

ISOLATION AND SELECTION OF ACETOBACTER XYLINUM STRAINS CAPABLE OF PRODUCING CELLULOSE MEMBRANES FROM LITCHI SEED COAT JUICE

Nguyen Van Quyet, Truong Thi Hoa, Truong Thi Hai Duong, Pham Thi Bich Dao*

Hai Duong Central College of Pharmacy - 324 Nguyen Luong Bang, Le Thanh Nghi Ward, Hai Phong, Vietnam

Received: 12/09/2025

Revised: 03/10/2025; Accepted: 08/10/2025

ABSTRACT

Objective: To isolate and identify *Acetobacter xylinum* strains capable of producing cellulose membranes from litchi seed coat juice, and to investigate several factors affecting membrane production, including litchi juice concentration, medium pH, and incubation time.

Methods: Bacteria were isolated from the biofilm formed during the natural fermentation of litchi juice using the Winogradsky-Beijerinck method. Microbial identification was performed via 16S rRNA gene sequencing and BLAST analysis on NCBI. The effects of litchi seed coat juice concentration (10-100%), medium pH (4.7; 5.2; 5.7), and incubation time (1-11 days) on membrane production were evaluated.

Results: BLAST analysis revealed that the strain under study showed 100% sequence similarity to *Gluconacetobacter entanii* strain HWW100 and *Acetobacter* sp. PA2.2. Optimal membrane production was achieved in medium containing 60% litchi juice, at pH 5.2, with an incubation period of 7 days.

Conclusion: The bacterial strain isolated from litchi seed coat juice demonstrated a high capacity for producing bacterial cellulose membranes under the determined optimal conditions. These findings highlight the potential of using litchi-derived substrates in the production of bacterial cellulose for applications in the food industry, pharmaceuticals, and biomaterials. Further research should focus on optimizing the fermentation process at a larger scale and evaluating the mechanical, physical, and chemical properties of the obtained membranes.

Keywords: *Acetobacter xylinum*, bacterial cellulose membrane, litchi extract.

*Corresponding author

Email: daophamthibich1987@gmail.com **Phone:** (+84) 904539496 **Https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD18.3465**

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN ACETOBACTER XYLINUM CÓ KHẢ NĂNG TẠO MÀNG CELLULOSE TỪ NƯỚC ÉP ÁO HẠT QUẢ VẢI

Nguyễn Văn Quyết, Trương Thị Hoa, Trương Thị Hải Dương, Phạm Thị Bích Đào*

Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương - 324 Nguyễn Lương Bằng, P. Lê Thanh Nghị, Tp. Hải Phòng, Việt Nam

Ngày nhận: 12/09/2025

Ngày sửa: 03/10/2025; Ngày đăng: 08/10/2025

ABSTRACT

Mục tiêu: Phân lập, định danh chủng *Acetobacter xylinum* có khả năng tạo màng cellulose từ nước ép áo hạt quả vải, đồng thời khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo màng, bao gồm tỷ lệ nước ép vải, pH môi trường, thời gian nuôi cấy.

Phương pháp: Vi khuẩn được phân lập từ màng sinh học hình thành trong quá trình lên men tự nhiên nước ép quả vải theo phương pháp Winogradsky-Beijerinck. Việc định danh vi sinh vật được thực hiện bằng giải trình tự gen 16S rARN và phân tích BLAST trên NCBI. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nước ép áo hạt quả (ở các nồng độ 10-100%), pH môi trường (4,7; 5,2; 5,7), thời gian nuôi cấy (1-11 ngày) đến khả năng tạo màng.

Kết quả: Phân tích BLAST cho thấy chủng nghiên cứu có mức tương đồng 100% với *Gluconacetobacter entanii* strain HWW100 và *Acetobacter* sp. PA2.2. Điều kiện tối ưu để tạo màng là môi trường chứa 60% nước ép vải, pH 5,2, thời gian nuôi cấy 7 ngày.

