

# TUYỂN CHỌN, ĐỊNH TÊN VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN CHŨNG VI KHUẨN LACTIC SINH TỔNG HỢP CELLULASE CAO, CÓ HOẠT TÍNH PROBIOTIC

Nguyễn Thị Thu<sup>1</sup>, Trần Liên Hà<sup>2</sup>, Nguyễn Chí Dũng<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Trường Đại học Bách Khoa, Hà Nội

<sup>3</sup>Trung tâm Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm

## TÓM TẮT

Nước ta là nước nông nghiệp, lượng phế phụ phẩm tạo ra từ ngành chế biến nông sản là vô cùng lớn, phong phú và đa dạng. Sử dụng phế, phụ phẩm để làm thức ăn chăn nuôi là cách tiết kiệm nguồn năng lượng, giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường là xu hướng hiện nay. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: tuyển chọn, định tên và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp cellulase, để ứng dụng trong sản xuất thức ăn chăn nuôi. Từ ba nguồn với mười mẫu đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn lactic tạo enzym cellulase và chọn được chủng G5 sinh axit tổng cao nhất là 14,4 g/l; sinh tổng hợp cellulase: tỷ lệ vòng thủy phân so với đường kính lỗ thạch D<sub>3</sub> - d<sub>3</sub> = 22, kháng với *Samonella typhimrium* ATCC 14028 là 9, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 là 8, *Bacillus cereus* ATCC 13061 là 10, *Listeria innocua* ATCC33090 là 13. Bằng các phương pháp sinh lý, sinh hóa và 16S Rrna, kết quả định tên chủng G5 có độ tương đồng 100% với chủng *Lactobacillus casei* ATCC334. Điều kiện nuôi thu sinh khối đối với chủng *L.casei* G5: nhiệt độ = 37°C; pH 6,5; nồng độ đường 20g/l; tỷ lệ cấp giống 5%, tốc độ lắc 75 vòng/phút sau 36 giờ nuôi cấy giá trị OD (600 nm) thu được là 11,76.

**Từ khóa:** Bã đồng riêng, cellulose, lactic acid, lactobacillus casei, probiotic.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc sử dụng công nghệ vi sinh trong chế biến thức ăn chăn nuôi bằng phương pháp ủ chua phế, phụ phẩm nông nghiệp ủ với vi khuẩn lactic trong điều kiện yếm khí lên men tạo ra axit lactic làm pH giảm, kéo dài thời gian bảo quản đang được các nhà nghiên cứu quan tâm. Vi khuẩn lactic sinh tổng hợp cellulase phân giải cellulose thành các phân tử nhỏ hơn giúp gia súc dễ hấp thụ. Ngoài ra, chúng còn sinh bacteriocin ức chế sự phát triển của nấm mốc và các vi khuẩn gây bệnh, các vi sinh vật gây thối rữa. Phương pháp này giúp tận dụng được lượng phế, phụ phẩm dư thừa, giảm chi phí thức ăn chăn nuôi. Thức ăn ủ chua đó không bị tổn thất dinh dưỡng lại bổ sung các vi sinh vật có lợi cho đường tiêu hóa, giúp gia súc ít bị bệnh hơn.

Đã có một số nghiên cứu trong và ngoài nước về việc chế biến và sử dụng phế phụ phẩm nông nghiệp như rơm, lá sắn, bã sắn... làm thức ăn chăn nuôi bằng phương pháp ủ chua (Nguyen Thi Lo và cộng sự, 2000; Preston. T.R and Leng.R. A, 1987; Nguyễn

