

TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH TÊN CHỦNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG SINH AXIT LACTIC, CELLULASE, XYLANASE, AMYLASE ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ BÃ DONG RIÊNG LÀM THỨC ĂN CHĂN NUÔI

Nguyễn Thị Hồng Hà^{1*}, Nguyễn Ngọc Huyền¹, Nguyễn Thị Hương Trà¹, Lê Thị Trang¹,
Vũ Thu Diễm¹, Ngô Thị Thanh Hương¹, Nguyễn Trọng Uyên², Lê Khánh Linh³, Nguyễn Văn Hiếu⁴

¹ Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch

² Sở Nông nghiệp và PTNT tỉnh Bắc Kạn

³ Trường Đại học Curtin, Tây Úc

⁴ Viện Công nghệ sinh học

*Email: ngthongha77@gmail.com

TÓM TẮT

Bã dong riêng là sản phẩm phụ của quá trình chế biến tinh bột dong, phụ phẩm này chiếm khoảng 80% khối lượng củ tươi. Việc tận thu bã dong riêng làm thức ăn gia súc là giải pháp có tính thực tế cao trong hoàn cảnh nguồn thức ăn thô xanh cho gia súc đang còn thiếu, đồng thời gia tăng hiệu quả kinh tế và giảm tình trạng ô nhiễm môi trường ở các làng nghề chế biến tinh bột dong. Mục đích của nghiên cứu này là tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh axit lactic cao, các enzym ngoại bào (cellulase, xylanase, amylase) và có hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh để ứng dụng cho xử lý bã dong riêng làm thức ăn gia súc. Kết quả cho thấy, trong số 20 chủng vi khuẩn lactic thử nghiệm đã tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn lactic kí hiệu là: *L. DM6*; *L. DR9* và *L. DR27* có khả năng sinh axit lactic, sinh enzym ngoại bào và kháng khuẩn ở mức cao: Hàm lượng axit lactic đạt 14,3; 14,8; 15,4 mg/ml; hoạt tính amylase thể hiện qua đường kính vòng phân giải đạt 18, 20, 25 mm, xylanase đạt 23, 20, 35 mm, cellulose đạt 20, 22, 30 mm; hoạt tính kháng khuẩn với *E. coli* là 13, 16, 21 mm, với *B. cereus* là 7, 11 và 13 mm và *S. typhi* là 12, 10 và 17 mm. Định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA, chủng *L. DM6* là loài *Lactiplantibacillus plantarum*, chủng *L. DR9* được xác định là *Lactobacillus acidophilus* và chủng *L. DR27* xác định là loài *Lactiplantibacillus plantarum*.

Từ khóa: Bã dong riêng, cellulose, hemicellulose, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đối với các làng nghề sản xuất tinh bột dong riêng, ngoài lượng nước thải hữu cơ thì lượng bã thải mỗi năm chiếm hàng ngàn tấn. Chỉ tính riêng trên địa bàn tỉnh Bắc Kạn, từ năm 2019 đến 2021, lượng nguyên liệu đầu vào và bã thải ở làng nghề khá lớn, khoảng 34.000 tấn/năm và 28.000 tấn/năm. Hiện nay, chỉ một phần nhỏ lượng bã dong riêng được người dân ủ làm phân bón theo phương pháp thủ công, còn lại phần lớn bã dong riêng chưa được xử lý thích hợp, gây ô nhiễm nguồn đất, nước... cho khu sản xuất cũng như vùng lân cận. Chế biến, bảo quản thức ăn thô xanh

bằng phương pháp lên men chua đã được áp dụng rộng rãi trên toàn thế giới. Hàng năm, hơn 200 triệu tấn thức ăn thô xanh được bảo quản bằng phương pháp này ở Tây Âu và Mỹ. Lên men chua dựa trên quá trình lên men tự nhiên nhờ các vi khuẩn lactic lên men carbohydrates hòa tan thành các axit hữu cơ, chủ yếu là axit lactic dưới điều kiện kỵ khí. Kết quả của quá trình là giảm pH, ức chế những vi khuẩn bất lợi và do đó thức ăn thô xanh được bảo quản. Nếu lên men tự nhiên, mật độ hệ vi khuẩn lactic có sẵn quá thấp, không thể chiếm ưu thế trong quá trình lên men, do đó sẽ không ngăn chặn được hoạt động của các vi sinh

vật bất lợi. Để có được thức ăn lên men chua có chất lượng tốt cần phải bổ sung các chế phẩm vi khuẩn lactic phù hợp.