Kết luận: Chủng vi khuẩn được phân lập từ nước ép áo hạt quả vải có khả năng tạo màng cellulose sinh học với hiệu suất cao trong điều kiện tối ưu đã xác định. Kết quả này mở ra tiềm năng ứng dụng nguyên liệu từ quả vải trong sản xuất màng cellulose sinh học phục vụ công nghiệp thực phẩm, y dược và vật liệu sinh học. Các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung vào tối ưu hóa quy trình lên men ở quy mô lớn và đánh giá đặc tính cơ - lý - hóa của màng thu được.

Từ khóa: *Acetobacter xylinum*, màng cellulose vi khuẩn, nước ép áo hạt quả vải.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cellulose là polysaccharid tự nhiên phổ biến nhất, được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực nhờ tính bền vững và khả năng ứng dụng đa dạng [1]. Bên cạnh cellulose thực vật, cellulose vi khuẩn (bacterial cellulose - BC) ngày càng được quan tâm bởi những đặc tính vượt trội như độ tinh khiết cao, cấu trúc sợi nano bền chắc, khả năng giữ nước lớn, tính tương thích sinh học và dễ phân hủy [2], [4], [9]. Màng BC hiện được ứng dụng trong y học (da nhân tạo, màng vết thương, vật liệu y sinh), công nghệ thực phẩm (chất tạo cấu trúc, màng bao gói), mỹ phẩm (mặt nạ dưỡng da) và công nghệ môi trường [3].

Trong số các loài vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp cellulose, *Acetobacter xylinum* là loài được nghiên cứu nhiều nhất nhờ khả năng tổng hợp cellulose mạnh và phân bố rộng rãi trong tự nhiên, đặc biệt trong các loại nước ép trái cây, nước dừa, nước mía... [6-8]. Do vậy việc khai thác các nguồn nguyên liệu tự nhiên sẵn có này trong sản xuất BC

không chỉ góp phần đa dạng hóa nguồn cơ chất mà còn mở ra hướng ứng dụng tiềm năng trong công nghệ sinh học và vật liệu sinh học có giá trị gia tăng cao.

Ở Việt Nam, vải thiều (*Litchi chinensis*) là một loại trái phổ biến tại các tỉnh phía Bắc như Hải Phòng (Hải Dương cũ), Bắc Ninh (Bắc Giang cũ)... Với thành phần dinh dưỡng cao, nước ép áo hạt quả vải phù hợp làm môi trường nuôi vi sinh để sản xuất BC. Sử dụng nước ép áo hạt quả vải vừa tận dụng nguồn nguyên liệu nông nghiệp giá rẻ, vừa có thể tạo ra sản phẩm có giá trị gia tăng trong các ngành thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm [7].

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu phân lập, định danh chủng *Acetobacter xylinum* từ nước ép áo hạt quả vải và khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến khả năng tạo màng cellulose sinh học, nhằm xác định môi trường tối ưu cho quá trình sản xuất.

*Tác giả liên hệ

Email: daophamthibich1987@gmail.com Điện thoại: (+84) 904539496 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD18.3465>

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Vải thiều được thu mua tại Hải Phòng, tách phần áo hạt quả vải (Litchi chinensis) ép lấy nước để sử dụng làm nguồn cơ chất lên men.

Tủ ấm vi sinh, nồi hấp tiệt trùng, tủ an toàn sinh học, kính hiển vi quang học, máy lắc vortex, ống nghiệm, đĩa petri, que cấy, lam kính.