Xuân Trạch, 2004). Sử dụng các vi sinh vật ủ với phế phụ phẩm nông nghiệp, chủ yếu là vi khuẩn lactic như *L. plantarum*, *Enterococcus lactis* (Đào Thị Lượng, 2010), *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. termofil*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus lactics*... thành axit lactic và các axit hữu cơ trong điều kiện yếm khí (Lê Văn Liễu và Nguyễn Hữu Tào, 2004). Hàm lượng axit lactic tăng do quá trình sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật làm cho môi trường pH giảm gây ức chế các vi khuẩn gây thối. Ngoài ra, vi khuẩn lactic còn sinh bacteriocin ức chế toàn bộ sự phát triển của nấm mốc và các vi khuẩn gây bệnh (Đào Thị Lượng, 2010; Lê Ngọc Thùy Trang và Phạm Minh Nhựt, 2014). Sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* lên men bã sắn làm thức ăn cho gia súc (Nguyễn Minh Trí và cộng sự, 2014). Sử dụng thân cây đậu phộng (lạc) ủ chua với chế phẩm vi sinh làm thức ăn cho bò (Đoàn Đức Vũ, 2008). Tuy nhiên, để nâng cao hiệu suất và giá trị dinh dưỡng của các quá trình chế biến phế, phụ phẩm thành thức ăn gia súc thì các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh

trường, phát triển của chủng vi khuẩn là rất quan trọng.

Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: “Tuyển chọn, định tên và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp cellulase, có hoạt tính probiotic”.

## **II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

Nguồn vi sinh vật: từ các mẫu lên men: dưa muối, cà muối, bã dong riềng.

Các chủng vi sinh vật kiểm định lấy ở viện công nghệ sinh học.

Thành phần môi trường:

Môi trường là môi trường MRS (Man Rogosa Sharpe): Pepton (10g/l), cao nấm men (5g/l), cao thịt (5g/l), glucose (20g/l), amonicitrat (2g/l),  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (5g/l),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1g/l),  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,05g/l), Agar (15g/l), pH 6.5.

Môi trường CMC:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1 g/l),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (1g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5g/l) NaCl (0,003 g/l), CMC (1 g/l), Agar (2 g/l). Điều chỉnh pH 7.

Môi trường nuôi vi sinh vật kiểm định: môi trường NA: 3g/l cao thịt, 10g/l pepton, 5g/l NaCl.

Môi trường thử hoạt tính:

Môi trường thử hoạt tính lactic: MRS + 5 (g/l)  $\text{CaCO}_3$ .

Môi trường thử hoạt tính cellulase: CMC (1g/l), agar (2 g/l).

Các môi trường thanh trùng ở 110°C trong 30 phút.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

**Phương pháp phân lập và tuyển chọn vi sinh vật:**

Phân lập theo phương pháp pha loãng (Phí Thị Thanh Mai và cộng sự, 2015). Sử dụng môi trường MRS có bổ sung  $\text{CaCO}_3$  (Đào Thị Lượng, 2010).

Phương pháp tuyển chọn sử dụng các phương pháp sau: định tính axit lactic bằng

thuốc thử Uffelmann (Nguyễn Đức Lượng và cộng sự, 2003); dựa vào khả năng phân giải  $\text{CaCO}_3$  (cấy chấm điểm và đục lỗ thạch); định lượng axit theo Therner (Emanuel, V. và cộng sự, 2005); dựa vào khả năng phân giải cellulose (cấy chấm điểm và đục lỗ thạch) (Võ Văn Phước Quê, Cao Ngọc Diệp, 2011), khả năng kháng khuẩn và sinh bacteriocin (Mai Đàm Linh và cộng sự, 2007; Lê Ngọc Thùy Trang và Phạm Minh Nhựt, 2014).

#### **Phương pháp định tên**

Xác định đặc tính sinh lý, sinh hóa (Nguyễn Đức Lượng và cộng sự, 2003; Mai Đàm Linh và cộng sự, 2007).

Phương pháp định tên bằng sinh học phân tử: giải trình tự 16S rRNA.

