic potential of microbiota isolated from natural environment. *Polish Journal of Microbiology*. 2019;68(1):105–114. Available from: <https://doi.org/10.21307/pjm-2019-012>.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021;38(7):3022–3027. Available from: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Đại Nghiệp N. Kỹ thuật Sinh hóa, . Việt Nam: Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam; 2019.
- Maravi P, Kumar A. Isolation, screening and identification of cellulolytic bacteria from soil. *Biotechnology Journal International*. 2020;24(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.9734/bji/2020/v24i130092>.
- Narkthewan P, Makkapan W. Cellulase activity of *Bacillus velezensis* isolated from soil in a dairy farm. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019;346(1):012040. Available from: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/346/1/012040>.
- Ma L, et al. Screening of cellulolytic bacteria from rotten wood of Qinling (China) for biomass degradation and cloning of cellulases from *Bacillus methylotrophicus*. *BMC Biotechnology*. 2020;20(2):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0593-8>.
- Maharsiwi W, et al. Screening and characterization of sponge-associated bacteria from Seribu Island, Indonesia producing cellulase and laccase enzymes. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2020;21(3). Available from: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210317>.
- Li F, et al. Screening of cellulose degradation bacteria from Min pigs and optimization of its cellulase production. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2020;48:29–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.09.001>.
- Cai Z, et al. Introduction of Cellulolytic Bacterium *Bacillus velezensis* Z2.6 and Its Cellulase Production Optimization. *Microorganisms*. 2024;12(5):979. Available from: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050979>.
- Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Culture preservation and inoculum development. In: *Principles of Fermentation Technology*. Oxford, UK: Elsevier; 2017. p. 335–399.
- Djelid H, et al. Production of a halotolerant endo-1, 4- β -glucanase by a newly isolated *Bacillus velezensis* H1 on olive mill wastes without pretreatment: purification and characterization of the enzyme. *Archives of Microbiology*. 2022;204(11):681. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03300-2>.
- Thakkar A, Saraf M. Application of statistically based experimental designs to optimize cellulase production and identification of gene. *Natural Products and Bioprospecting*. 2014;4(6):341–351. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13659-014-0046-y>.
- Hungate RE. Studies on cellulose fermentation: I. The culture and physiology of an anaerobic cellulose-digesting bacterium. *Journal of Bacteriology*. 1944;48(5):499–513. Available from: <https://doi.org/10.1128/jb.48.5.499-513.1944>.
- Ramana KV, Tomar A, Singh L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2000;16:245–248. Available from: <https://doi.org/10.1023/A:1008958014270>.
- Areeshi MY. Microbial cellulase production using fruit wastes and its applications in biofuels production. *International Journal of Food Microbiology*. 2022;378:109814. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109814>.
- Nair AS, et al. Waste office paper: a potential feedstock for cellulase production by a novel strain *Bacillus velezensis* ASN1. *Waste Management*. 2018;79:491–500. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.014>.

Optimization of the medium composition for CMCase production from *Bacillus velezensis* using response surface methodology

Tien-Dung Nguyen^{1,2,*}, Tuan-Quoc Tran^{1,2}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

In the context of modern industry characterized by a circular economy, there is growing interest in research on the application of cellulases from microorganisms to convert by-products from fields and farms into highly economical substrates in the field of biofuel technology. *Bacillus velezensis* has recently emerged as a candidate with the ability to process lignocellulosic compounds with CMCase activity. This paper presents the evaluation of the physical conditions in the culture process and the optimization of the environment for cellulase collection from *B. velezensis* using the response surface method according to the Box–Behnken design suitable culture conditions for collecting CMCase activity from the *B. velezensis* strain was as follows: 8 hours of growth in LB medium, 15 hours 8 hours of growth to collect cellulase, 1.5×10^7 CFU/mL of seed density, and an initial pH5 for the induction medium. The CMCase activity obtained after optimization was 2.342 ± 0.005 (UI/mL). The medium including glucose 0.397%, tryptone 1.087%, CMC 0.509% helped to increase about 2.8 times compared to the former optimization. The obtained results would provide a foundation for further in-depth studies, such as collecting, purifying, and evaluating cellulase activity from *B. velezensis* strain with environmental agents, as well as applications of cellulase from this bacterial strain in the treatment of agricultural by-products.

Key words: *Bacillus velezensis*, cellulase, CMCase activity, response surface methodology, optimization

¹Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Tien-Dung Nguyen, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: ngdung@hcmus.edu.vn

History

- Received: 17-8-2024
- Revised: 09-12-2024
- Accepted: 16-6-2025
- Published Online: 30-9-2025

DOI :

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v9i3.1405>



Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Tien-Dung Nguyen, Tuan-Quoc Tran, **Optimization of the medium composition for CMCase production from *Bacillus velezensis* using response surface methodology.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2025; 9(3):3416-3424.