

# PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ VI KHUẨN CHỊU NHIỆT LÊN MEN ETHANOL TỪ NGUYÊN LIỆU NÔNG NGHIỆP

Nguyễn Thị Pha Ly\*, Võ Duy Hoàng và Lê Thị Trúc Phương

Khoa Nông nghiệp, Tài nguyên và Môi trường, Trường Đại học Đồng Tháp, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Pha Ly, Email: [ntply@dthu.edu.vn](mailto:ntply@dthu.edu.vn)

## Lịch sử bài báo

Ngày nhận: 25/10/2023; Ngày nhận chỉnh sửa: 28/11/2023; Ngày chấp nhận: 29/11/2023

## Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn vi khuẩn chịu nhiệt có khả năng lên men ethanol. Trong nghiên cứu này, tổng cộng có 27 dòng vi khuẩn được phân lập từ các nguồn nguyên liệu nông nghiệp như trái cây chín, mùn cưa, bã mía, rỉ đường, hoa cây ăn quả và mật ong. Kết quả khảo sát khả năng lên men cho thấy 11 dòng vi khuẩn biểu hiện khả năng lên men nhanh. Kết quả khảo sát sự phát triển của khuẩn lạc sau 72 giờ ủ ở các mức nhiệt độ 30, 35, 40, 45 và 50°C cho thấy có 7 dòng vi khuẩn (MC3, BM2, BM3, RD, HM1, HM2 và MO) có thể phát triển ở nhiệt độ 50°C. Năm dòng vi khuẩn (MC3, BM2, HM1, HM2 và MO) biểu hiện có thể lên men được từ 6 loại đường thử nghiệm (glucose, sucrose, galactose, lactose, arabinose và xylose); trong khi hai dòng vi khuẩn BM3 và RD biểu hiện không lên men arabinose nhưng có khả năng lên men từ 5 loại đường còn lại. Dựa vào đặc điểm hình thái, đặc tính sinh lý, sinh hóa và giải trình tự DNA, dòng vi khuẩn MO được tuyển chọn định danh, với kết quả là *Bacillus subtilis*.

**Từ khóa:** Ethanol sinh học, lên men ethanol, phân lập vi khuẩn chịu nhiệt, vi khuẩn chịu nhiệt.

DOI: <https://doi.org/10.52714/dthu.13.2.2024.1230>

Trích dẫn: Nguyễn, T. P. L., Võ, D. H., & Lê, T. T. P. (2024). Phân lập và đánh giá vi khuẩn chịu nhiệt lên men ethanol từ nguyên liệu nông nghiệp. *Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp*, 13(2), 22-31. <https://doi.org/10.52714/dthu.13.2.2024.1230>.

Copyright © 2024 The author(s). This work is licensed under a CC BY-NC 4.0 License.

# ISOLATION AND EVALUATION OF THERMOPHILIC BACTERIA FOR ETHANOL FERMENTATION FROM AGRICULTURAL MATERIALS

Nguyen Thi Pha Ly\*, Vo Duy Hoang, and Le Thi Truc Phuong

*Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Dong Thap University,*

*Cao Lanh 870000, Vietnam*

*\*Corresponding author: Nguyen Thi Pha Ly, Email: ntply@dthu.edu.vn*

## Article history

*Received: 25/10/2023; Received in revised form: 28/11/2023; Accepted: 29/11/2023*

## Abstract

*This study was carried out to select the various strains of thermophilic bacteria having the ethanol fermentation activity. In this study, a total of 27 strains were isolated from different agricultural materials of ripe fruits, sawdust, bagasse from sugarcane, molasses, flowers of fruit-tree and honey. In the fermentation testing, eleven of the strains performed the rapid fermentation rate. In the testing of colony growth after 72 hours of incubation at different temperature levels of 30, 35, 40, 45 and 50°C, seven bacterial strains (MC3, BM2, BM3, RD, HM1, HM2 and MO) could grow at 50°C. Five strains (MC3, BM2, HM1, HM2 and MO) gave the possibility of fermentation from 6 testing sugar resources (glucose, sucrose, galactose, lactose, arabinose and xylose); whereas two strains BM3 and RD gave no fermentative signal from arabinose but could ferment from other 5 sugar resources. Based on the characteristics of morphology, physiology, biochemistry and DNA sequencing analyses, the selected bacterial strain (MO) was characterized as *Bacillus subtilis*.*

**Keywords:** *Agriculture waste, bioethanol, ethanol fermentation, thermophilic bacteria.*

## 1. Giới thiệu

Ngày nay do thế giới phụ thuộc quá nhiều vào dầu mỏ và giá dầu biến động liên tục theo chiều tăng và sự cạn kiệt dần nguồn năng lượng hoá thạch và khí đốt nên việc tìm kiếm các nguồn năng lượng thay thế là việc làm có tính sống còn trong đó có năng lượng sinh học (Talukder, 2019; Talukder & cs., 2016). Năng lượng sinh học bao gồm các nguồn năng lượng được sản xuất từ phụ phẩm nông nghiệp, nước thải, bã phế thải hữu cơ công nghiệp, rác thải (Choonut & cs., 2014; Aditiya & cs., 2016). Ethanol được xem là nguồn năng lượng sinh học an toàn và được tạo ra bởi quá trình lên men. Ethanol khi cháy không gây độc hại, giảm lượng CO<sub>2</sub> và giảm lượng khí gây hiệu ứng nhà kính khác (Htet & cs., 2018). Đại dịch SARCOV-2 (COVID-19) đã dẫn đến gia tăng nhu cầu ethanol trong lĩnh vực y tế và sản xuất dung dịch kháng khuẩn trong cuộc chiến chống đại dịch toàn cầu (Ozjofofor & cs., 2023).