Phân loại dựa trên giải trình tự 16S rRNA của các chủng vi khuẩn với cặp mồi 518F: 5'CCAGCAGCCGCGGTAATACG3'; 800R: 5'TACCAGGGTATCTAATCC3'(Sakiyama, Y. và cộng sự, 2009). Chu trình nhiệt: Bước 1: 95°C trong 5 phút; bước 2: 95°C trong 45 giây; bước 3: 52°C trong 1 phút; bước 4: 72°C trong 1 phút 30 giây; lặp lại từ bước 2 đến 4: 35 chu kỳ; bước 5: 72°C trong 5 phút (Khuất Hữu Thanh, 2006).

Sản phẩm PCR được tinh sạch và xác định trình tự trên máy ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. Kết quả đọc trình tự được xử lý trên phần mềm Clustal X và so sánh với trình tự 16S rRNA của các loài đã được công bố từ dữ liệu của DDBJ, EMBL và GenBank.

#### **Phương pháp khảo sát yếu tố ảnh hưởng**

Chủng tuyển chọn được nuôi trong môi trường MRS lỏng ở 37°C, trong 48 giờ và canh trường được sử dụng làm giống cho tất cả các thí nghiệm.

**Ảnh hưởng của nhiệt độ:** Sử dụng với môi trường MRS pH ban đầu 6,5; tỷ lệ cấy giống 10% và nuôi tĩnh ở các nhiệt độ: 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C.

**Ảnh hưởng của pH:** Nuôi ở nhiệt độ đã lựa chọn ở trên, tỷ lệ cấy giống 10% và pH ban

đầu ở các giá trị: 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8.

*Ảnh hưởng của nồng độ đường:* Nhiệt độ, pH đã được chọn ở trên, tỷ lệ cấy giống 10% vào môi trường MRS. Thay đổi hàm lượng đường ở các mức: 5, 10, 15, 20, 25 g/l.

*Ảnh hưởng của tỷ lệ cấy giống:* Nhiệt độ, pH, nồng độ đường được lựa chọn từ các kết quả trên. Thay đổi tỷ lệ giống: 5, 10, 15, 20, 25%.

*Ảnh hưởng của tốc độ lắc:* Với các điều kiện nhiệt độ, pH, nồng độ đường, tỷ lệ cấy giống được lựa chọn ở trên. Ta tiến hành khảo sát tốc độ lắc ở các tốc độ: 0, 25, 50, 75, 100, 125 vòng/phút.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn sinh axit

**Bảng 1. Đặc điểm của 8 chủng vi khuẩn được tuyển chọn**

Tên chủng	Lên men sinh axit		Hàm lượng axit tổng sinh ra (g/l)	Sinh tổng hợp cellulase
	Cấy chấm điểm (D/d) (mm)	Đục lỗ thạch (D <sub>1</sub> - d <sub>1</sub> ) (mm)		Đục lỗ thạch (D <sub>3</sub> - d <sub>3</sub> ) (mm)
DC1	4	4	9	8
DC2	5,5	5	12	9
C1	5	7	11,5	12
G1	5	8	11,7	20
G3	6	9	13,5	21
G4	5,5	9	12,6	24
G5	7	10	14,4	22
G6	4,5	4	10,8	9

D: đường kính vòng phân giải; d<sub>1</sub>, d<sub>3</sub>: đường kính khuẩn lạc; d<sub>2</sub>, d<sub>4</sub>: đường kính lỗ thạch.

**Bảng 2. Khả năng sinh bacteriocin của 4 chủng được chọn**

Chủng kiểm định	Chủng lactic	D <sub>1</sub> - d (mm)		D <sub>1</sub> - D <sub>2</sub> (mm)
		Không bổ sung pepsin	Bổ sung pepsin	
<i>Samonella typhimrium</i> ATCC 14028	G1	8	6	2
	G3	6	5	1
	G4	7	4	3
	G5	9	5	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	G1	6	4	2
	G3	8	7	1
	G4	5	4	1
	G5	8	13	3
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	G1	4	2	2
	G3	4	3	1
	G4	4	4	0
	G5	10	6	4
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	G1	14	9	5
	G3	13	13	0
	G4	10	9	1
	G5	13	11	2

D1: đường kính vòng kháng khuẩn khi không bổ sung pepsin (mm);

D2: đường kính vòng kháng khuẩn khi bổ sung pepsin (mm);

d: đường kính lỗ thạch (mm).

