

TIỀM NĂNG THU NHẬN ENZYME BỀN NHIỆT TỪ NHÓM VI KHUẨN PHÂN LẬP TẠI SUỐI NƯỚC NÓNG BÌNH CHÂU

NGUYỄN KIM THOẠI, TRẦN THANH THỦY,
TRẦN THỊ HOA, TRẦN ĐÌNH MẮN

*Viện Công nghệ sinh học,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Suối nước nóng Bình Châu thuộc xã Bung Riềng, huyện Xuyên Mộc, tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu có hơn 70 điểm phun nước lộ thiên, nằm trong khu rừng nguyên sinh với diện tích khoảng 7 ha. Các kết quả nghiên cứu địa chất cho thấy suối nước nóng Bình Châu là quá trình hậu của núi lửa, khi núi lửa ngừng phun, các lò mắc ma vẫn tiếp tục đưa hơi nóng, khí và khoáng chất lên trên mặt đất tạo thành suối nóng. Thân cây chết và lá trầm rụng xuống suối đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa vật chất của vùng này. Suối nước nóng có nhiệt độ ở gần miệng giếng phun là 82-84°C, pH 7,5 – 7,7.

Mặt khác, hệ sinh thái địa nhiệt như suối nước nóng, giàn khoan khai thác dầu khí, miệng phun núi lửa... là nơi cư trú của hầu hết các vi sinh vật ưa nhiệt. Các vi sinh vật ưa nhiệt thường có khả năng sinh tổng hợp các enzyme bền nhiệt ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp khi điều kiện sản xuất đòi hỏi phải thực hiện ở nhiệt độ cao. Một trong những ứng dụng được biết đến của enzyme bền nhiệt trong ngành công nghệ sinh học là Taq polymerase thu nhận từ cổ khuẩn ưa nhiệt *Thermus aquaticus* [1]. Enzyme bền nhiệt với các đặc tính như tốc độ phản ứng nhanh, hiệu quả với nồng độ thấp ở điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp, tính đặc hiệu cơ chất cao và không độc đã được minh chứng trong rất nhiều nghiên cứu [2-4]. Do vậy cho đến nay nhóm enzyme này vẫn được tiếp tục tìm kiếm, khai thác từ các nguồn vi sinh vật ưa nhiệt tự nhiên ở các hệ sinh thái khác nhau [5-6]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả phân lập nhóm vi khuẩn hiếu khí từ suối nước nóng Bình Châu và khảo sát khả năng sinh tổng hợp một số enzyme ngoại bào bền nhiệt của chúng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu: Thu thập các mẫu nước (bề mặt và tầng giữa) và bùn tại 4 vị trí lấy mẫu bằng các dụng cụ chuyên dụng từ suối nước nóng. Mỗi vị trí lấy mẫu được lấy với 3 mức bề mặt, giữa và đáy ngoại trừ điểm phun của suối nước nóng, mỗi điểm và tầng được đánh giá cảm quan màu sắc, đo nhiệt độ và pH khi thu mẫu.

Phương pháp phân lập vi sinh vật ưa nhiệt: được thực hiện theo phương pháp của Rüdiger và cộng sự (1992): các mẫu nước, bùn được pha loãng từ 10^{-1} – 10^{-3} và được gát trên môi trường khoáng dinh dưỡng (Peptone: 0,5%; cao nấm men 0,3%; hỗn hợp vitamin 0,1%; dung dịch vi lượng 0,1%, thạch chịu nhiệt 1,5%). Các đĩa thạch được nuôi ở 60-70°C trong 48 giờ. Tách sạch riêng rẽ các khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch và cấy truyền trên các ống thạch nghiêng, đồng thời lưu giữ trong dịch glycerol ở -20°C [7].

Xác định hoạt tính amylase, protease và cellulase: các chủng vi khuẩn được cấy chấm điểm hoặc được nuôi trên môi trường lỏng rồi ly tâm thu lấy dịch và nhỏ trên các đĩa môi trường khoáng có bổ sung các cơ chất tương ứng như tinh bột, sữa gầy và CMC. Các đĩa được đặt trong tủ ấm 65-70°C trong 48 giờ và xác định hoạt tính các enzyme ngoại bào bằng cách đổ các dung dịch Lugol vào đĩa có bổ sung tinh bột, coomassive blue vào đĩa có bổ sung sữa gầy và đỏ Congo vào đĩa có bổ sung CMC [8].

