

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ SINH TỔNG HỢP XENLULAZA CỦA MỘT SỐ CHỦNG *Streptomyces* PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM

NGUYỄN THẾ TRANG, PHẠM THỊ THU PHƯƠNG

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

NGUYỄN THÚY ANH

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

Công nghệ sinh học đã và đang được nghiên cứu, ứng dụng rộng rãi trong ngành nông nghiệp tại Việt Nam cũng như nhiều nước trên thế giới. Trong đó công nghệ vi sinh đóng vai trò vô cùng quan trọng, đặc biệt là ứng dụng các vi sinh vật có ích đã mang lại một cuộc cách mạng trong nông nghiệp. Các nhà khoa học đã tập trung vào việc phân lập vi sinh vật từ tự nhiên hay tạo ra các chủng giống vi sinh vật mới, có khả năng nuôi dưỡng để sử dụng trực tiếp hoặc làm chế phẩm sinh học. Hiện nay, sử dụng vi sinh vật trong xử lý môi trường là một hướng đi đúng đắn và đã được thế giới cũng như trong nước quan tâm với những lợi ích: thân thiện, không tạo ra các sản phẩm độc hại cho môi trường, chi phí xử lý thấp [2; 3; 5; 6]. Việc sử dụng các chủng vi sinh vật xử lý môi trường được coi là biện pháp hữu hiệu nhằm giải quyết triệt để vấn đề ô nhiễm nước thải, rác thải trong hoạt động và sản xuất của ngành nông nghiệp tạo ra [7; 8; 9].

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Chủng giống vi sinh vật

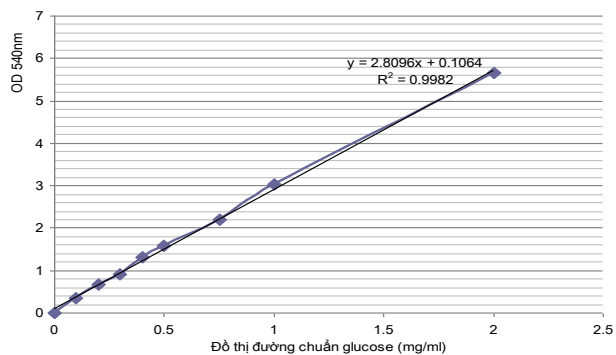
Chủng *S. althioticus* ĐA09 phân lập từ phế thải rom rạ tại Đông Anh và chủng *S. misionensis* ĐM03 được phân lập từ phế thải mùn gỗ tại Đại Mỗ, Bắc Từ Liêm (Hà Nội).

2. Môi trường lên men

Môi trường Gause 1 (g/l): tinh bột tan: 10, K₂HPO₄: 0,5; MgSO₄.7H₂O: 1,025; KNO₃: 1, NaCl: 0,5; FeSO₄.7H₂O: 0,18; agar: 20, nước cất 1.000 ml, pH 7. Môi trường Gause-CMC (g/l): tinh bột tan: 10, K₂HPO₄: 0,5; MgSO₄.7H₂O: 1,025; KNO₃: 1, NaCl: 0,5; FeSO₄.7H₂O: 0,18; CMC 1%; agar: 20, nước cất 1.000 ml, pH 7.

3. Phương pháp nghiên cứu

Xác định hình thái khuẩn lạc, tế bào và khả năng sinh trưởng theo Nguyễn Lân Dũng và cộng sự [1]. Định lượng hoạt tính xenlulaza bằng phương pháp đường khử của Bernfeld, độ hấp thụ và nồng độ glucoza được vẽ theo chương trình Excel. Đường chuẩn nồng độ của glucoza được xây dựng có phương trình $y = 2,8096x + 0,1064$. Trong đó, y là độ hấp phụ (OD) ở bước sóng 540 nm, x là nồng độ glucoza (mg/ml) [4].