Từ ba nguồn với mười mẫu đã tuyển chọn được 8 chủng vi khuẩn lactic trên môi trường MRS, sinh tổng hợp cellulase: DC1, DC2, C1, G1, G3, G4, G5, G6. Các chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường MRS, đem thử bằng Uffelmann. Kết quả cho thấy canh trường 8 chủng vi khuẩn làm cho thuốc thử từ màu tím đen chuyển sang màu vàng rom, chứng tỏ 8 chủng vi khuẩn có khả năng sinh axit lactic.

Dùng các phương pháp tuyển chọn: dựa vào khả năng phân giải CaCO<sub>3</sub> (cây chấu điểm và đục lỗ thạch); định lượng axit; dựa vào khả năng phân giải cellulose (đục lỗ thạch) (bảng 1), ta chọn được 4 chủng: G1, G3, G4, G5 có tỷ lệ vòng phân giải cao nhất. Chọn chủng sinh bacteriocin cao nhất (bảng 2). Ta chọn được

chủng G5 sinh axit tổng cao nhất là 14,4 g/l; D/d = 7, D<sub>1</sub> - d<sub>1</sub> = 10; sinh tổng hợp cellulase tốt D<sub>3</sub> - d<sub>3</sub> = 22; sinh bacteriocin tốt nhất, kích thước vòng kháng (D<sub>4</sub> - d<sub>4</sub>) đối với *Samonella typhimrium* ATCC 14028 là 9, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 là 8, *Bacillus cereus* ATCC 13061 là 10, *Listeria innocua* ATCC 33090 là 13.

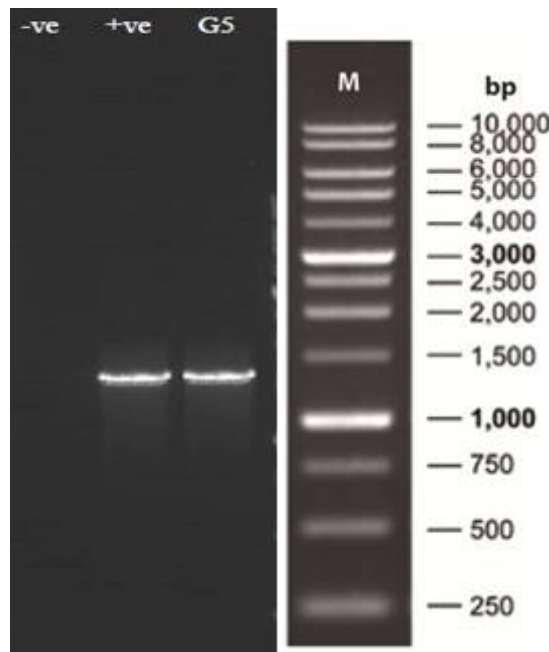
Từ các phương pháp tuyển chọn trên, chúng tôi lựa chọn chủng G5 để tiến hành định danh bằng phương pháp sinh học phân tử.

**3.2. Định tên bằng phương pháp sinh học phân tử**

Tiến hành quan sát đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng G5. Kết quả thể hiện ở bảng 3.

**Bảng 3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa chủng G5**

Chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Gram	Tạo bào tử	Khả năng axit hóa môi trường	Catalase	Hemicellulase	Sinh khí
G5	Trắng sữa, khuẩn lạc to, tròn, mặt nhẵn	Trực khuẩn	+	-	+	-	+	-



**Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm sau PCR**

Từ hình 1 ta thấy đã xuất hiện vạch trên bản điện di xuất hiện 1 vạch, điều đó thể hiện mẫu

sản phẩm sau PCR là đồng nhất và có kích thước là 1400bp.