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

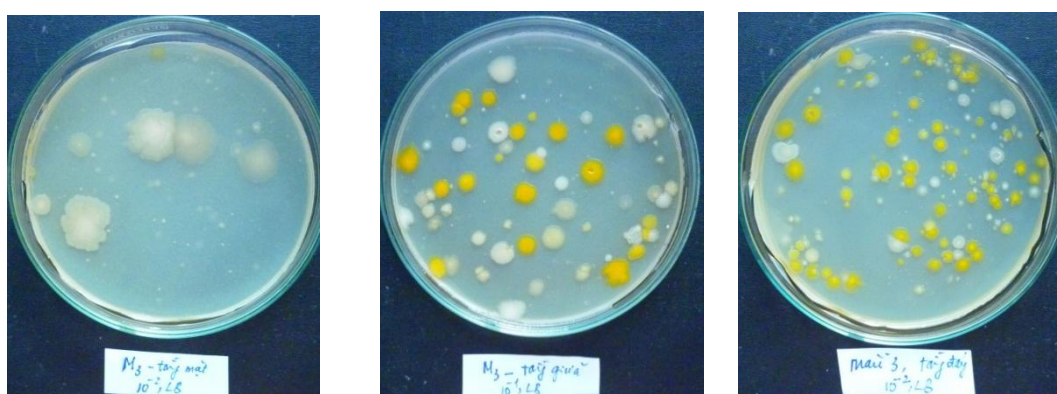
1. Thành phần và số lượng các chủng vi khuẩn hiếu khí ưa nhiệt

Thành phần số lượng các chủng vi khuẩn hiếu khí, ưa nhiệt ở mẫu nước và bùn được xác định dựa trên các dạng khuẩn lạc trên môi trường dinh dưỡng khoáng ở nhiệt độ 60-70°C. Kết quả thu được cho thấy mật độ và thành phần các chủng vi khuẩn hiếu khí ở hệ sinh thái suối nước nóng không cao, thường dao động khoảng 10^2 - 10^3 , tùy thuộc loại mẫu (bảng 1, hình 1). Các mẫu tầng giữa và tầng đáy có số lượng và thành phần vi sinh vật cao hơn so với các mẫu nước bề mặt. Môi trường địa nhiệt thường có nhiệt độ cao hơn ngưỡng nhiệt độ sinh trưởng bình thường của các eukaryote, do vậy hầu hết ở đây chủ yếu tồn tại nhóm vi sinh vật bao gồm cổ khuẩn, vi khuẩn và virut ký sinh [9] và mật độ vi sinh vật thường ít hơn so với các hệ sinh thái khác. Ở 4 vị trí lấy mẫu, thu nhận được tổng số 64 chủng vi khuẩn hiếu khí (bảng 1).

Bảng 1

Số lượng và thành phần vi khuẩn hiếu khí phân lập tại các vị trí lấy mẫu suối nước nóng Bình Châu

Vị trí lấy mẫu	Tầng mẫu	Đặc điểm mẫu			Số lượng	Số loại khuẩn lạc)
		Nhiệt độ	pH	Cảm quan		
1	Bề mặt	50-60	6	Nước trong	$8,05 \times 10^3$	8
	Giữa	50-60	8	Toàn cạnh màu nâu đất	$0,7 \times 10^1$	7
	Đáy	50-60	6,5	Toàn cạnh bùn đen	$2,84 \times 10^2$	8
2	Bề mặt	50-60	6,5	Nước trong	$8,8 \times 10^3$	5
	Giữa	50-60	7	Có 2 lớp: lớp nước đục và lớp cạnh đen	$9,2 \times 10^3$	6
	Đáy	50-60	6,5	Bùn đặc màu đen	2×10^2	8
3	Bề mặt	50-60	6,5	Nước trong	$5,8 \times 10^1$	5
	Giữa	50-60	6	Phía trên có nước màu đen, dưới có cạnh đen	$4,8 \times 10^3$	6
	Đáy	50-60	6	Toàn cạnh bùn đen	3×10^3	7
4	Điểm phun	82	7,5	Phía trên có nước lờ lờ, dưới có cạnh ở đáy	$1,2 \times 10^3$	2
Tổng số						64