Thành phần bã dong riêng gồm chủ yếu là chất xơ không hòa tan khoảng 32,3% (trong đó cellulose 8,31% và hemicellulose 23,99%) [1, 2]. Nếu khai thác hiệu quả tiềm năng nguồn nguyên liệu này sẽ góp phần giải quyết nguồn thức ăn thô xanh cho gia súc đang còn thiếu hụt, đồng thời gia tăng hiệu quả kinh tế và giảm tình trạng ô nhiễm môi trường ở các làng nghề sản xuất tinh bột dong riêng. Cho đến nay, việc sản sinh axit lactic và axit acetic từ vi khuẩn lactic đã được các nhà khoa học chứng minh là làm tăng chất lượng và tính ổn định của thức ăn ủ chua. Ngoài ra, vi khuẩn lactic còn sinh bacteriocin ức chế toàn bộ sự phát triển của nấm mốc, các vi khuẩn gây bệnh và sinh enzyme giúp cải thiện quá trình tiêu hóa và hấp thu thức ăn [3]. Nghiên cứu này trình bày kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh axit lactic, các enzyme ngoại bào và hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh, đây sẽ là tiền đề cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm lactic ứng dụng trong xử lý bã dong riêng làm thức ăn chăn nuôi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Chủng vi sinh vật

- 20 chủng vi khuẩn lactic nằm trong bộ sưu tập giống của Bộ môn Nghiên cứu công nghệ sinh học sau thu hoạch, Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch.

- Các vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* do Viện Vệ sinh dịch tễ cung cấp.

2.1.2. Hoá chất

Tất cả hóa chất đều ở mức độ phân tích. Cao thịt, pepton, cao nấm men, xylan, Tris-HCl, CMC, tinh bột, lugol của Trung Quốc và Đức. Bộ kit chiết tách, làm sạch ADN tổng số và bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR bằng cột Thermo Fisher của Mỹ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng sinh axit lactic

Chủng vi khuẩn lactic được nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng ở nhiệt độ 37°C, tốc độ lắc 75 vòng/phút trong 48 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm

ở 4°C, 10.000 vòng trong 10 phút, loại cặn thu dịch nổi để kiểm tra hàm lượng axit lactic sản sinh từ mỗi chủng. Phương pháp định lượng axit sinh ra trong quá trình lên men bằng phương pháp chuẩn độ NaOH [4].

2.2.2. Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào

Tiến hành theo phương pháp của Kasana và cs (2008) [5] có cải tiến: Xác định khả năng sinh một số enzyme ngoại bào cellulase, amylase và xylanase sử dụng phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường bổ sung cơ chất tương ứng CMC, tinh bột, xylan đặc hiệu với 3 loại enzyme trên. Các chủng vi khuẩn lactic được nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng. Sau 48 giờ nuôi ở 37°C, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C. Bỏ cặn, thu dịch nổi. Dùng nút khoan đục lỗ thạch trên đĩa petri của 3 loại môi trường: Môi trường tinh bột (thử hoạt tính enzyme amylase), môi trường CMC (thử hoạt tính enzyme cellulase), môi trường xylan (thử hoạt tính enzyme xylanase). Với mỗi chủng vi khuẩn lactic, tiến hành nhỏ 0,1 ml dịch ly tâm đã thu vào lỗ thạch. Để đĩa thạch trong tủ lạnh ở 4°C trong 2 giờ cho dịch ly tâm khuếch tán đều. Sau đó, ủ ở 37°C trong 48 giờ để dịch trong lỗ thạch thủy phân cơ chất. Sau thời gian trên, đĩa thạch được nhuộm màu bằng dung dịch Lugol 1%. Hoạt tính của enzyme được đo bằng đường kính vòng phân giải cơ chất xung quanh lỗ thạch, D-d. Trong đó: D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính lỗ thạch (mm).

2.2.3. Khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh

Khả năng kháng các vi khuẩn gây bệnh (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*) của vi khuẩn lactic được xác định theo phương pháp khuếch tán thạch của Herreros và cs (2005) [6] có cải tiến. Các chủng vi khuẩn lactic được nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng ở 37°C, 24 giờ. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Thu dịch nổi và điều chỉnh pH về 6,5 bằng NaOH 1N.

Các chủng vi khuẩn gây bệnh được nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng ở 37°C, trong 24 giờ. Sau đó bổ sung 30 µL dung dịch mỗi chủng vi khuẩn gây bệnh vào môi trường LB agar, trang đều dịch trên bề mặt thạch bằng que trang. Dùng nút khoan, đục lỗ thạch trên đĩa petri. Nhỏ 80 µL

dịch ly tâm của các chủng vi khuẩn lactic đã được chỉnh pH 6,5 vào các lỗ thạch, giữ ở nhiệt độ 4°C trong 2 - 4 giờ. Sau đó, ủ ở nhiệt độ 37°C sau 24 giờ đọc kết quả. Hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh của vi khuẩn lactic được đánh giá gián tiếp bằng đường kính vòng ức chế vi khuẩn gây bệnh nuôi cấy trên môi trường LB agar: D-d. Trong đó: D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính lỗ thạch (mm).