Glucose, saccharose, pepton; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , CaCO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , NaOH ; thuốc nhuộm Gram, Fuchsin, Lugol.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn

Quá trình phân lập vi khuẩn được tiến hành theo phương pháp Winogradsky-Beijerinck: nước ép áo hạt quả vải thiều sau khi lọc bỏ tạp chất được để lên men tự nhiên ở điều kiện hiếu khí (đậy bằng vải màn, nhiệt độ phòng) trong 3-4 ngày. Khi trên bề mặt dịch xuất hiện lớp màng sinh học, màng được thu, rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng, sau đó nghiền nhỏ trong ống nghiệm chứa 10 mL nước cất thanh trùng. Huyền phù thu được được lắc đều bằng máy vortex trong 10 phút, sau đó tiến hành pha loãng thập phân (từ nồng độ 10^{-1} đến 10^{-6}). Mỗi nồng độ pha loãng được cấy trải trên môi trường phân lập gồm glucose 20g, cao nấm men 5g, pepton 3g, KH_2PO_4 5g, agar 20g, nước vừa đủ 1000 ml).

Sau khi cấy xong, ủ mẫu trong tủ ủ vi sinh ở 37°C trong thời gian 24-48 giờ. Quan sát sự phát triển của vi sinh vật thể hiện qua các khuẩn lạc. Quan sát, mô tả đặc điểm hình thái của khuẩn lạc, sau đó tiến hành nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học. Các chủng có đặc điểm hình thái, tính chất bắt màu của vi khuẩn acid acetic, đồng thời cho khả năng tạo màng dày, bền trong nuôi cấy dịch thể, được tuyển chọn cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Định danh vi khuẩn bằng giải trình tự gen 16S rARN

Chủng vi khuẩn sau khi phân lập thành những chủng thuần và định danh sơ bộ bằng phương pháp nhuộm Gram, sẽ được tách chiết ADN tổng số bằng bộ kit thương mại (theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Gen 16S rARN được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi được sử dụng là: 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTACGACT-3') và 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarose 1,2%, sau đó tinh sạch và gửi giải trình tự theo phương pháp Sanger.

Trình tự gen 16S rARN thu được sẽ được so sánh đối chiếu trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST, từ đó xác định đến cấp loài dòng vi khuẩn đã phân lập.

2.2.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo màng cellulose

- Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nước ép áo hạt quả vải đến quá trình tạo màng: nuôi tăng sinh chủng vi khuẩn đã phân lập được vào trong môi trường dinh dưỡng lỏng tại điều kiện 30°C , trong 48 giờ và ống giống thu được sẽ được kiểm tra mật độ vi sinh vật và sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát điều kiện sản sinh màng BC. Môi trường nước ép áo hạt quả vải được sử dụng để sản xuất màng cellulose và các nồng độ nước ép áo hạt quả vải khác nhau trong môi trường sẽ ảnh hưởng lên khả năng tạo màng cellulose của vi khuẩn. Cho cùng lượng giống vi khuẩn vào trong 500 ml các dụng dịch môi trường có hàm lượng nước ép áo hạt quả vải ở các tỷ lệ khác nhau (10%, 20%, 40%, 60%, 80% và 100%), tại nhiệt độ phòng trong điều kiện tĩnh sau 7 ngày và tiến hành kiểm tra độ dày của màng cellulose tạo thành [5].

- Khảo sát ảnh hưởng của pH đến quá trình tạo màng BC: dòng vi khuẩn đã được tuyển chọn từ thí nghiệm trên nuôi tăng sinh trên môi trường dinh dưỡng lỏng trong 48 giờ. Cho vào 3 dụng cụ nuôi cấy, mỗi lọ 500 ml môi trường nước ép áo hạt quả vải đã điều chỉnh về các mức pH 4,7; 5,2 và 5,7 đã khử trùng và để nguội, sau đó cho chủng dòng vi khuẩn đã tăng sinh vào các lọ với cùng lượng giống, ủ ở nhiệt độ phòng. Khi quá trình lên men kết thúc, tiến hành đo độ dày màng cellulose, đo pH sau quá trình lên men 7 ngày.

- Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi ủ đến quá trình tạo màng BC: thời gian nuôi ủ ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và khả năng tạo màng BC. Sau khi chọn được nồng độ nước ép áo hạt quả vải thích hợp cho sự hình thành màng cellulose, vi khuẩn được kiểm tra khả năng tạo màng trong các khoảng thời gian khác nhau. Giống tăng sinh được cấy vào môi trường thích hợp, ủ trong điều kiện tĩnh, tại nhiệt độ phòng, kiểm tra độ dày của màng BC tạo thành sau các khoảng thời gian ủ nuôi [5].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi khuẩn

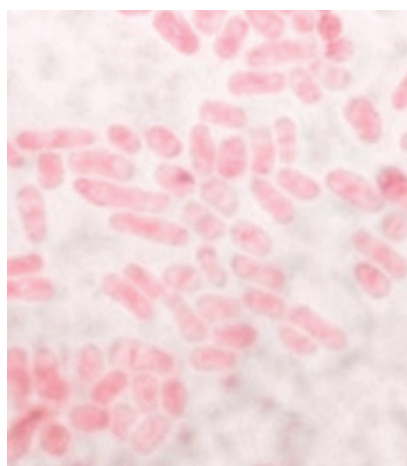
Sau 3-4 ngày lên men tự nhiên nước ép áo hạt quả vải, trên bề mặt dịch xuất hiện lớp màng sinh học mỏng, màu trắng đục. Màng được thu và tiến hành cấy trên môi trường phân lập. Sau 2 ngày trên môi trường phân lập, nhiều khuẩn lạc mọc rời rạc, trong đó có những khuẩn lạc tròn, bề mặt nhẵn, màu trắng ngà, rìa nguyên. Nhuộm Gram và quan sát trên kính hiển vi thấy vi khuẩn chủng thuần, hình que, thẳng hoặc hơi cong, đứng riêng rẽ, hoặc kết dính nhau, bắt màu hồng Gram âm (hình 1). Những đặc điểm này phù hợp với đặc điểm sinh thái của chi Acetobacter.

Kết quả phân lập từ nước ép áo hạt quả vải cho thấy

chúng vi khuẩn thu được có hình thái khuẩn lạc, phản ứng nhuộm Gram phù hợp với vi khuẩn acetic.



a



b

Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc trên môi trường phân lập (a), hình ảnh nhuộm soi vi khuẩn trên kính hiển vi (b)

So sánh với một số nghiên cứu khác tại Việt Nam, chẳng hạn nghiên cứu phân lập *Acetobacter xylinum* từ nước dừa, nước mía hoặc các sản phẩm truyền thống như giấm gạo, cho thấy kết quả phân lập từ vải thiều tương đồng về hình thái và phản ứng sinh hóa [3], [7], [8]. Tương tự với các nguồn tự nhiên trên, ưu điểm của nguyên liệu vải thiều cũng là nguồn đường tự nhiên cao, dễ lên men, đồng thời tận dụng sản phẩm nông nghiệp của địa phương.

3.2. Kết quả định danh vi khuẩn bằng giải trình tự gen 16S rARN

Kết quả giải trình tự gen vi khuẩn cho kết quả như sau:

```
GTGAGTAACGCGTAGGGATCTGTCCATGGGTGG-
GGGATAACCTTGGGAAACCGAGGCTAATACCG-
CATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCG-
CCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTG-
GTTGGGTAAAGGCTGACCAAGGCGATGATCGA-
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG-
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG-
CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAG-
CCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAG-
GTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTAGCGGGGAC-
GATGATGACGGTACCCGCGAGAAGAAGCCCCGGC-
TAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAG-
GGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTA-
AAGGGCGCGTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATGT-
GAAATTCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTT-
GATACGTGGCGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTG-
GAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTG-
GGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCT-
GGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGT-
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC-
CACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTG-
GCTTGGCCATTCACTGTCTGATTAACGCGATAAG-
CACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT-
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG-
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCG-
CAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCT-
GTGTCCAGAGATGGGCATTTCTCGCAAGAGACCTC-
CAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGT-
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC-
GCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCAGCACGTCTGG-
GTGGGCACTCTAAAGGAAGTCCCGGTGACAAGC-
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCAT-
GGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAAT-
GGCGGTGACAGTGGGAAGCCAGGCAGCGATG-
CCGAGCGGATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCCG-
GATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTG-
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT-
GAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGT-
CACACCATGGGAGTTGGT
```