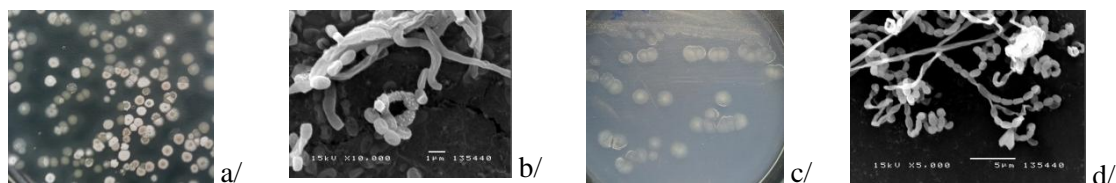


Hình 1: Đồ thị đường chuẩn glucoza theo Bernfeld

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào

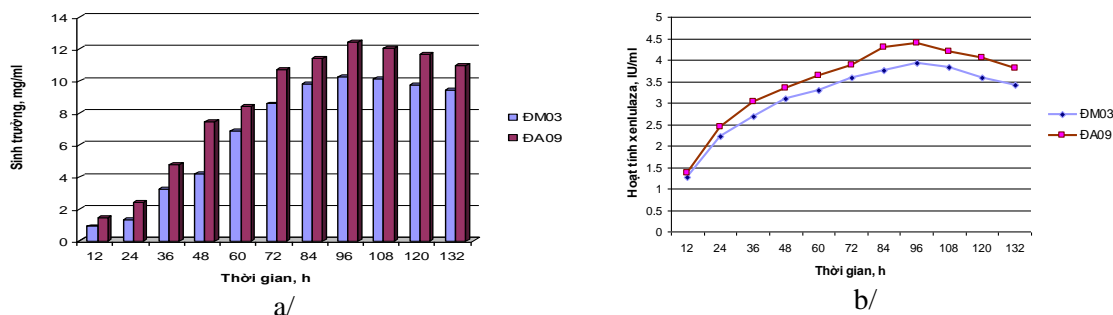
Hình dạng khuẩn lạc và tế bào của hai chủng xạ khuẩn trình bày ở hình 2.



Hình 2: Hình dạng khuẩn lạc và tế bào của hai chủng xạ khuẩn
a; b/ Chủng *S. althioticus* ĐA09; c; d/ Chủng *S. misionensis* ĐM03

2. Ảnh hưởng của thời gian đến sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza

Thời gian có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng xạ khuẩn. Các chủng xạ khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trong môi trường Gauze 1, 37°C trong điều kiện lắc 200 vòng/phút. Cứ sau 24 giờ lấy dịch nuôi cấy xác định khả năng sinh trưởng bằng phương pháp cân sinh khối khô, theo dõi đến 132 giờ lên men. Hoạt tính xenlulaza được xác định bằng phương pháp đường khử cho kết quả được thể hiện ở hình 3.

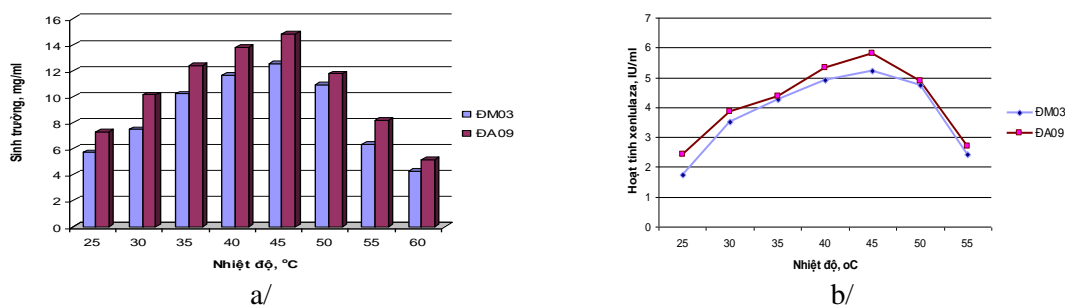


Hình 3: Khả năng sinh trưởng (a) và sinh tổng hợp xenlulaza (b)

Kết quả hình 3a cho thấy 2 chủng xạ khuẩn đều bắt đầu sinh trưởng mạnh ở thời điểm 72 giờ, tại thời điểm 120 giờ cả hai chủng đều đạt sinh khối cao nhất, chủng ĐM03 đạt 10,23 mg/ml, ĐA09 đạt 12,47 mg/ml. Từ 144 giờ 2 chủng chuyển sang pha suy giảm. Như vậy, thời gian tối ưu cho sinh trưởng của 2 chủng xạ khuẩn nghiên cứu là tại thời điểm 96 giờ. Kết quả hình 3b cho thấy ở thời điểm 96 giờ 2 chủng xạ khuẩn sinh tổng hợp xenlulaza cao nhất, ĐA09 đạt xấp xỉ 4,4 IU/ml, ĐM03 đạt xấp xỉ 3,9 IU/ml. Tuy nhiên, tại thời điểm 108 và 120 giờ enzyme giảm đi không đáng kể do vậy với mục đích dùng chủng để làm chế phẩm vi sinh có thể nuôi các chủng này từ 96 ÷ 120 giờ là đạt yêu cầu.