Vi sinh vật chịu điều kiện khắc nghiệt đóng vai trò quan trọng trong công nghệ sinh học và kiểm soát sự ô nhiễm môi trường, đáng chú ý là các vi sinh vật chịu nhiệt có thể biến dưỡng ở nhiệt độ từ 37 đến 50°C (Pattanakitvorakul & cs., 2019). Vi khuẩn chịu nhiệt có tiềm năng ứng dụng trong nhiều qui trình công nghiệp bao gồm việc sản xuất ethanol vì chúng có khả năng lên men ở nhiệt độ cao. Chúng còn được ứng dụng để sản xuất enzyme như cellulase từ phụ phẩm nông nghiệp với chi phí thấp. Mặt khác, lên men ở nhiệt độ cao chuyển hóa hoàn toàn cơ chất thành sản phẩm cuối cùng. Nhiều vi khuẩn chịu nhiệt đã được phân lập và nghiên cứu với khả năng lên men ethanol (Babiker & cs., 2010). Lên men ở nhiệt độ cao giúp gia tăng tốc độ phản ứng, giảm sự tiêu thụ năng lượng bởi giảm quá trình làm mát thùng lên men và giúp giảm thiểu hàm lượng khí oxy trong thùng này tạo môi trường yếm khí hơn nên quá trình lên men được hiệu quả (Tesfaw & Assefa, 2014). Do đó, những vi sinh vật này có ý nghĩa rất quan trọng đối với các nước nhiệt đới nơi mà phải tốn nhiều chi phí cho hệ thống làm mát (Huynh & cs., 2022). Mục tiêu nghiên cứu là phân lập, tuyển chọn một số dòng vi khuẩn có khả năng lên men ethanol tốt và chịu được nhiệt độ cao.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Thu thập mẫu trái cây chín (chuối, táo, nho, xoài), mùn cưa, bã mía, rỉ đường, hoa cây ăn quả

(xoài, mận, táo, nhãn) và mật ong ở tỉnh Sóc Trăng, tỉnh Hậu Giang và Thành phố Cần Thơ. Các mẫu được bảo quản trong túi thanh trùng và chuyển về phòng thí nghiệm.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập vi khuẩn

Cho 2 g mẫu vào ống nghiệm chứa 20 ml môi trường Malt Yeast Peptone Glucose (MYPG). Môi trường MYPG gồm yeast extract 0,3%, peptone 0,5%, malt extract 0,3% và glucose 2% (Obire, 2005), khử trùng ở 121°C trong 15 phút, bổ sung ethanol 3% (v/v) và sporal 0,02%. Ủ 24 giờ ở 30°C. Dùng micropipette chuyển 1ml vào đĩa petri có chứa môi trường MYPG agar (yeast extract 0,3%, peptone 0,5%, malt extract 0,3%, glucose 2% và agar 2%) đã khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Cấy trái mẫu, ủ 48 giờ ở 30°C. Tiếp tục cấy chuyển trên môi trường MYPG agar. Quan sát dưới kính hiển vi (X100) để xác định độ đồng nhất của tế bào, chụp hình lưu trữ. Trữ mẫu ở 4°C trong ống thạch nghiêng với môi trường MYPG agar.

#### 2.2.2. Khảo sát khả năng lên men đường glucose

Nuôi sinh khối các dòng đã phân lập từ thí nghiệm 1 trong môi trường MYPG đã khử trùng ở 121°C trong 15 phút, ủ 24 giờ ở 30°C. Lấy 1ml dung dịch mẫu cho vào chai Durham có chứa 9ml dung dịch môi trường YPG (yeast extract 0,3%, peptone 0,5% và glucose 20%) đã khử trùng ở 115°C trong 10 phút. Lắc thật đều để dung dịch đường tràn đầy vào ống thủy tinh úp ngược nằm bên trong chai Durham, ủ ở 30°C. Đo chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> sinh ra trong ống thủy tinh úp ngược tại các thời điểm 24, 48, 72, 96, 120 giờ (Onsoy & cs., 2007).

#### 2.2.3. Khảo sát khả năng chịu nhiệt của vi khuẩn được tuyển chọn

Cấy zigzag các dòng vi khuẩn đã sơ tuyển trên các đĩa petri chứa môi trường MYPG. Ủ các đĩa petri ở các mức nhiệt độ khác nhau 30, 35, 40, 45 và 50°C. Theo dõi sự phát triển của vi khuẩn sau 24, 48 và 72 giờ trên bề mặt môi trường (Babiker & cs., 2010).