2.2.4. Phân loại vi khuẩn lactic bằng phân tích trình tự gen mã hóa 16S rARN

- Tách chiết ADN tổng số

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 37°C, lắc 75 vòng/phút trong 48 giờ. Hút 1 mL dịch lên men vào ống eppendorf 1,5 mL. Ly tâm 10.000 vòng/10 phút ở 4°C, thu sinh khối tế bào. Rửa sinh khối bằng nước ion, ly tâm 10.000 vòng/10 phút ở 4°C, thu cặn. Hòa lại cặn vào 0,5 mL đệm TE và SDS, ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng; bổ sung lysozym 65 µL/mL, ủ 65°C trong 30 phút; thêm proteinase K (20 mg/mL) ủ ở 56°C trong 2 giờ; thêm chloroform: isoamylalcohol (24: 1) với tỷ lệ 1: 1, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C; thu phần dịch nổi. Bổ sung isopropanol với tỷ lệ 1: 1, ủ ở 4°C qua đêm. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa. Hòa tan kết tủa trong 500 µL TE. Loại RNA bằng cách thêm RNase, ủ ở 37°C qua đêm. Bổ sung chloroform : isomylalcohol (24: 1) với tỷ lệ 1: 1 về thể tích, ly tâm ở vận tốc 12.000 vòng/phút, 15 phút ở 4°C. Thu phần dịch nổi, bổ sung ethanol 100% (giữ lạnh) tỷ lệ 1: 1. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu kết tủa sau đó rửa sạch tủa bằng ethanol 80%. Làm khô ADN. Hòa trong 100 µL TE và bảo quản ở 4°C.

- Nhân gen bằng kỹ thuật PCR

Thành phần của phản ứng PCR với thể tích là 25 µL gồm: 2,5 mM dNTPs (fermentas) 2,5 µL; 10X Taq Buffer 2,5 µL; 27F (forward primer) 1 µL; 1492R (reverse primers) 1 µL; ADN template 2 µL; Taq (5 Unit/µl) 0,5 µL; H₂O 12,5 µL. Trình tự mỗi xuôi mỗi ngược như sau: 1492R 5'-'GGTTACCTTGTTACGACTT-3'. 27F 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: Chu kỳ đầu biến tính nhiệt ở 94°C trong vòng 5 phút; các chu kỳ sau

biến tính 94°C trong 1 phút; bắt cặp mỗi ở 55°C trong 1 phút; kéo dài mạch ở 72°C trong 1 phút (thực hiện 30 chu kỳ). Chu kỳ cuối thực hiện ở 72°C trong 7 phút; hạ nhiệt độ xuống 4°C. Mẫu dịch PCR được chạy điện di.

- Giải trình tự và phân loại

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit ADN bằng cột Thermo Fisher, Mỹ và giải trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (Mỹ) tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, kết quả thu được phân tích, so sánh với trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank và lập cây di truyền với phần mềm CLC DNA Worbench 8.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định khả năng sinh axit lactic của các chủng vi khuẩn lactic nghiên cứu

Bảng 1. Khả năng sinh axit của các chủng vi khuẩn lactic nghiên cứu

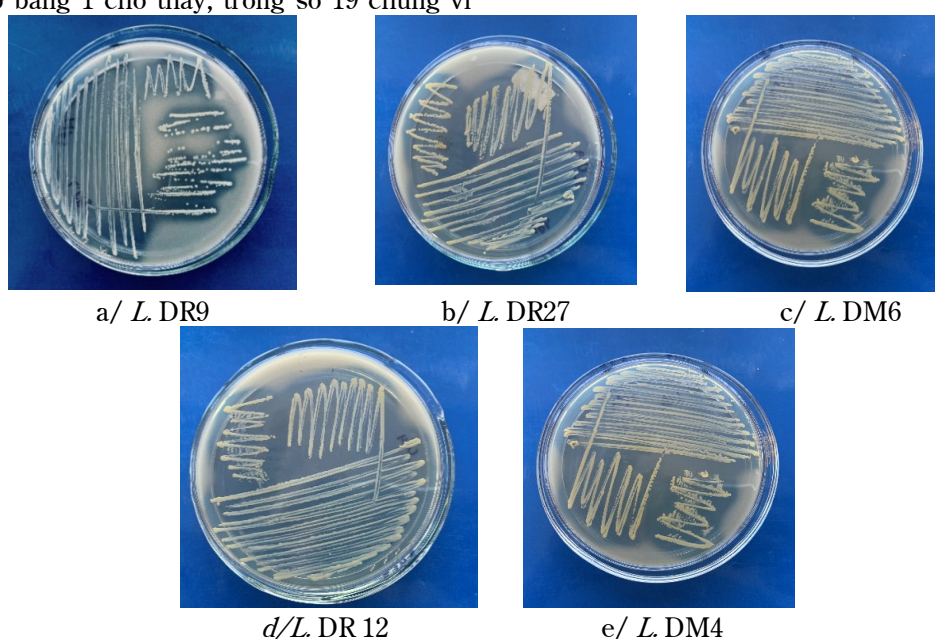
STT	Tên chủng	Hàm lượng axit lactic (mg/mL)
1	<i>L. plantarum</i> CM3	12,7
2	<i>L. DR1</i>	8,5
3	<i>L. DR2</i>	10,2
4	<i>L. DR3</i>	10,9
5	<i>L. LP5</i>	11,4
6	<i>L. DM4</i>	13,8
7	<i>L. DR4</i>	10,8
8	<i>L. DR5</i>	12,4
9	<i>L. DR6</i>	7,7
10	<i>L. DR7</i>	11,9
11	<i>L. DR8</i>	10,5
12	<i>L. DR9</i>	14,8
13	<i>L. DR10</i>	12,2
14	<i>L. DR11</i>	11,0
15	<i>L. DR12</i>	14,0
16	<i>L. DR13</i>	12,5
17	<i>L. DM8</i>	9,1
18	<i>L. DR27</i>	15,4
19	<i>L. DM 6</i>	14,3
20	<i>L. CP 12</i>	11,1