3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza

Nhiệt độ là yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng tới quá trình xử lý phế thải trong đồng ủ. Quá trình xử lý phế thải bằng phương pháp ủ cần nhiệt độ cao để quá trình phân hủy mạnh, tức là các chủng vi sinh vật sinh trưởng tốt và phân giải được các chất xenluloza có trong đồng ủ làm cho đồng ủ nóng lên, chính vì vậy cần lựa chọn chủng chịu nhiệt. Các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường Gause 1, lắc 200 vòng/phút, và nuôi ở dải nhiệt độ 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 và 60 °C, tiến hành lọc, cân sinh khối khô sau 5 ngày. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng được trình bày ở hình 4.

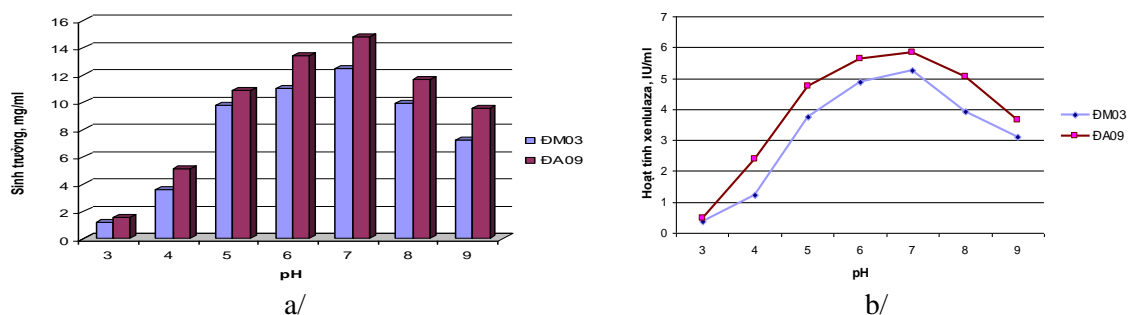


Hình 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng (a) và sinh tổng hợp xenulaza (b)

Kết quả cho thấy các chủng sinh trưởng tốt từ 30 ÷ 55 °C, tốt nhất ở 45 °C chủng ĐM03 sinh khối khô đạt 12,56 mg/ml, chủng ĐA09 đạt 14,83 mg/ml, dưới 30 °C và trên 55 °C cả 2 chủng sinh trưởng đều yếu. Kết quả sinh tổng hợp xenulaza được xác định sau nuôi mẫu 96 giờ trình bày ở hình 4b cho thấy tại điểm nhiệt độ 45 °C cả 2 chủng sinh tổng hợp xenulaza cao nhất, chủng ĐA09 đạt 5,79 IU/ml, chủng ĐM03 đạt 5,2 IU/ml.

4. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng và sinh tổng hợp xenulaza

Dải pH ban đầu của môi trường Gauze 1 từ 3 ÷ 9 được chọn để nghiên cứu tác động tới sinh trưởng của 2 chủng ĐM03 và chủng ĐA09. Nuôi ở nhiệt độ 45 °C, sau 120 giờ lấy dịch nuôi cấy xác định khả năng sinh trưởng bằng phương pháp cân sinh khối khô. Kết quả trình bày ở hình 5 cho thấy 2 chủng có khả năng sinh trưởng được ở dải pH từ 3 ÷ 9, nhưng sinh trưởng tốt nhất ở pH 6 ÷ 8. Chủng ĐM03 sinh khối khô đạt 12,51 mg/ml, chủng ĐA09 đạt 14,8 mg/ml ở pH 7. Việc nghiên cứu ảnh hưởng của pH ban đầu có ý nghĩa lớn trong nhân giống nhằm tạo ra lượng sinh khối nhiều hơn để sản xuất chế phẩm vi sinh vật.