Trình tự đoạn gen được giải gồm 1277 cặp nucleotid và đoạn gen này được so sánh vi khuẩn trên Genbank (NCBI) với phần mềm nucleotide BLAST cho kết quả như sau:

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Gluconacetobacter entanii strain HWW100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Gluconacetobacter entanii	2359	2359	100%	0.0	100.00%	1391	MH424855.1
☒ Acetobacter sp. PA2.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acetobacter sp. PA2.2	2359	2359	100%	0.0	100.00%	1452	AF062474.2

Hình 2. So sánh trình tự vi khuẩn nghiên cứu trên Genbank sử dụng nucleotid BLAST

Kết quả giải trình tự gen 16S rARN và phân tích BLAST trên NCBI cho thấy chủng phân lập có mức tương đồng cao nhất (100%) với trình tự của *Gluconacetobacter entanii* strain HWW100 và *Acetobacter* sp. PA2.2, cho phép xác định chủng thuộc nhóm vi khuẩn acetic có khả năng sinh tổng hợp cellulose. Như vậy, có thể xác định chủng phân lập từ nước ép áo hạt quả vải là một chủng thuộc chi *Acetobacter* hoặc *Gluconacetobacter*.

3.3. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo màng cellulose

3.3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nước ép áo hạt quả vải

Chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường chứa các nồng độ khác nhau của nước ép áo hạt quả vải (10-100%).

Bảng 1. Đặc điểm, độ dày của màng do chủng nghiên cứu tạo thành ở các tỷ lệ nước ép áo hạt quả vải

Tỷ lệ của nước ép áo hạt quả vải	Đặc điểm màng BC	Độ dày của màng
10%	Màng trắng ngà, dai	10 mm
20%	Màng trắng ngà, dai	12 mm
40%	Màng trắng ngà, dai	13 mm
60%	Màng trắng ngà, dai	14,5 mm
80%	Màng trắng ngà, dai	14,5 mm
100%	Màng trắng ngà, dai	5 mm

Nồng độ 60% cho màng dày và bền nhất, cao hơn hẳn các tỷ lệ thấp (10-20%) và không bị ức chế như ở các tỷ lệ cao (80-100%). Điều này có thể giải thích rằng ở nồng độ quá thấp, nguồn đường và dinh dưỡng không đủ cho vi khuẩn phát triển mạnh, trong khi ở nồng độ quá cao, áp suất thẩm thấu và nồng độ acid hữu cơ có thể gây ức chế. Kết quả này tương tự các nghiên cứu trước đó trên các nguồn cơ chất khác, chẳng hạn nước dừa [7] hoặc nước mía [9], đều ghi nhận nồng độ đường tối ưu nằm trong khoảng trung bình, không quá thấp cũng không quá cao.

3.3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường

Bảng 2. Đặc điểm, độ dày của màng do chủng vi khuẩn tạo thành ở các pH khác nhau

pH ban đầu	Đặc điểm màng BC	Độ dày của màng	pH sau 7 ngày
4,7	Màng trắng ngà, dai	11 mm	3,34
5,2	Màng trắng ngà, dai	13 mm	3,45
5,7	Màng trắng ngà, dai	10,5 mm	3,60

Nuôi vi khuẩn tạo màng ở các môi trường pH ban đầu 4,7; 5,2 và 5,7, kết quả cho thấy ở pH 5,2 là tối ưu, tạo ra màng có độ dày lớn nhất là 13 mm (bảng 2).