Quá trình ủ chua muốn đạt hiệu quả tốt, cần phải lựa chọn các chủng vi sinh vật khởi động có

điều kiện sau: Chúng có khả năng sinh axit hữu cơ cao, chúng vi sinh vật phải có hoạt tính sinh học (khả năng sinh phức hệ enzym phân hủy các hợp chất hữu cơ cao); có khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh và sinh trưởng tốt trong điều kiện của đông ủ, cạnh tranh được với vi sinh vật có sẵn trong đông ủ.

Nhằm mục đích lựa chọn chủng giống khởi động cho chế biến thức ăn gia súc ủ chua, đã đánh giá khả năng sinh axit lactic của 20 chủng vi khuẩn lactic có trong bộ sưu tập giống của Bộ môn Nghiên cứu công nghệ sinh học sau thu hoạch. Kết quả ở bảng 1 cho thấy, trong số 19 chủng vi

khuẩn lactic và 01 chủng chuẩn *L. plantarum* CM3 đều có khả năng sinh axit lactic ở các mức độ khác nhau. Trong số này có 5 chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh axit lactic cao nhất, đạt từ 13,8 - 15,4 mg/ml axit lactic, 12 chủng có khả năng sinh axit lactic trung bình, từ 10,2 - 12,7 mg/ml axit lactic và 3 chủng có khả năng sinh axit lactic yếu, nhỏ hơn 10,0 mg/ml. Như vậy, trong số 20 chủng vi khuẩn lactic, đã lựa chọn 5 chủng có khả năng sinh axit lactic cao (*L. DM4*, *L. DR9*, *L. DR12*, *L. DR27*, *L. DM6*) để xác định khả năng sinh enzym ngoại bào của các chủng này.



Hình 1. Khuẩn lạc các chủng *L. DR9*, *L. DR27*, *L. DM6*, *L. DR12* và *L. DM4* trên môi trường MRS bổ sung CaCO_3

3.2. Khả năng sinh enzym ngoại bào của các chủng vi khuẩn lactic

Bảng 2. Khả năng sinh enzym ngoại bào của một số chủng vi khuẩn lactic

Kí hiệu chủng	Hoạt tính enzym (D-d, mm)		
	Amylase	Cellulase	Xylanase
<i>L. DR9</i>	20	22	20
<i>L. DR12</i>	11	18	-
<i>L. DM4</i>	-	17	21
<i>L. DR27</i>	25	30	35
<i>L. DM6</i>	18	20	23

Năm chủng vi khuẩn lactic đã được chọn lọc ở trên, tiến hành xác định hoạt tính enzym ngoại bào của dịch nuôi cấy bằng phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường có chứa các cơ chất như miêu tả ở mục 2.2.2. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, cả 5 chủng vi khuẩn lactic lựa chọn đều có khả năng sinh enzym ngoại bào, trong đó có 3 chủng: *L. DR9*, *L. DR27* và *L. DM6* có khả năng sinh cả 3 loại enzym ở mức cao, đường kính vòng phân giải cơ chất với amylase là 20, 25 và 18 mm; cellulase là 22, 30 và 20 mm; xylanase là 20, 35 và 23 mm, theo thứ tự. Kết quả nghiên cứu

của Đào Thị Lượng và cs (2010) [7] cho thấy, 7 chủng vi khuẩn lactic phân lập từ cỏ, ngô, nước dừa cả có khả năng sinh cả 3 loại enzym, đường kính vòng phân giải amylase nằm trong khoảng từ 7 - 13 mm, cellulase từ 8 - 12 mm và xylanase từ 10 - 13 mm. So sánh với kết quả nghiên cứu này thấy rằng, hoạt tính enzym của các chủng: *L. DR9*, *L. DR27* và *L. DM6* đã tuyển chọn là cao hơn.

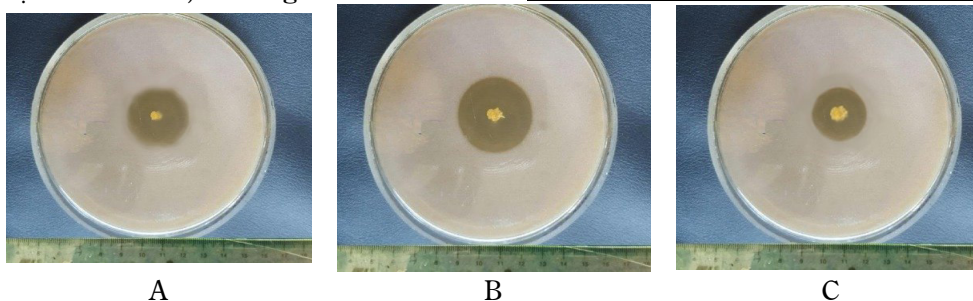
3.3. Khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh của một số chủng vi khuẩn lactic lựa chọn