#### 2.2.4. Đánh giá khả năng lên men các loại đường

Nuôi sinh khối các dòng vi khuẩn có khả năng lên men mạnh và phát triển ở nhiệt độ cao trong môi trường MYPG. Thực hiện phương pháp lên men trong chai Durham với 6 loại đường glucose, sucrose, lactose, galactose, arabinose và xylose. Xác định chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> sinh ra trong ống thủy tinh úp ngược sau 120 giờ (Warren & Shadomy, 1991).

2.2.5. *Khảo sát đặc tính sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn chịu nhiệt có khả năng lên men ethanol*

Thực hiện một số phản ứng để xác định đặc tính sinh hóa dòng vi khuẩn như nhuộm Gram, catalase, oxidase, thủy phân gelatine, thủy phân tinh bột, urease (Pelezar, 1986; Benson, 1994; Colloins & Lyne, 1995).

2.2.6. *Định danh dòng vi khuẩn được tuyển chọn*

Ly trích DNA vi khuẩn. Khuếch đại trình tự gene 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi chuyên biệt. Sử dụng BLAST để so sánh trình tự đã giải với dữ liệu trên ngân hàng gene ở trang web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

2.2.7. *Phương pháp xử lý số liệu*

Tất cả số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình STATGRAPHICS Plus 5.1.

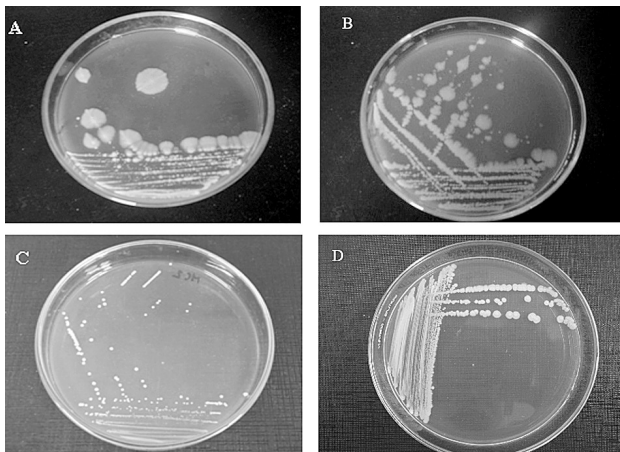
3. **Kết quả và thảo luận**

3.1. **Phân lập vi khuẩn**

Từ 12 nguồn nguyên liệu gồm trái cây chín, mùn cưa, bã mía, ri đường, hoa cây ăn quả và mật ong phân lập được 27 dòng vi khuẩn. Kết quả phân lập các dòng vi khuẩn từ 12 nguồn nguyên liệu được trình bày trong Bảng 1.

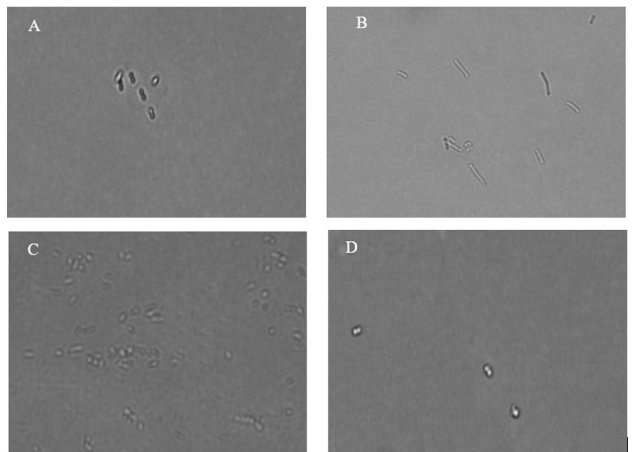
**Bảng 1. Kết quả phân lập các dòng vi khuẩn từ 12 nguồn nguyên liệu**

STT	Địa điểm thu thập nguyên liệu	Nguồn nguyên liệu	Số dòng vi khuẩn phân lập được
1		Chuối	2
2	Chợ Xuân Khánh, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ	Táo	1
3		Nho	3
4		Xoài	4
5	Phường Trà An, quận Bình Thủy, TP Cần Thơ	Mùn cưa	3
6	Nhà máy đường Phụng Hiệp, phường Hiệp Thành, thị xã Tân Hiệp, tỉnh Hậu Giang	Bã mía	3
7		Ri đường	1
8		Hoa xoài	2
9	Phường An Hòa, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ	Hoa mận	3
10		Hoa táo	2
11		Hoa nhãn	2
12	Xã Phong Năm, huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng	Mật ong	1



**Hình 1.**

**Hình thái khuẩn lạc vi khuẩn: N3 (A), HX2 (B), MC2 (C) và HM2 (D)**



**Hình 2.**

**Hình dạng tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi (X100): Que ngắn (A), que dài (B), cầu (C) và cầu đôi (D)**

Kết quả ở Bảng 2 thấy hình dạng khuẩn lạc chủ yếu của 27 dòng vi khuẩn là cầu đều và không đều với bìa nguyên và răng cưa, trong tổng số 27 dòng có 2 dòng với khuẩn lạc màu trắng ngà (X1 và HT2), 6 dòng màu trắng sữa (MC3, BM3, RD, HX2, HM2 và HM3) còn lại là màu trắng. Bên cạnh độ nổi mô thì các dòng N3, X2, X3, X4, BM3, HX2 và HM1 có dạng phẳng (Hình 1).