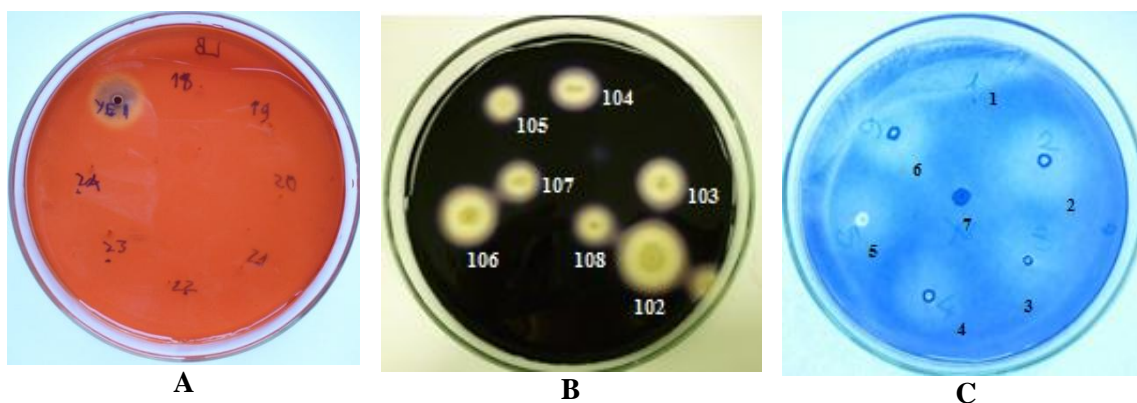


Hình 1: Hình ảnh khuẩn lạc một số chủng vi khuẩn hiếu khí phân lập ở vị trí lấy mẫu số 3 (nhiệt độ 50-60°C) suối nước nóng Bình Châu

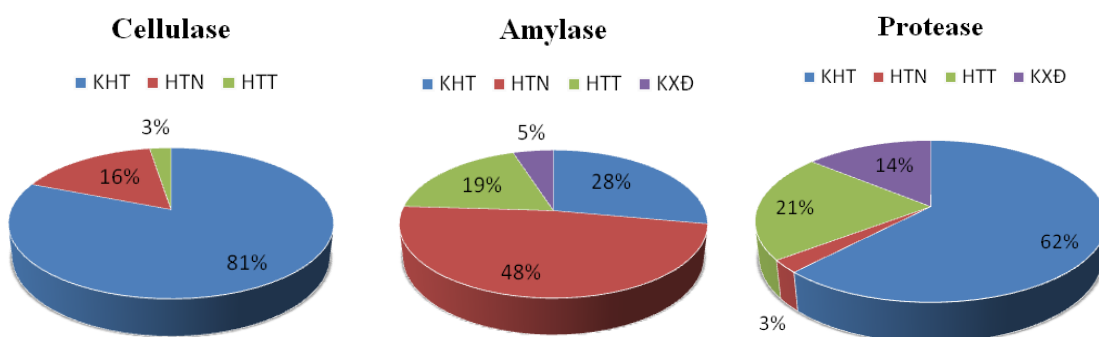
Các chủng phân lập, làm sạch, cấy riêng rẽ trên các ống thạch nghiêng và bảo quản trong dịch glycerin để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.

2. Khả năng sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào của các chủng vi khuẩn hiếu khí phân lập tại suối nước nóng Bình Châu

Các chủng riêng rẽ được cấy chấm điểm trên đĩa môi trường khoáng có bổ sung cơ chất đặc hiệu hoặc được nuôi cấy trên môi trường dịch thể rồi ly tâm lấy dịch trong và nhỏ trên đĩa thạch khoáng cơ chất đã được đục lỗ. Hoạt tính của enzyme được đánh giá dựa trên hiệu số của đường kính của vòng phân giải cơ chất với đường kính khuẩn lạc hoặc đường kính lỗ thạch. Các chủng có đường kính vòng phân giải cơ chất dưới 2 mm được coi là không có hoạt tính, nhỏ hơn 13 mm được coi là hoạt tính nhỏ và lớn hơn 13 mm được gọi là hoạt tính to. Tất cả 64 chủng vi khuẩn hiếu khí phân lập được từ suối nước nóng Bình Châu được kiểm tra khả năng phân giải CMC, tinh bột và sữa gầy. Kết quả được minh họa ở Hình 2 và đánh giá tỷ lệ các chủng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào ở Hình 3.



Hình 2: Vòng phân giải các cơ chất của các chủng vi khuẩn hiếu khí phân lập ở suối nước nóng Bình Châu. A: Vòng phân giải CMC; B: Vòng phân giải tinh bột; C: Vòng phân giải sữa gầy



Hình 3: Tỷ lệ các chủng vi khuẩn hiếu khí phân lập ở suối nước nóng Bình Châu có khả năng tổng hợp cellulase, amylase và protease ngoại bào

Kết quả từ Hình 3 cho thấy tỷ lệ các chủng có hoạt tính cellulase, amylase protease chiếm lần lượt là 19%, 67% và 24%, trong khi có đến 81%, 28% và 62% các chủng không có hoạt tính cellulase, amylase và protease.

Những vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp cellulase hầu hết được phân lập từ tầng đáy của suối nước nóng Bình Châu. Do điều kiện sinh thái ở đây nằm giữa vùng rừng tràm nên lá cây, thân cây nhỏ rụng xuống suối hình thành lớp bùn đáy giàu cellulose. Các vi sinh vật tồn tại trong môi trường này dễ dàng thích nghi và có khả năng tổng hợp các nguồn sinh khối đó để phục vụ quá trình sinh trưởng và phát triển, do vậy chúng có khả năng phân giải các hợp chất lignocellulose.