Các chủng vi khuẩn lactic cần có hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh để làm giảm nguy cơ mắc các bệnh đường ruột và tăng khả năng hấp thụ các chất cho vật nuôi. Do đó, 3 chủng vi khuẩn lactic

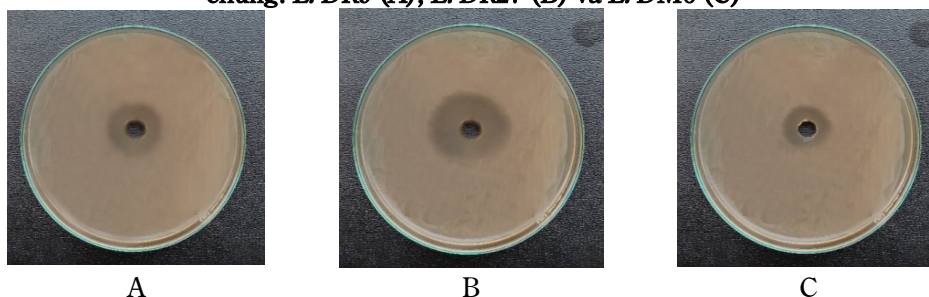
có khả năng sinh 3 loại enzym ngoại bào cao nhất tiếp tục được kiểm tra khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic với các vi khuẩn gây bệnh được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh của một số chủng vi khuẩn lactic lựa chọn

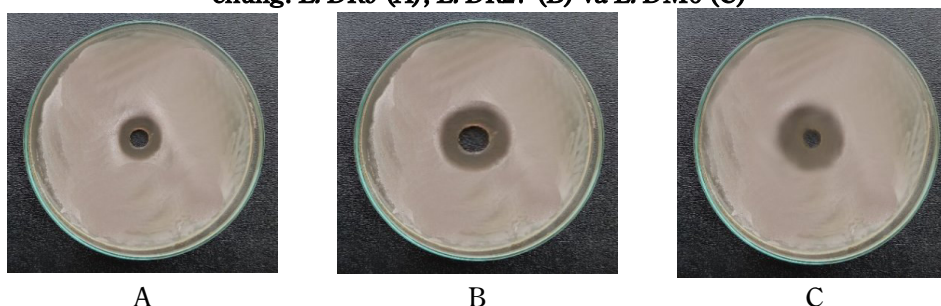
Tên chủng	Hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh (D-d, mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhi</i>
<i>L. DR9</i>	16	11	10
<i>L. DR27</i>	21	13	17
<i>L. DM6</i>	13	7	12



Hình 2. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *E. coli* của dịch lên men thu được từ 3 chủng: *L. DR9* (A), *L. DR27* (B) và *L. DM6* (C)

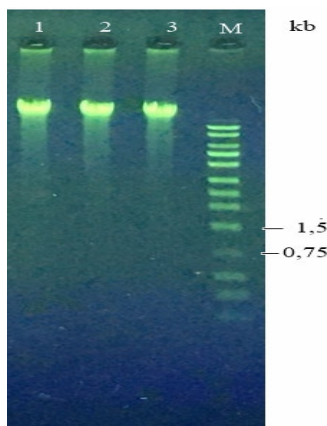


Hình 3. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *B. cereus* của dịch lên men thu được từ 3 chủng: *L. DR9* (A), *L. DR27* (B) và *L. DM6* (C)



Hình 4. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *S. typhi* của dịch lên men thu được từ 3 chủng *L. DR9* (A), *L. DR27* (B) và *L. DM6* (C)

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, cả 3 chủng vi khuẩn lactic đều có khả năng kháng lại 3 loại vi khuẩn gây bệnh *E. coli*, *B. cereus* và *S. typhi*, trong đó chủng *L. DR27* có hoạt tính ức chế mạnh nhất với các vi khuẩn gây bệnh này, thể hiện qua đường kính vòng ức chế với *E. coli* là 21 mm, *B. cereus* là 13 mm, *S. typhi* là 17 mm. Như vậy, có thể thấy ngoài khả năng sinh axit hữu cơ cao, các chủng nghiên cứu còn có khả năng sinh enzym ngoại bào, phân giải các cơ chất trong thức ăn gia súc ủ chua và có khả năng ức chế được các vi



Hình 5. ADN tổng số của các chủng: *L. DR9*, *L. DR27* và *L. DM6*
(1: Chủng *L. DM6*; 2: Chủng *L. DR9*; 3: Chủng *L. DR27* và M macker 1 kb)

Kết quả ở hình 5 cho thấy, đã tách thành công ADN tổng số của 3 chủng vi khuẩn lactic, thể hiện ở các băng chạy đậm, không tạo ra các băng phụ, điều này chứng tỏ các đoạn ADN tổng số thu được không bị đứt và gãy trong quá trình tách. Kết quả ADN thu được từ các chủng khi đo trên máy nano drop cho giá trị là 116,6 - 145,6 ng/μL, với chỉ số A260/A280 tương ứng là 1,8 - 2,1, đây là các chỉ số rất tốt cho quá trình tiếp theo, chứng tỏ sản phẩm không có sự lẫn các phân tử protein. Sản phẩm đủ yêu cầu để thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo.