Đa số kích thước khuẩn lạc vi khuẩn đều nhỏ ( $1,0 - 4,0 \times 1,0 - 4,0$  mm) chỉ có 4 dòng N3, X3, HX2 và HM1 có kích thước lớn hơn ( $6,0 - 10 \times 7,0 - 9,0$  mm).

Tế bào vi khuẩn có kích thước  $0,3 - 1,2 \times 0,1 - 0,2$   $\mu\text{m}$ , gồm 4 hình dạng là que ngắn, que dài, cầu và cầu đôi. Hình 2 trình bày hình dạng tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi (X100).

**Bảng 2. Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của 27 dòng vi khuẩn sau 48 giờ ủ**

STT	Nguồn nguyên liệu	Ký hiệu dòng	Đặc điểm khuẩn lạc					Đặc điểm tế bào		
			Kích thước (mm)	Màu sắc	Hình dạng	Bìa	Độ nổi	Hình dạng	Kích thước ( $\mu\text{m}$ )	
1	Chuối	C1	$1,5 \times 1,5$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,5 \times 0,1$	
2		C2	$1,0 \times 1,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$1,2 \times 0,2$	
3	Táo	T	$1,0 \times 1,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,4 \times 0,1$	
4		N1	$1,0 \times 1,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,6 \times 0,1$	
5		N2	$1,0 \times 1,0$	Trắng	Cầu đều	Răng cưa	Mô	Que dài	$0,5 \times 0,2$	
6	Nho	N3	$6,0 \times 7,0$	Trắng	Không đều	Răng cưa	Phẳng	Que ngắn	$0,5 \times 0,1$	
7		X1	$1,5 \times 1,5$	Trắng ngà	Cầu đều	Nguyên	Mô	Cầu đôi	$0,3 \times 0,1$	
8	Xoài	X2	$4,0 \times 4,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Phẳng	Que ngắn	$0,5 \times 0,2$	
9		X3	$10,0 \times 10,0$	Trắng	Không đều	Răng cưa	Phẳng	Que ngắn	$0,4 \times 0,1$	
10		X4	$2,0 \times 2,5$	Trắng	Không đều	Nguyên	Phẳng	Que ngắn	$0,6 \times 0,1$	
11	Mùn cưa	MC1	$2,0 \times 2,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Cầu	$0,5 \times 0,1$	
12		MC2	$2,0 \times 2,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,6 \times 0,1$	
13		MC3	$1,0 \times 1,0$	Trắng sữa	Cầu đều	Nguyên	Mô	Cầu	$0,3 \times 0,1$	
14	Bã mía	BM1	$2,0 \times 3,0$	Trắng	Không đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,5 \times 0,1$	
15		BM2	$2,0 \times 2,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,6 \times 0,1$	
16		BM3	$3,0 \times 2,0$	Trắng sữa	Không đều	Răng cưa	Phẳng	Que ngắn	$0,6 \times 0,1$	
17	Ri đường	RD	$1,0 \times 1,0$	Trắng sữa	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que dài	$0,7 \times 0,1$	
18	Hoa xoài	HX1	$1,0 \times 1,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,5 \times 0,2$	
19		HX2	$6,0 \times 7,0$	Trắng sữa	Không đều	Răng cưa	Phẳng	Que ngắn	$0,6 \times 0,1$	
20	Hoa mận	HM1	$7,0 \times 9,0$	Trắng	Không đều	Răng cưa	Phẳng	Que ngắn	$1,1 \times 0,2$	
21		HM2	$1,0 \times 1,0$	Trắng sữa	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,5 \times 0,1$	
22		HM3	$2,0 \times 2,0$	Trắng sữa	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,3 \times 0,1$	
23	Hoa táo	HT1	$2,0 \times 2,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,5 \times 0,1$	
24		HT2	$2,5 \times 2,5$	Trắng ngà	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,6 \times 0,2$	
25	Hoa nhãn	HN1	$1,0 \times 1,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,5 \times 0,1$	
26		HN2	$2,0 \times 2,0$	Trắng	Cầu đều	Nguyên	Mô	Que ngắn	$0,8 \times 0,1$	
27	Mật ong	MO	$3,0 \times 4,0$	Trắng	Không đều	Răng cưa	Mô	Que ngắn	$0,8 \times 0,2$	

**3.2. Khảo sát khả năng lên men đường glucose**

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy sau 24 giờ lên men: Hầu như tất cả các dòng vi khuẩn đều chưa lên men,

trừ các dòng MC3, BM2, RD, HM1, HM2, HT1, HT2 và MO, tuy nhiên sự lên men rất yếu với chiều cao cột khí cao nhất là 17 mm (HT1).