Tiến hành chạy trên chương trình Blast® để xem mức độ tương đồng với các chủng

trong ngân hàng gen ta thu được kết quả trong hình 2.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus casei ATCC 334 strain ATCC 334 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2500	2500	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_075032.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus paracasei subsp. tolerans strain NBRC 15906 16S ribosomal RNA gene, partial sequen</a>	2489	2489	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_041054.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus paracasei 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2488	2523	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_121787.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus paracasei strain R094 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2488	2488	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_025880.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus paracasei strain NBRC 15889 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2484	2484	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_113337.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus casei strain ATCC 393 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2441	2441	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_041893.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus zeae strain RIA 482 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2435	2435	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_037122.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus casei strain NBRC 15883 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2432	2432	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_113333.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus paracasei strain ATCC 25302 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2430	2430	97%	0.0	99%	<a href="#">NR_117987.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus casei strain BCRC10697 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2421	2421	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_115322.1</a>

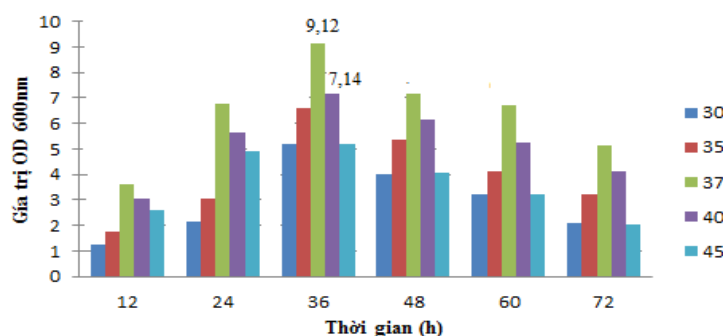
Hình 2. Các chủng có độ tương đồng cao với chủng G5

DNA hệ gen của chủng G5 được tách chiết và đoạn gen mã hóa cho 16S rRNA được khuếch đại nhờ phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 518F/800R. Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của G5 cho thấy đoạn gen gồm 1400 bp và trình tự này được so sánh với các gen 16S rRNA vi khuẩn trên Genbank với phần mềm Blastn. Kết quả cho thấy đoạn gen 16S rRNA của chủng G5 có độ tương đồng đến 100% với chủng *Lactobacillus casei* ATCC334. Chủng G5 có tên *Lactobacillus casei* G5. Theo một nghiên cứu khác, vi khuẩn lactic sinh tổng hợp cellulase, hoạt tính enzyme cellulase được thể hiện qua tỷ lệ vòng thủy phân và đường kính lỗ thạch cao nhất là

12. Kháng với *M. luteus* từ 2 - 6 mm, *E. coli* từ 8 - 12 mm, *Samonella typhi* từ 3 - 6 mm, *Shigella flexneri* 10 - 12 mm. 2 chủng vi khuẩn lactic cũng sinh tổng hợp cellulase là *Lactobacillus plantarum* và *Enterococcus lactics* (Đào Thị Lượng và cộng sự, 2010).

### 3.3. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển chủng G5

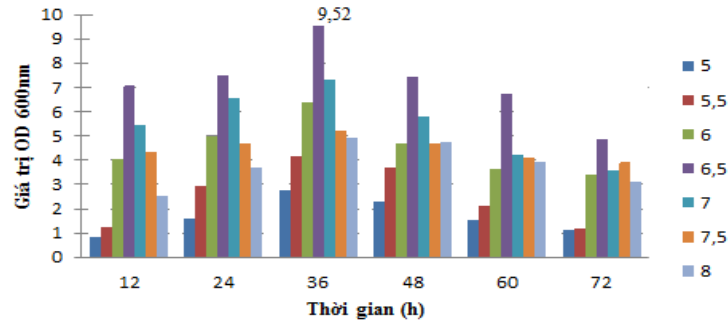
*Ảnh hưởng của nhiệt độ:* Kết quả ở hình 3 cho thấy rằng ở nhiệt độ 37°C, pH ban đầu là 6,5 và sau 36 giờ nuôi cấy, chủng đạt sinh khối cao nhất có giá trị OD<sub>600nm</sub> là 9,12. Ở nhiệt độ 40°C, giá trị OD<sub>600nm</sub> là 7,14 thấp hơn so với nhiệt độ 37°C. Chọn nhiệt độ 37°C cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng

*Ảnh hưởng của pH:* Kết quả cho thấy ở pH ban đầu 6,5 chủng sinh trưởng và phát triển tốt nhất, giá trị OD<sub>600nm</sub> là 9,52 sau 36 giờ nuôi cấy (hình 4). Khi pH xuống 5 giá trị OD tại

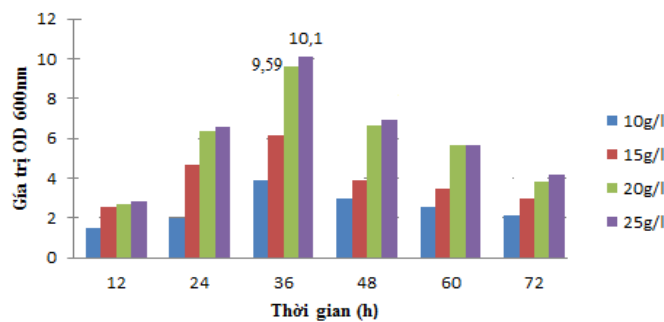
600 nm chỉ đạt 2,79. Khi môi trường kiềm tại pH 8 giá trị OD tại 600 nm đạt 4,95. Vì vậy, chọn pH 6,5 cho các nghiên cứu tiếp theo.



**Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng**

*Ảnh của nồng độ đường:* Kết quả cho thấy nồng độ đường ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng. Ở nồng độ đường 20 g/l cho giá trị OD 600 nm là 9,59 tại 36 giờ. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ đường lên 25g/l

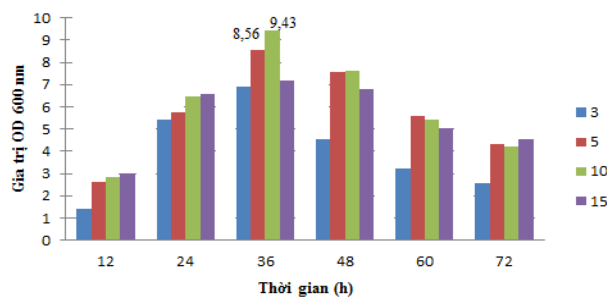
thì giá trị OD 600 nm đạt 10,10 tại 36 giờ, tức là tăng 1,05 lần, tăng không đáng kể so với ở nồng độ đường 20g/l. Vì vậy chọn nồng độ đường 20g/l cho các nghiên cứu tiếp theo.



**Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ đường**

*Ảnh hưởng của tỷ lệ cấy giống:* Ở hình 6 cho ta thấy tỷ lệ cấy giống 10% cho giá trị OD ở 600 nm cao nhất là 9,43 sau 36 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, giá trị OD ở tỷ lệ cấy giống 10%

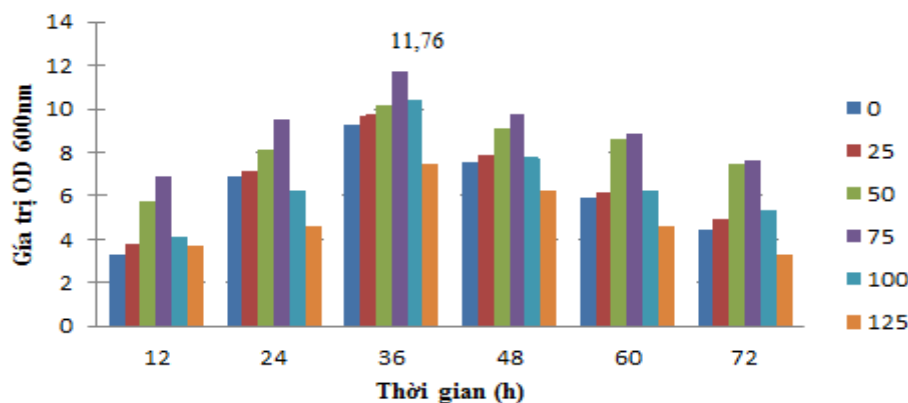
cao không đáng kể so với tỷ lệ cấy giống 5% là 8,56 điều này là không kinh tế. Vì vậy, chọn tỷ lệ cấy giống 5% cho các nghiên cứu tiếp theo.