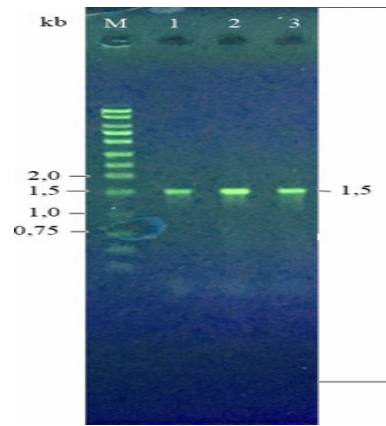
- Nhân đoạn gen ARN của các chủng vi sinh vật bằng phương pháp PCR

Từ ADN hệ gen thu được của 3 chủng: *L. DR9*, *L. DR27* và *L. DM6* được tiến hành khuếch đại nhờ phản ứng PCR sử dụng cặp mồi phổ biến 27F và 1492R. Kết quả được trình bày ở hình 6.

khuẩn gây bệnh. Từ các kết quả trên, 3 chủng: *L. DR9*, *L. DR27* và *L. DM6* được lựa chọn để định tên đến mức độ loài bằng phân tích trình tự gen mã hóa 16S rRNA.

3.4. Phân loại các chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn dựa trên phân tích trình tự gen mã hóa 16S rARN

ADN hệ gen của 3 chủng vi khuẩn nghiên cứu được tách chiết theo phương pháp ở mục 2.2.4. Kết quả được trình bày ở hình 5.



Hình 6. Sản phẩm PCR của các chủng: *L. DR9*, *L. DR27* và *L. DM6*
(1: Chủng *L. DM6*; 2: Chủng *L. DR9*; 3: Chủng *L. DR27* và M macker 1 kb)

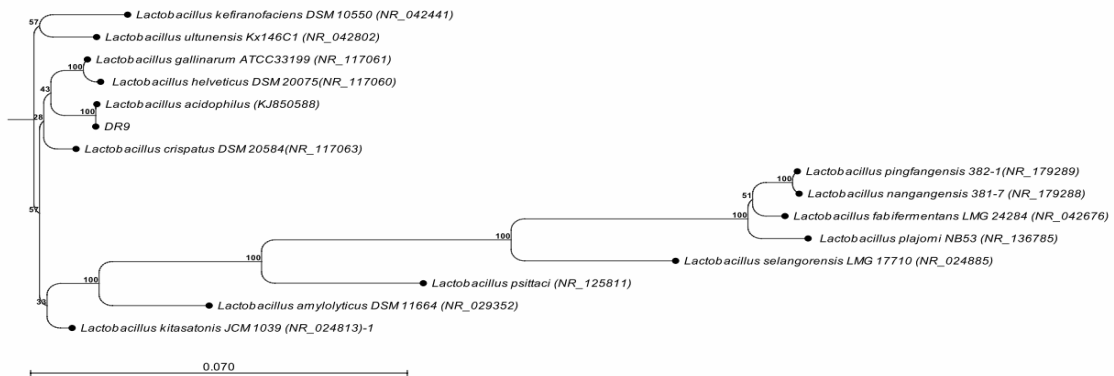
Kết quả ở hình 6 cho thấy, đoạn gen 16S rRNA của các chủng: *L. DR9*, *L. DR27* và *L. DM6* được khuếch đại thành công với sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt: Một băng sáng rõ duy nhất trên gel điện di với kích thước đoạn gen khoảng ~1,5 kb. Tiếp theo, đã tiến hành tinh sạch và giải trình tự gen sản phẩm PCR thu được.

- Giải trình tự gen và đối chiếu với cơ sở dữ liệu GenBank để phân loại các chủng vi khuẩn: *L. DR9*, *L. DR27* và *L. DM6*

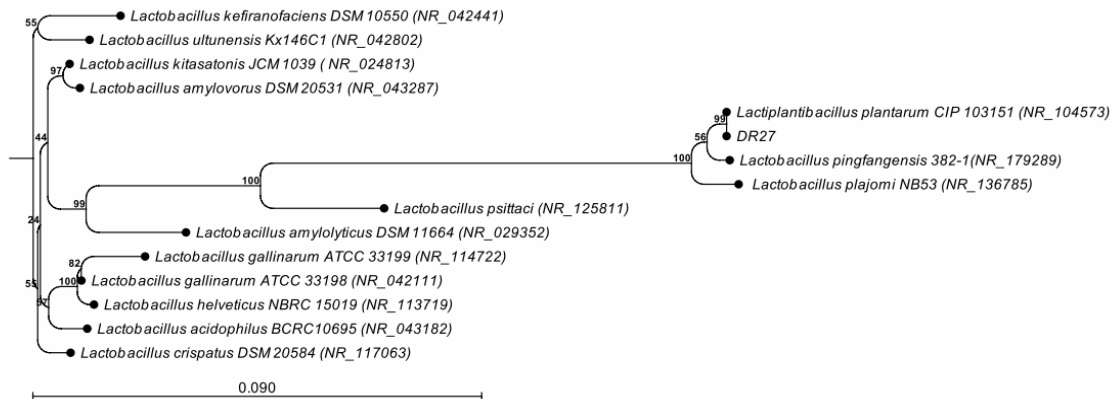
Sản phẩm PCR thu được của 3 chủng vi khuẩn lactic được tinh sạch và dùng làm khuôn trong phản ứng đọc trình tự với các mồi 27F và 1492R. Kết quả đọc trình tự được xử lý bằng phần mềm Clustal X và so sánh với ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ Blast để xác định đến tên loài.