3.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Bảng 3. Đặc điểm, độ dày màng của chủng vi khuẩn nghiên cứu theo thời gian

Thời gian	Đặc điểm màng BC	Độ dày của màng
Ngày 2	Màng trắng ngà, dai	1,5 mm
Ngày 3	Màng trắng ngà, dai	3,2 mm
Ngày 4	Màng trắng ngà, dai	4,5 mm
Ngày 5	Màng trắng ngà, dai	6,5 mm
Ngày 6	Màng trắng ngà, dai	10,0 mm
Ngày 7	Màng trắng ngà, dai	14,5 mm
Ngày 8	Màng trắng ngà, dai	15,0 mm
Ngày 9	Màng trắng ngà, dai	15,2 mm
Ngày 10	Màng trắng ngà, dai	15,3 mm
Ngày 11	Màng trắng ngà, dai	15,3 mm

Kết quả này cho thấy quá trình sinh tổng hợp cellulose mạnh nhất diễn ra trong 5-7 ngày đầu. Sau giai đoạn này, tốc độ tăng độ dày của màng chậm lại và gần như ổn định từ ngày 8 trở đi.

4. BÀN LUẬN

Quá trình phân lập từ màng sinh học trong nước ép áo hạt quả vải cho thấy các khuẩn lạc mang đặc điểm hình thái và nhuộm Gram đặc trưng của nhóm vi khuẩn acetic, phù hợp với cơ sở lý thuyết rằng các chủng thuộc chi *Acetobacter* thường hiện diện trong môi trường tự nhiên giàu đường như trái cây, nước dừa hay dịch quả lên men [3], [7]. Việc tuyển chọn được các chủng có khả năng tạo màng dày, dai trong môi trường dịch thể chứng tỏ tiềm năng sinh tổng hợp cellulose cao, đồng thời việc tận dụng phụ phẩm nông nghiệp địa phương như vải thiều vừa mang tính mới, vừa có ý nghĩa thực tiễn. Kết quả này có sự tương đồng với các nghiên cứu trong nước khi phân lập *Acetobacter* từ nước dừa, giấm gạo nhưng cho thấy khả năng ứng dụng thêm một nguồn cơ chất đặc thù của vùng trồng vải [7], [9].

Định danh bằng giải trình tự gen 16S rARN cho thấy chủng phân lập có mức tương đồng 100% với *Gluconacetobacter entanii* strain HWW100 và *Acetobacter* sp. PA2.2, khẳng định đây là nhóm vi khuẩn acetic có khả năng sinh cellulose. So với phương pháp cổ điển vốn chỉ dựa trên hình thái và sinh hóa, việc sử dụng công cụ sinh học phân tử mang lại độ tin cậy cao hơn, đồng thời chứng minh

sự đa dạng di truyền trong các chủng vi khuẩn sinh BC [5]. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Zahan Khairul A và cộng sự (2015) trên *Acetobacter xylinum* 0416, cũng cho thấy tính ổn định của loài trong khả năng tạo màng cellulose [10], từ đó mở ra triển vọng khai thác nhiều loài thuộc chi *Acetobacter* và *Gluconacetobacter* trong sản xuất màng cellulose ứng dụng công nghiệp.

Nồng độ 60% cho màng dày và bền nhất, cao hơn hẳn các tỷ lệ thấp (10-20%) và không bị ức chế như ở các tỷ lệ cao (80-100%). Điều này có thể giải thích rằng ở nồng độ quá thấp, nguồn đường và dinh dưỡng không đủ cho vi khuẩn phát triển mạnh, trong khi ở nồng độ quá cao, áp suất thẩm thấu và nồng độ acid hữu cơ có thể gây ức chế. Kết quả này tương tự các nghiên cứu trước đó trên các nguồn cơ chất khác, chẳng hạn nước dừa [7] hoặc nước mía [9], đều ghi nhận nồng độ đường tối ưu nằm trong khoảng trung bình, không quá thấp cũng không quá cao.

pH tối ưu là 5,2 phù hợp với đặc tính ưa acid của *Acetobacter*. Các giá trị pH thấp hơn (4,7) làm giảm sinh trưởng, trong khi pH cao hơn (5,7) vẫn cho màng nhưng kém bền hơn. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Zahan Khairul A và cộng sự (2015) [10], Jonas Rainer và cộng sự (1998) [4], khi khảo sát các chủng *Komagataeibacter xylinus* cho thấy pH tối ưu để tạo BC là 5,0-5,5.