**Bảng 3. Chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> của 27 dòng vi khuẩn đã phân lập**

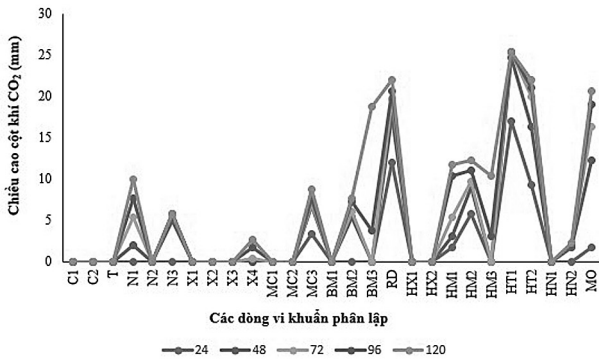
STT	Ký hiệu dòng	Chiều cao cột khí CO <sub>2</sub> (mm) sau các thời gian lên men (giờ)				
		24	48	72	96	120
1	C1	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
2	C2	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
3	T	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
4	N1	0	2,0	5,3	7,7	10 ± 0,0 <sup>fg</sup>
5	N2	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
6	N3	0	5,0	5,7	5,7	5,7 ± 0,5 <sup>i</sup>
7	X1	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
8	X2	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
9	X3	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
10	X4	0	0	0,3	1,7	2,7 ± 0,5 <sup>j</sup>
11	MC1	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
12	MC2	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
13	MC3	3,3	6,7	7,0	7,7	8,7 ± 0,9 <sup>gh</sup>
14	BM1	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
15	BM2	2,7	5,3	6,0	7,3	7,7 ± 0,5 <sup>h</sup>
16	BM3	0	0	0	3,7	18,7 ± 0,9 <sup>c</sup>
17	RD	12,0	17,7	19,7	20,7	22,0 ± 0,8 <sup>b</sup>
18	HX1	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
19	HX2	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
20	HM1	1,7	3,0	5,3	10,3	11,7 ± 0,5 <sup>de</sup>
21	HM2	5,7	9,0	9,7	11,0	12,3 ± 0,5 <sup>d</sup>
22	HM3	0	0	0	3,0	10,3 ± 0,5 <sup>ef</sup>
23	HT1	17,0	24,7	25,3	25,3	25,3 ± 0,5 <sup>a</sup>
24	HT2	9,3	16,3	20,0	21,0	22,0 ± 1,6 <sup>b</sup>
25	HN1	0	0	0	0	0 <sup>k</sup>
26	HN2	0	1,7	2,0	2,0	2,3 ± 0,5 <sup>j</sup>
27	MO	1,7	12,3	16,3	19,0	20,7 ± 1,0 <sup>b</sup>
CV (%)						12,8

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Các giá trị có mẫu tự giống nhau không khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Sau 48, 72 và 96 giờ thì 3 dòng N1, N3 và HN2 bắt đầu lên men, đồng thời quá trình lên men diễn ra mạnh với sự gia tăng chiều cao cột khí cao nhất là 10,6 mm ở dòng MO từ 1,7 mm tăng lên 12,3 mm sau 48 giờ. Tuy nhiên, ở 24 giờ kế tiếp theo, sự gia tăng này

giảm mạnh, chỉ tăng từ 0,3 mm đến 4,0 mm. Ở 96 giờ lên men, quá trình lên men bắt đầu yếu dần vì chiều cao cột khí tăng nhiều nhất là 3,7 mm ở dòng BM3, có thể là do hàm lượng ethanol và các sản phẩm sinh ra ức chế sự phát triển của vi khuẩn dẫn đến lượng khí CO<sub>2</sub> thấp.



**Hình 3. Chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> của 27 dòng vi khuẩn đã phân lập**

Sau 120 giờ: Hầu hết các dòng vi khuẩn không sinh trưởng và lên men nữa, nên chiều cao cột khí gia tăng không đáng kể so với 96 giờ. Đặc biệt, dòng BM3 có sự gia tăng rất mạnh từ 3,7 mm ở 96 giờ lên 18,7 mm ở 120 giờ.

Kết luận, chỉ có 14 dòng có khả năng lên men trong tổng số 27 dòng vi khuẩn đã phân lập. Tuy nhiên, sơ tuyển được 11 dòng có chiều cao cột khí cao hơn 7 mm là N1, MC3, BM2, BM3, RD, HM1, HM2, HM3, HT1, HT2 và MO, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với các dòng còn lại (Hình 3).