Trình tự ADN 16S của 3 chủng nghiên cứu được xác định. Cây phả hệ được xây dựng dựa trên

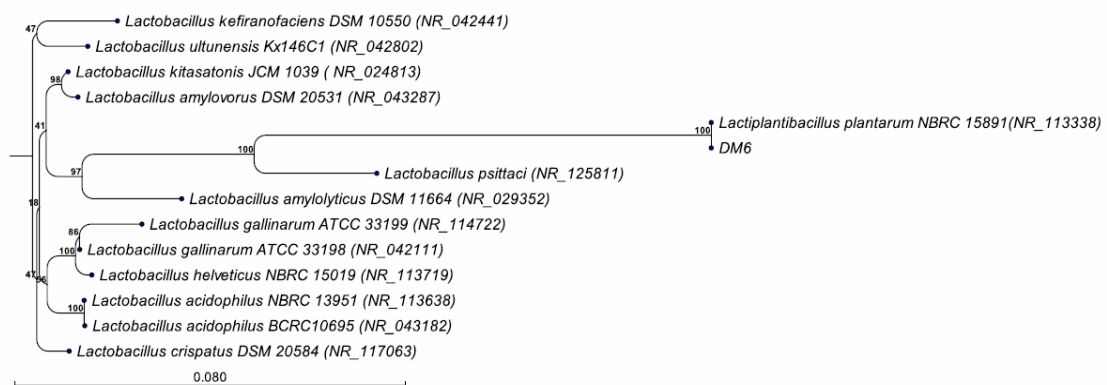
trình tự ADNr 16S trong khoảng 1,3 - 1,5 kb của các chủng nghiên cứu với các loài gần gũi nhất. Kết quả được trình bày ở hình 7, 8 và 9.



Hình 7. Cây tương đồng di truyền dựa trên trình tự gen 16S RNA chủng *L. DR9* với các chủng vi khuẩn có họ hàng gần



Hình 8. Cây tương đồng di truyền dựa trên trình tự gen 16S RNA chủng *L. DR27* với các chủng vi khuẩn có họ hàng gần



Hình 9. Cây tương đồng di truyền dựa trên trình tự gen 16S RNA chủng *L. DM6* với các chủng vi khuẩn có họ hàng gần

Kết quả so sánh trình tự đoạn gen 16S RNA của các chủng: *L. DR9*, *L. DR27* và *L. DM6* với các chủng quan hệ họ hàng gần trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank của NCBI, sử dụng phần mềm phân tích cấu trúc BLAST cho thấy:

Đoạn gen 16S RNA của chủng vi khuẩn *L. DR9* có chiều dài 1.500 bp, cây phân loại di truyền cho thấy chủng *L. DR9* nằm trên cùng một nhánh với loài *Lactobacillus acidophilus* và trình tự nucleotide có độ tương đồng cao, đạt tới >99,0% khi so sánh với đoạn gen 16S RNA tương ứng của loài *Lactobacillus acidophilus* (KJ850588). Trình tự này đã được đăng ký trên GenBank với mã số OR690353.

Đoạn gen 16S RNA của chủng vi khuẩn *L. DR27* có chiều dài 1.390 bp, cây phân loại di truyền cho thấy chủng *L. DR9* nằm trên cùng một nhánh với loài *Lactiplantibacillus plantarum* và trình tự nucleotide có độ tương đồng cao, đạt tới >99,0% khi so sánh với đoạn gen 16S RNA tương ứng của loài *Lactiplantibacillus plantarum* CIP103151 (NR104573). Trình tự này đã được đăng ký trên GenBank với mã số OR690352.

Đoạn gen 16S RNA của chủng vi khuẩn *L. DM6* có chiều dài 1.488 bp, cây phân loại di truyền cho thấy chủng *L. DR9* nằm trên cùng một nhánh với loài *Lactiplantibacillus plantarum* và trình tự nucleotide có độ tương đồng cao, đạt tới >99,0% khi so sánh với đoạn gen 16S RNA tương ứng của loài *Lactiplantibacillus plantarum* NBRC15891 (NR11338). Trình tự này đã được đăng ký trên GenBank với mã số OR690328.

Các chủng vi khuẩn lactic này đều là những chủng vi sinh vật an toàn, không gây bệnh và được sử dụng rất phổ biến trong các chế phẩm probiotic. Đây là các chủng nằm trong danh sách các loài vi sinh vật được Hiệp hội Cơ quan chức năng Kiểm soát thức ăn chăn nuôi Hoa Kỳ (Association of American Feed Control Officials - AAFCO) cho phép sử dụng trong chế biến thức ăn gia súc.