**Hình 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ cấy giống đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng**

Ảnh hưởng của tốc độ lắc: Hình 7 cho ta thấy, giá trị OD thấp nhất ở tốc độ lắc 25 và 125 vòng/phút. Giá trị OD cao nhất ở tốc độ

lắc 75 vòng/phút ở 36 giờ đạt 11,76. Ta tiến hành chọn tốc độ lắc 75 vòng/phút cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 7. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng

#### IV. KẾT LUẬN

Từ 3 nguồn với 10 mẫu đã tuyển chọn được 8 chủng vi khuẩn có khả năng lên men axit lactic, sinh tổng hợp cellulase. Qua các bước tuyển chọn thì chủng G5 sinh axit cao nhất, sinh tổng hợp cellulase tốt, sinh bacteriocin tốt nhất. G5 là trực khuẩn gram (+), không tạo bào tử, catalase âm tính, hemicellulase dương tính, không sinh khí. Định tên theo phương pháp sinh học phân tử 16S rRNA chủng G5 có độ tương đồng 100% với chủng *Lactobacillus casei* ATCC334. Chủng G5 là chủng *Lactobacillus casei* G5. Điều kiện để nuôi chủng G5 tốt nhất tại 37°C; pH 6,5; nồng độ đường 20g/l; tỷ lệ cấp giống 5%, tốc độ lắc 75 vòng/phút sau 36 giờ nuôi cấy giá trị OD thu được là 11,76.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đào Thị Lượng, Nguyễn Thị Anh Đào, Nguyễn Thị Kim Quy, Trần Thị Lệ Quyên, Dương Văn Hợp, Trần Quốc Việt, Ninh Thị Len, Bùi Thị Thu Huyền (2010). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic dùng trong chế biến và bảo quản thức ăn thô xanh và phụ phẩm nông nghiệp cho gia súc nhai. *Di truyền học và ứng dụng* - Chuyên san Công nghệ sinh học, số 6/2010.
- Đoàn Đức Vũ, Đặng Phước Chung, Nguyễn Thị Hiệp (2008). Nghiên cứu kỹ thuật ủ chua than đậu phộng (lạc) làm thức ăn cho bò sữa, bò thịt. *Tạp chí*

*Chăn nuôi*, số 6, tr.21-25.

- Emanuel, V., Adrian, V., Ovidiu, P., Gheorghe, C. (2005). Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. *African Journal of Biotechnology* 4(5): 403-408.
- Khuất Hữu Thanh (2006). *Kỹ thuật gen*: Nguyên lý và ứng dụng. NXB. Khoa học và Kỹ thuật.
- Kozaki M., Uchimura T. & Okada S. (1992). *Experimental manual of lactic acid bacteria*. Asakurasyoten, Tokyo, Japan.
- Lê Ngọc Thùy Trang, Phạm Minh Nhật (2014). Phân lập và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sản sinh chất kháng khuẩn của *Lactobacillus plantarum*. *Tạp chí sinh học*, 36, tr.97-106.
- Lê Văn Liễn, Nguyễn Hữu Tào (2004). *Kỹ thuật chế biến bảo quản phụ phẩm nông nghiệp và thủy sản làm thức ăn chăn nuôi*. NXB. Lao động xã hội.
- Mai Đàm Linh, ĐMP, Phạm Thị Tuyết, Kiều Hữu Ảnh, Nguyễn Thị Giang (2007). Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn lactic phân lập trên địa bàn Hà Nội. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia HN, Chuyên san Khoa học tự nhiên và công nghệ*, 24: tr. 221-226.
- Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền và Nguyễn Ánh Tuyết (2003). *Thí nghiệm công nghệ sinh học*, tập 2, thí nghiệm vi sinh vật học. NXB. Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, trang 72-73, 414-434, 450-461.
- Nguyễn Minh Trí, Mai Thị Tuyết Nga, Hồ Thúy Diễm (2014). Tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic khử cyanua tổng thích hợp trên môi trường bã sắn, số 2, tr.67-72.
- Nguyen Thi Lo, Nguyen Thi Hoa Ly, Vo Thi Kim Thanh and Hoang Nghia Duyet (2000). *Ensiling*