**3.3. Khảo sát khả năng chịu nhiệt của vi khuẩn được tuyển chọn**

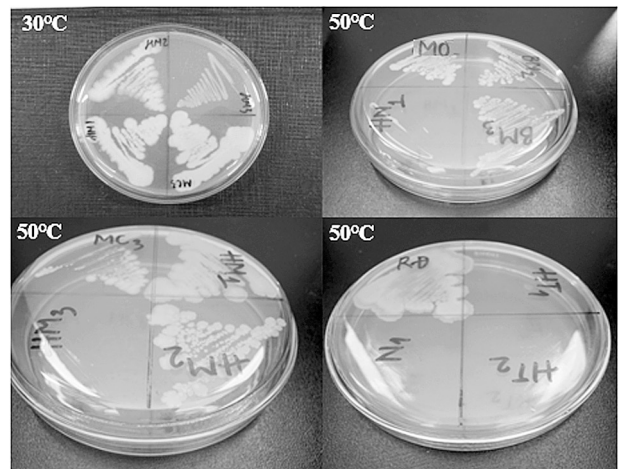
Từ 11 dòng vi khuẩn đã tuyển chọn với khả năng lên men mạnh, tiếp tục khảo sát khả năng chịu nhiệt của các dòng này.

**Bảng 4. Sự phát triển của các dòng vi khuẩn ở các mức nhiệt độ khác nhau**

STT	Ký hiệu dòng	Nhiệt độ (°C)				
		30	35	40	45	50
1	N1	+	+	-	-	-
2	MC3	+	+	+	+	+
3	BM2	+	+	+	+	+
4	BM3	+	+	+	+	+
5	RD	+	+	+	+	+
6	HM1	+	+	+	+	+
7	HM2	+	+	+	+	+
8	HM3	+	+	-	-	-
9	HT1	+	+	-	-	-
10	HT2	+	+	-	-	-
11	MO	+	+	+	+	+

Ghi chú: (+): phát triển; (-): không phát triển.

Ở nhiệt độ 30 và 35°C thì cả 11 dòng vi khuẩn đều phát triển tốt, tạo khuẩn lạc rõ ràng vì đây là khoảng nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của các dòng này. Tuy nhiên, khi gia tăng nhiệt độ lên 40°C chỉ có 7 dòng (MC3, BM2, BM3, RD, HM1, HM2 và MO) phát triển sau 72 giờ, các dòng còn lại không chịu được nhiệt độ cao hay nói cách khác là bị ức chế ở nhiệt độ cao nên khuẩn lạc không phát triển. Khi nhiệt độ tiếp tục gia tăng thì có 7 dòng phát triển được ở nhiệt độ 50°C. So với kết quả nghiên cứu của Miah & cs. (2022) và Ndubuisi & cs. (2020) thì 7 dòng này có khả năng chịu nhiệt tốt hơn *Bacillus amyloliquefaciens* (phát triển ở 42°C) và *Kluyveromyces marxianus*, một vài dòng *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia kudriavzevii* (có khả năng lên men ethanol từ 40 đến 45°C). Soleimani & cs. (2017) cho rằng ethanol sinh học nên được sản xuất bằng các vi khuẩn chịu nhiệt như *Thermoanaerobacter mathranii*, *T. pseudoethanolicus* và *T. pentosaceus*. Các vi khuẩn chịu nhiệt được xem là nhóm vi sinh vật ít có nguy cơ nhất vì có thể hoạt động trong môi trường muối, môi trường dinh dưỡng thấp và không bị tạp nhiễm bởi các vi sinh vật mesophilic.



**Hình 4. Kết quả khảo sát khả năng chịu nhiệt của các dòng vi khuẩn**

Như vậy, tuyển chọn được 7 dòng vi khuẩn MC3, BM2, BM3, RD, HM1, HM2, MO chịu được nhiệt độ 50°C.

**3.4. Đánh giá khả năng lên men các loại đường**

Sau khi đã tuyển chọn được 7 dòng vi khuẩn vừa có khả năng lên men vừa có khả năng chịu nhiệt tốt, đánh giá khả năng lên men 6 loại đường gồm 4 đường 6-carbon (glucose, sucrose, lactose và galactose) và 2 đường 5-carbon (xylose, arabinose) của các dòng

này. Kết quả lên men 6 loại đường sau 5 ngày được trình bày ở Bảng 5.

Đối với đường hexose thì 7 dòng đều có khả năng lên men đường đơn glucose và galactose. Đồng thời, chúng còn lên men được đường đôi sucrose nhờ enzyme invertase trong tế bào chuyển hóa sucrose thành glucose và fructose. Cả 7 dòng vi khuẩn có enzyme lactase nên phân giải được đường lactose. Đối với đường pentose thì chỉ có 2 dòng vi khuẩn BM3 và RD là không phân giải được đường arabinose, các dòng còn lại đều lên men được đường pentose. Ethanol sinh học đầu tiên được sản xuất bởi quá trình lên men tinh bột và sucrose bởi

vi khuẩn *Zymomonas mobilis* (Sánchez & Cardona, 2008). Vi khuẩn *Z. mobilis* có khả năng lên men mạnh, tuy nhiên chỉ lên men được glucose, fructose và sucrose (Ostergaard & cs., 2000). Theo kết quả nghiên cứu của Rodrussamee & cs. (2011) thì nấm men chịu nhiệt *Kluyveromyces marxianus* có thể lên men nhiều loại đường gồm glucose, mannose, galactose, xylose, ngoại trừ đường arabinose. Như vậy, cả 5 dòng vi khuẩn có khả năng lên men nhiều loại đường hơn *Z. mobilis* và *K. marxianus*.