Protease là nhóm enzyme cần thiết cho hầu hết các cơ thể sinh vật để phân cắt các protein trong quá trình sinh trưởng, trao đổi chất của mình. Tinh bột tuy không có mặt ở hệ sinh thái suối nước nóng nhưng những vi khuẩn ở đây vẫn có khả năng thủy phân tinh bột. Điều này cho thấy các chủng vi khuẩn ở suối nước nóng vẫn có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất sinh học trong điều kiện môi trường nhất định. Tuy nhiên các chủng vi sinh vật tổng hợp mỗi loại enzyme có thể dưới dạng ngoại bào, nội bào hoặc trên màng tế bào.

Để khai thác được tiềm năng của những enzyme này thì cần thiết phải có những nghiên cứu sâu hơn về đặc tính của enzyme cũng như phân loại các chủng vi khuẩn đến loài. Các chủng vi khuẩn phân lập ở suối nước nóng Bình Châu hầu hết đều sinh tổng hợp enzyme ở nhiệt độ 60-70°C. Đây là nhiệt độ sinh trưởng của nhóm vi khuẩn ưa nhiệt. Theo các công bố về các enzyme bền nhiệt thì nhiệt độ tối ưu của các enzyme được tạo ra do vi sinh vật còn cao hơn so với nhiệt độ sinh trưởng của vi sinh vật. Do đó cho thấy, những enzyme bền nhiệt của các chủng vi khuẩn ưa nhiệt được phân lập tại suối nước nóng Bình Châu có tiềm năng ứng dụng cao trong thực tiễn.

III. KẾT LUẬN

Qua khảo sát, từ 4 vị trí thu mẫu với 10 mẫu (nước và bùn) của suối nước nóng Bình Châu đã phân lập được 64 chủng vi khuẩn hiếu khí, ưa nhiệt sinh trưởng ở nhiệt độ 60-70°C.

Các chủng vi khuẩn có hoạt tính cellulase, amylase protease chiếm tỷ lệ lần lượt là 19%, 67% và 24% trong tổng số mẫu vi khuẩn phân lập được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chien, A., D. B. Edgar, J. M. Trela**, 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127(3): 1550-1557.
2. **Ward, O. P., M. Moo-Young**, 1988. Thermostable enzymes. *Biotechnol Adv* 6(1): 39-69.
3. **Haki, G. D., S. K. Rakshit**, 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol* 89(1): 17-34.
4. **Turner, P., G. Mamo, E. N. Karlsson**, 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb Cell Fact* 6: 9.
5. **Bhalla, A., N. Bansa, S. Kumar, K. M. Bischoff, R. K. Sani**, 2013. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresour Technol* 128: 751-759.
6. **Ishino, S., Y. Ishino**, 2014. DNA polymerases as useful reagents for biotechnology – the history of developmental research in the field. *Front Microbiol* 5: 465.
7. **Rüdiger, A., J. C. Ogbonna, H. Märkl, G. Antranikian**, 1992. Effect of gassing, agitation, substrate supplementation and dialysis on the growth of an extremely thermophilic archaeon *Pyrococcus woesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 37(4): 501-504.

8. **Phạm Thị Trân Châu, Phan Tuấn Nghĩa**, 2006. Công nghệ sinh học: Enzyme và ứng dụng, Tập 3. Nxb. Giáo dục.
9. **López-López, O., M. E. Cerdán, M. I. González-Siso**, 2013. Hot spring metagenomics. *Life* 2: 308-320.

**POTENTIAL OF THERMOSTABLE ENZYMES PRODUCTION FROM
BACTERIAL STRAINS ISOLATED IN BINH CHAU HOT SPRING**

**NGUYEN KIM THOA, TRAN THANH THUY,
TRAN THI HOA, TRAN ĐÌNH MẠN**

SUMMARY

Currently a great interest in exploitation and preservation of geothermal ecologies is investigated not only in the developed countries but also in the developing world because these obtain a huge potential of the valuable genetic materials, such as thermostable enzymes, antibacterial, anti-fungus and antiviral, that are applied in different fields in life and help to improve the biobased economy. Vietnam has an abundant and diverse hot spring system scattered distributing from the north to the south, thus a plenty of species and bioactive compound could be obtained. Binh Chau hot spring is one of the open-air hottest temperature in our country. We collected the water and slugged samples at 4 different positions in Binh Chau and isolated 64 thermophilic bacterial strains. These strains were screened their abilities to produce cellulase, amylase and protease on the mineral petri dishes containing the specific substrates for each enzyme. The percentage of extracellular enzymatic production of cellulase, amylase and protease is 19%, 67% and 24%, respectively. The results indicated that the thermophilic bacterial strains isolated in Binh Chau and their thermostable enzyme have an extremely valuable as biocatalysts for industrial and biotechnological purposes such as food processing, textile industries.