4. KẾT LUẬN

Trong tổng số 20 chủng vi khuẩn lactic, đã tuyển chọn được 3 chủng (*L. DM6*; *L. DR9* và *L. DR27*) có khả năng sinh axit lactic cao với hàm

lượng từ 14,3 - 15,4 mg/mL. Khả năng sinh enzym ngoại bào cellulase, xylanase và amylase thể hiện qua đường kính vòng phân giải cơ chất với cellulose từ 20 - 30 mm, xylan 23 - 35 mm và tinh bột từ 18 - 23 mm. Hoạt tính kháng khuẩn các chủng: *L. DM6*; *L. DR9* và *L. DR27* với một số vi sinh vật gây bệnh cho gia súc đã được xác định, kích thước vòng kháng khuẩn đối với *E. coli* tương ứng là 13, 16 và 21 mm, với *B. cereus* là 7, 11 và 13 mm và *S. typhi* là 12, 10 và 17 mm. Định tên loài bằng phân tích trình tự 16S RNA của 3 chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn cho thấy, chủng *L. DR9* được định danh là *Lactobacillus acidophilus* DR9 (mã số GenBank OR690353); chủng *L. DR27* được định danh là *Lactiplantibacillus plantarum* DR27 (mã số GenBank OR690352); chủng *L. DM6* được định danh là *Lactiplantibacillus plantarum* DM6 (mã số GenBank OR690328).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Như Ngọc (2017). Nghiên cứu áp dụng công nghệ vi sinh vật để xử lý chất thải làng nghề sản xuất tinh bột dong riềng và miến rong. Luận án tiến sĩ Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
2. Trần Thị Lan và cs (2017). Nghiên cứu xử lý bã dong riềng thành những sản phẩm có giá trị. Luận văn thạc sĩ khoa học Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
3. Pahlow, G., Muck R. E., Driehuis F., Elferink S. J. W., Spoelstra S. F. (2003). *Microbiology of ensiling*. In: Buxton DR, Muck RE, Harrison JH (eds) *Silage science and technology*. American Society of Agronomy, Inc., Madison.
4. 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.
5. Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Curr Microbiol*, 57(5): 503 – 507.
6. Herreros, M. A., Hilda, S., Leticia, G., Jose, M. C. (2005). Antimicrobial activity and

antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats'milk cheese). *Food Microbiology*, 22(5): 455 - 459.

7. 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 và ứng dụng - Chuyên san Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội*, số 6.

SELECTION AND RENAME MICROORGANISMS WITH HIGH CAPACITY OF PRODUCING AXIT LACTIC, ENZYME CELLULASE, XYLANASE, AMYLASE APPLYING FOR *Canna edulis* Ker RESIDUE AS ANIMAL FEEDS

Nguyen Thi Hong Ha¹, Nguyen Ngoc Huyen¹, Nguyen Thi Huong Tra¹, Le Thi Trang¹, Vu Thu Diem¹, Ngo Thi Thanh Huong¹, Nguyen Trong Uyen², Le Khanh Linh³, Nguyen Van Hieu⁴

¹Vietnam Institute of Agricultural Engineering and Post - Harvest Technology

²Bac Kan Department of Agriculture and Rural Development

³Curtin University, Perth Western Australia

⁴Institute of Biotechnology

Summary

Canna edulis Ker. residue is a byproduct of its starch processing, accounting for 80% of fresh material product. Exploiting this material for fodder is an effective and realistic solution for not only the shortage of dry green fodder, but also increasing economic efficacy and decreasing environmental pollution in the *C. edulis* Ker. residue processing areas. The aim of this research is to choose microorganisms, which contains high acid lactic, in vivo enzymes (cellulase, xylanase, amylase) and inhibits pathogens to apply for *C. edulis* Ker. residue processing for fodder. As a result, there are 3 out of 20 experimental microorganisms named *L. DM6*; *L. DR9* and *L. DR27*, that can produce high acid lactic, which amount is 14.3, 14.8, 15.4 mg/mL, *in vivo* enzymes and antibacterial at the high rate. Active amylase is expressed as substrate degrading zone diameter achieved at 18, 20, 25 mm, xylanase at 23, 20, 35 mm, cellulose at 20, 22, 30 mm. Antibacterial activity towards *E. coli* via substrate degrading zone diameter is 13, 16, 21 mm, to *B. cereus* is 7, 11 and 13 mm and to *S. typhi* is 12, 10 and 17 mm. Thanks to 16S rDNA sequencing methods for identification, *L. DM6* is found as *Lactiplantibacillus plantarum*, *L. DR9* is *Lactobacillus acidophilus* and *L. DR27* is *Lactiplantibacillus plantarum*.

Keywords: *C. edulis* Ker. residue, cellulose, hemicellulose, *L. acidophilus*, *L. plantarum*.

Ngày nhận bài: 29/5/2024

Ngày chuyển phản biện: 5/6/2024

Ngày thông qua phản biện: 28/6/2024

Ngày duyệt đăng: 5/9/2024