Kết luận, trong 7 dòng vi khuẩn thì chỉ có 5 dòng MC3, BM2, HM1, HM2 và MO là có khả năng lên men được 6 loại đường.

**Bảng 5. Kết quả lên men 6 loại đường của vi khuẩn**

Ký hiệu dòng	Glucose	Sucrose	Lactose	Galactose	Arabinose	Xylose
MC3	+	+	+	+	+	+
BM2	+	+	+	+	+	+
BM3	+	+	+	+	-	+
RD	+	+	+	+	-	+
HM1	+	+	+	+	+	+
HM2	+	+	+	+	+	+
MO	+	+	+	+	+	+

Ghi chú: (+): Lên men; (-): Không lên men

### 3.5. Khảo sát đặc tính sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn chịu nhiệt có khả năng lên men ethanol

Tiến hành một số phản ứng để xác định đặc tính sinh lý, sinh hóa của 7 dòng vi khuẩn có khả năng chịu nhiệt và lên men ethanol mạnh, từ đó chọn ra các dòng đại diện để định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Bảng 6 trình bày đặc tính của các dòng vi khuẩn đã tuyển chọn.

Kết quả cho thấy 7 dòng này có đặc tính giống nhau là oxidase (-), catalase (+) và gelatine (-), nhưng

khác nhau ở khả năng thủy phân tinh bột và hoạt tính phân giải urea nên có thể phân chia thành 4 nhóm:

- + Nhóm 1: MC3, BM3 [tinh bột (+), urease (+)].
- + Nhóm 2: BM2, HM1 [tinh bột (+), urease (-)].
- + Nhóm 3: RD, HM2 [tinh bột (-), urease (+)].
- + Nhóm 4: MO [tinh bột (-), urease (-)].

Tuy nhiên, dòng MO ở nhóm 4 có khả năng lên men mạnh và chịu nhiệt tốt. Vì thế, tuyển chọn dòng MO để định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

**Bảng 6. Đặc tính sinh hóa của 7 dòng vi khuẩn**

Ký hiệu dòng	Gram	Oxidase	Catalase	Gelatine	Tinh bột	Urease
MC3	-	-	+	-	+	+
BM2	-	-	+	-	+	-
BM3	-	-	+	-	+	+
RD	+	-	+	-	-	+
HM1	-	-	+	-	+	-
HM2	-	-	+	-	-	+
MO	+	-	+	-	-	-

Ghi chú: (-): âm tính, (+): dương tính



### 3.6. Định danh dòng vi khuẩn được tuyển chọn

Theo kết quả giải trình tự (470 nucleotide) cho thấy dòng MO là *Bacillus subtilis*. Nhìn chung, *Bacillus subtilis* có thể biến dưỡng nhiều loại đường (Stulke và Hillen, 2000). Theo Kuan-Fu & cs. (2010), *B. subtilis* E20 có thể tăng trưởng ở khoảng nhiệt độ rộng từ 10 đến 50°C. Bên cạnh đó, *B. subtilis* có thể

tổng hợp nhiều proteinase và vận chuyển chúng ra bên ngoài tế bào. Do đó, *B. subtilis* có thể được dùng để sản xuất cellulase nhằm phóng thích cellobiose và glucose từ phụ phẩm nông nghiệp. Các dòng *B. subtilis* tái tổ hợp có thể ứng dụng để sản xuất ethanol từ nhiều loại hydratecarbon giúp giảm giá thành ethanol (Susana & cs., 2007).

**Bảng 7. Kết quả BLAST trên NCBI của dòng vi khuẩn MO**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">HM629406.1</a>	Bacillus subtilis strain B-G-TSA11 16S ribosomal RNA gene, partial seq	869	869	100%	0.0	100%
<a href="#">HM629390.1</a>	Bacillus subtilis strain B-J-PDA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	869	869	100%	0.0	100%
<a href="#">HM629384.1</a>	Bacillus subtilis strain B-G-TSA4 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	869	869	100%	0.0	100%

### 4. Kết luận

Phân lập được 27 dòng vi khuẩn từ 12 nguồn nguyên liệu như trái cây chín, mùn cưa, bã mía, ri đường, hoa cây ăn quả và mật ong.

Trong 11 dòng vi khuẩn được sơ tuyển có biểu hiện khả năng lên men mạnh, trong đó có 7 dòng MC3, BM2, BM3, RD, HM1, HM2 và MO có thể phát triển ở nhiệt độ cao đến 50°C. Các dòng vi khuẩn MC3, BM2, HM1, HM2 và MO sử dụng được 6 loại đường (glucose, sucrose, lactose, galactose, arabinose và xylose), trong khi 2 dòng vi khuẩn BM3 và RD lên men được 5 loại đường (glucose, sucrose, lactose, galactose và xylose). Dòng MO được xác định là *Bacillus subtilis*.