Nguyên nhân tốc độ tăng độ dày của màng chậm lại và gần như ổn định từ ngày 8 trở đi có thể do nguồn dinh dưỡng trong môi trường cạn kiệt, đồng thời vi khuẩn có xu hướng sử dụng lại một phần cellulose như cơ chất hoặc màng bị phân giải bởi enzym cellulase do chính vi khuẩn tiết ra.

So sánh với nghiên cứu của Zahan Khairul A và cộng sự (2015) trên *Acetobacter xylinum* 0416, quá trình hình thành màng cellulose cũng đạt cực đại sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện pH và nguồn cơ chất thích hợp [10]. Kết quả này cho thấy thời gian thu hoạch tối ưu đối với chủng phân lập từ nước ép áo hạt quả vải là khoảng 7 ngày, khi màng đạt độ dày lớn nhất và bền chắc, trước khi xảy ra hiện tượng chũm hoặc suy giảm.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tiến hành phân lập, tuyển chọn và định danh một chủng vi khuẩn acetic từ quá trình lên men tự nhiên của nước ép áo hạt quả vải thiều (*Litchi chinensis*). Chủng thu được có đặc điểm hình thái, sinh hóa phù hợp với chi *Acetobacter*, đồng thời được khẳng định bằng giải trình tự gen 16S rARN với mức tương đồng cao nhất (100%) so với *Gluconacetobacter entanii* strain HWW100 và *Acetobacter* sp. PA2.2. Kết quả khảo sát cho thấy môi trường chứa 60% nước ép áo hạt quả vải ở pH 5,2 và thời gian nuôi cấy 7 ngày là điều kiện tối ưu cho sự phát triển và tổng hợp màng cellulose tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Breed Robert S, Murray E.G.D, Smith N.R. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The Williams and Wilkins Company, 1957: 1-1094.
- [2] El-Saied Houssni, Basta Altaf H, Gobran Riad H. Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and its application). *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 2004, 43 (3): 797-820.
- [3] Huỳnh Thị Ngọc Lan, Nguyễn Văn Thanh. Nghiên cứu các đặc tính màng cellulose vi khuẩn từ *Acetobacter xylinum* sử dụng làm màng trị bỏng. *Tạp chí Dược học*, 2006, 361: 30-35.
- [4] Jonas Rainer, Farah Luiz F. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 59 (1-3): 101-106.
- [5] Franco-Duarte Ricardo. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms-from past to present. *Microorganisms*, 2019, 7 (5): 130.
- [6] Matsutani Minenosuke, Hirakawa H, Yakushi T, Matsushita Kazunobu. Genome-wide phylogenetic analysis of *Gluconobacter*, *Acetobacter*, and *Gluconacetobacter*. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 315 (2): 122-128.
- [7] Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Phú Thành, Nguyễn Ngọc Thanh. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Acetobacter* sp. lên men tạo màng cellulose từ nước mía. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 2019, 55 (2): 192-202.
- [8] Nguyễn Thị Thùy Vân. Nghiên cứu đặc tính sinh học và khả năng tạo màng cellulose của vi khuẩn *Acetobacter xylinum* phân lập từ một số nguồn nguyên liệu ở Việt Nam. Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, 2009: 1-110.
- [9] Vandamme Erick J, De Baets S, Vanbaelen A, Joris K, De Wulf P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 59 (1-3): 93-99.
- [10] Zahan Khairul A, Pa'e N, Muhamad I.I. Monitoring the effect of pH on bacterial cellulose production and *Acetobacter xylinum* 0416 growth in a rotary discs reactor. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2015, 40: 1881-1885.