*Techniques and evaluation of cassava leaf silage for Mong Cai Sow in central Viet Nam, Sustainable Livestock production on local feed resources*, Ho Chi Minh City, Viet Nam Famury, 18-20 thực hiện, P 25.

12. Nguyễn Xuân Trạch (2004). Ảnh hưởng của xử lý kiềm hóa bằng vôi hoặc ure đến lượng ăn vào tỷ lệ tiêu hóa rơm. *Tạp chí Chăn nuôi*, số 11, tr. 16-18.

13. Phí Thị Thanh Mai, Trần Liên Hà, Nguyễn Thanh Hằng, Nguyễn Thị Thùy (2015). Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng lên men sản xuất axit lactic từ xyloza. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp*, số 10, tr. 91-94.

14. Preston. T.R and Leng.R. A (1987). Matching ruminant production systems with available resources in

the tropics and sub-tropics. Penambul Books Ltd, Mmidale. NSW. Australia, pp. 25-37.

15. Sakiyama, Y., Nguyen, K. N. T., Nguyen, M. G., Miyadoh, S., Duong, V. H. & Ando, K (2009). *Kineosporia babensis* sp. nov., isolated from plant litter in Vietnam. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59: 550-554.

16. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.

17. Võ Văn Phước Quê, Cao Ngọc Điệp (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose. *Tạp chí Khoa học*, ĐH Cần Thơ, 18<sup>a</sup>, tr.177-184.

## **SELECTION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA, WHICH PRODUCE CELLULASE TO APPLICATION FOR ANIMAL FEED PRODUCTION**

**Nguyen Thi Thu<sup>1</sup>, Tran Lien Ha<sup>2</sup>, Nguyen Chi Dung<sup>3</sup>**

<sup>1,2</sup>*Hanoi University of Science and Technology*

<sup>3</sup>*Center of Biotechnology and Food Technology*

### **SUMMARY**

At present, the area of cultivating edible canna is 30,000 hectares in the whole country, with an annual output of about 300,000 tons of fresh tubers. The starch producing process from edible canna tubers creates a large amount of canna dregs of about 70 to 75%. Using the brewed edible canna paste as animal feed is a way to save energy and solve the problem of environmental pollution, which is the current trend. Therefore, we had done research: “selection, identification and characterization of lactic acid bacteria, which produce cellulase and application for animal feed production”. Among them, G5 was selected because it has produced the highest total acid of 14.4 g/l; cellulase (D - d4 = 22), and bacteriocin inhibition growth of *Salmonella typhimrium* ATCC 14028 is 9, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 is 8, *Bacillus cereus* ATCC 13061 is 10, *Listeria innocua* ATCC 33090 is 13. G5 was identified *Lactobacillus casei* by physiological and 16S rRNA. The condition for biomass production: temperature of 37°C; pH 6.5; sugar concentration of 20 g/l; inoculum of 5%, shaking rate of 75 rpm/minute after 36 hours of culturing OD value (600 nm) was 11.76.

**Keywords:** Edible canna dregs, cellulose, Lactic acid, *Lactobacillus casei*, probiotic.

**Ngày nhận bài** : 18/4/2017

**Ngày phản biện** : 10/5/2017

**Ngày quyết định đăng** : 17/5/2017