### Tài liệu tham khảo

Aditya, H. B., Chong, W. T., Mahlia, T. M. I., Sebayang, A. H., Berawi, M. A., & Nur, H. (2016). Second generation bioethanol potential from selected Malaysia's biodiversity biomasses: A review. *Waste Management*, 47, 46-61.

Abdel-Banat, B. M., Hoshida, H., Ano, A., Nonklang, S., & Akada, R. (2010). High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 861-867.

Benson, H. J. (1994). *Microbiological application, laboratory manual in general microbiology*. W.M.C. Brown Publishers, Dubuque, U.S.A.

Choonut, A., Saejong, M., & Sangkharak, K. (2014). The production of ethanol and hydrogen from

pineapple peel by *Saccharomyces cerevisiae* and *Enterobacter aerogenes*. *Energy Procedia*, 52, 242-249.

Collins, C.H. & Lyne, P.M. (1995). *Collins and Lyne's microbiological methods*. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford.

Htet, N. N. W., Hlaing, T. S., Yu, S. Z., & Yu, S. S. (2018). Isolation and characterization of xyloseutilizing yeasts for ethanol production. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access*, 6(2), 109-114.

Huynh, X. P., Klanrit, P., Dung, N. T. P., Thanonkeo, S., Yamada, M., & Thanonkeo, P. (2022). High-temperature ethanol fermentation from pineapple waste hydrolysate and gene expression analysis of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 12(1), 13965.

Kuan-Fu, L., Chiu-Hsia, C., Ya-Li, S., Winton, C., & Chun-Hung, L. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and shellfish immunology*, 28(5-6), 837-844.

Miah, R., Siddiq, A., Chakraborty, U., Tuli, J. F., Barman, N. K., Uddin, A., Aziz, T., Sharif, N., Dey, S. K., Yamada, M., & Talukder, A. A. (2022). Development of high temperature simultaneous saccharification and fermentation by thermosensitive *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Nature portfolio*, 12, 3630.

Ndubuisi, I.A., Qin, Q., Liao, G., Wang, B., Moneke, A.N., Ogbonna, J.C., Jin, C., & Fang, W. (2020). Effects of various inhibitory substances and

- immobilization on ethanol production efficiency of a thermotolerant *Pichia kudriavzevii*. *Biotechnol Biofuels*, 13(91), 1-12.
- Obire, O. (2005). Activity of *Zymomonas* species in palm-sap obtained from three areas in Edo State, Nigeria. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt*, 9(1), 25-30.
- Onsoy, T., Thanonkeo, P., Thanonkeo, S., & Yamada, M. (2007). Ethanol production from jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. *KMITL Science and Technology Journal*, 7(S1), 55-60.
- Ostergaard, S., Olsson, L., & Nielsen, J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(1), 34-50.
- Ozjoiofor, U. (2023). Isolation and identification of non-saccharomyces ethanol and thermo-tolerant yeasts strains from fermented carbohydrate wastes. *Journal of Current Biomedical Research*, 3(3, May-June), 984-992.
- Pattanakittivorakul, S., Lertwattanasakul, N., Yamada, M., & Limtong, S. (2019). Selection of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* for high temperature ethanol production from molasses and increasing ethanol production by strain improvement. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112, 975-990.
- Pelezar, M.J., Chan, E.C.S., & Krieg, N.R. (1986). *Microbiology: concepts and applications*. McGraw Hill, Inc., New York, U.S.A.
- Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K., Suprayogi, Limtong, S., Kosaka, T., & Yamada, M. (2011). Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 1573-1586.
- Sanchez, O. J., & Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, 99(13), 5270-5295.
- Soleimani, S. S., Adiguzel, A., & Nadaroglu, H. (2017). Production of bioethanol by facultative anaerobic bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(3), 402-406.
- Stulke, J., & Hillen, W. (2000). Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annual Review of Microbiology*, 54, 849-880.
- Romero, S., Merino, E., Bolívar, F., Gosset, G., & Martinez, A. (2007). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5190-5198.
- Talukder, A. A., Adnan, N., Siddiqa, A., Miah, R., Tuli, J. F., Khan, S. T., Deya, S. K., Lertwattanasakul, N., & Yamada, M. (2019). Fuel ethanol production using xylose assimilating and high ethanol producing thermosensitive *Saccharomyces cerevisiae* isolated from date palm juice in Bangladesh. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 1-7.
- Talukder, A. A., Easmin, F., Mahmud, S. A., & Yamada, M. (2016). Thermotolerant yeasts capable of producing bioethanol: isolation from natural fermented sources, identification and characterization. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(6), 1106-1114.
- Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Current trends in bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, inhibitor reduction, growth variables, coculture, and immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 1-11.
- Warren, P., & Shadomy, L. (1991). Yeast fermentation broth base with carbohydrate and Durham tube. *Manual of Clinical Microbiology*, 5, 34-39.