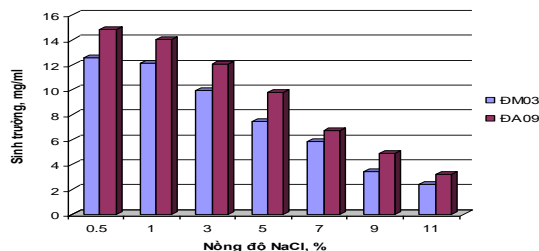


Hình 5: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng (a) và sinh tổng hợp xenulaza (b)

Ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh tổng hợp xenulaza của 2 chủng xạ khuẩn được theo dõi ở dải pH 3 ÷ 9, trong môi trường Gauze 1 có bổ sung CMC, xác định hoạt tính xenulaza sau 96 giờ lấy mẫu. Kết quả hình 5 cho thấy 2 chủng xạ khuẩn sinh tổng hợp xenulaza cao nhất ở pH 7, ĐM03 đạt 5,25 IU/ml và ĐA09 đạt 5,8 IU/ml. Như vậy, pH tối ưu cho sinh tổng hợp xenulaza của 2 chủng xạ khuẩn nghiên cứu là pH 7.

5. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sinh trưởng của các chủng xạ khuẩn

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối đến sinh trưởng các chủng xạ khuẩn được nuôi trong môi trường Gauze 1 bổ sung các nồng độ NaCl: 1, 3, 5, 7, 9 và 11 %, 0,5 % là mẫu đối chứng, lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ 45°C, sau 120 giờ nuôi cấy xác định sinh trưởng bằng phương pháp cân sinh khối khô. Kết quả được trình bày ở hình 6.

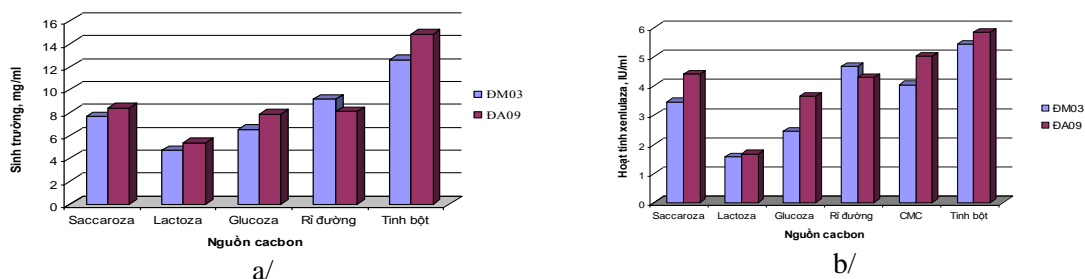


Hình 6: Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sinh trưởng của hai chủng xạ khuẩn

Hình 6 cho thấy 2 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ NaCl từ 1 ÷ 7%. Từ 7% cả 2 chủng hầu như không sinh trưởng.

6. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Gause 1 thay thế nguồn cacbon tinh bột bằng các nguồn cacbon khác như: glucoza, saccaroza, lactoza, ri đường sao cho lượng cacbon cho vào tương đương với lượng cacbon có trong môi trường cơ bản. Nuôi ở 45 °C sau 96 giờ lấy mẫu xác định hoạt lực xenlulaza và khả năng sinh trưởng của chúng. Kết quả được trình bày dưới hình 7.

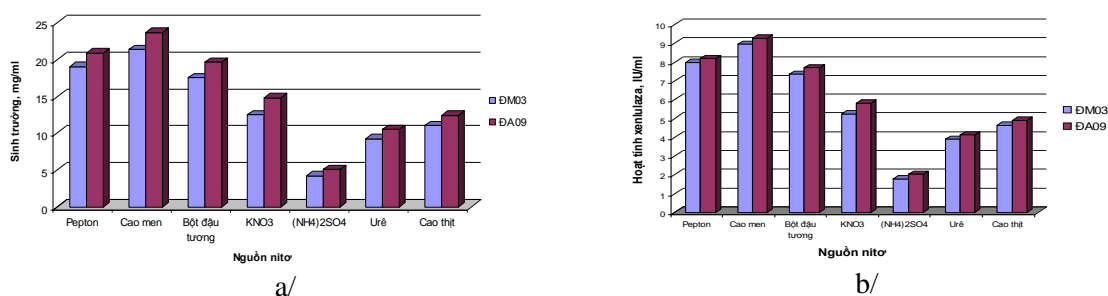


Hình 7: Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng (a) và sinh tổng hợp xenlulaza (b)

Kết quả hình 7 cho thấy khi thay thế tinh bột bằng các nguồn cacbon khác thì 2 chủng xạ khuẩn sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme yếu hơn rất nhiều.

7. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza

Xenluloza là một polysaccarit khó phân giải vì thế vi sinh vật cần phải tổng hợp một lượng lớn xenlulaza, có chủng sử dụng hơn 60% tổng nhu cầu nitơ cho việc sinh enzyme ngoại bào. Các chủng xạ khuẩn được nuôi trong môi trường Gause 1 nhưng nguồn nitơ trong môi trường cơ bản được thay thế bằng các nguồn nitơ khác với lượng tương ứng ban đầu: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , pepton, CMC, cao thịt, cao men. Nuôi ở nhiệt độ 45°C, lắc 200 vòng/phút, sau 120 giờ thu kết quả.



Hình 8: Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng (a) và sinh tổng hợp xenlulaza (b)

Kết quả hình 8 cho thấy 2 chủng xạ khuẩn sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza trong môi trường thay thế nguồn nitơ: cao men, pepton và bột đậu tương là cao nhất. Trong môi trường có chứa nguồn nitơ vô cơ thì các chủng xạ khuẩn sinh trưởng và sinh xenlulaza yếu.

III. KẾT LUẬN

Đã lựa chọn được một số điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza của 2 chủng xạ khuẩn, chúng sinh trưởng tốt ở khoảng nhiệt độ $30 \div 50^{\circ}\text{C}$ sau 72 giờ nuôi cấy và cho thấy đây là những vi sinh vật ưa nhiệt, khả năng sinh trưởng ở pH rộng từ $5 \div 9$, chịu NaCl từ $1 \div 7$. Sinh trưởng đạt cực đại sau 42 giờ và sinh tổng hợp xenlulaza đạt cực đại của chủng ĐM03 đạt 3,9 IU/ml và chủng ĐA09 đạt 4,4 IU/ml sau 108 giờ nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch và Phạm Văn Ty**, 1977. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, Tập 3, Nxb. KHKT, Hà Nội.
2. **Nguyễn Thị Minh Hằng và Đỗ Văn Bút**, 2013. Phân lập và tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn có khả năng phân hủy xenluloza cao từ đất trồng rừng, Báo cáo khoa học, Hội nghị Khoa học Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2013, Nxb. KHTN & CN, Hà Nội, trang 180-184.
3. **Trần Đình Mẫn, Nguyễn Thế Trang, Phan Thị Tuyết Minh, Nguyễn Văn Xuân**, 2009: Xây dựng mô hình xử lý rác thải sinh hoạt bằng công nghệ vi sinh tại thị trấn Lâm - Ý Yên - Nam Định, Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc 2009, Nxb. Đại học Thái Nguyên. Thái Nguyên, trang 924-927.
4. **Bernfeld, A. P.**, 1995. Methods in Enzymology, 1: 149-158.
5. **Bhat, M. K.**, 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotech, Adv, 18: 355-383.
6. **Choppra, S. and Meththa**, 1985: Influence of various nitrogen and carbon sources on the production of pect - cellulose and proteolytic enzymes by *A. niger*, J. Microbiol.
7. **Forgaty, W. M., C. T. Kelly**, 1990: Amylases. Amyloglucosidase and related glucanase, In : Microbial enzym and Biotechnology. 2nd Ed, ed. By W.M Forgaty W.M and Kelly C.T, Elsevier Applied Science, London and NewYork, p.71-183.
8. **Gauze, G. F; Preobrajenskaja T.P; Sveshnicova M.A; Tegekhova L.P; Maximova T.S**, 1983. Opgedelited aktinomycetov uzd "Nauka- Moskava".
9. **Immanuel, G., R. Dhanusa, P. Prenma and A. Palavesam**, 2006. International Journal of Environment Science and Technology, 3 (1): 25-34.

RESEARCH ON THE POSSIBILITY OF BIRTH AND SYNTHETIC CELLULASE BY *Streptomyces* STRAINS ISOLATED IN VIETNAM

NGUYEN THE TRANG, PHAM THI THU PHUONG, NGUYEN THUY NGA

SUMMARY

Recently, biotechnology widely applied in agriculture in Vietnam as well as in many countries around the world plays a very important role, especially in the application of beneficial microorganisms. Currently, the use of microorganisms in environmental remediation is a right way with the benefits: friendly, does not create toxic products for environmental expenditure lower processing costs,... the use of microorganisms for environmental treatment is considered as effective measures to solve the problem thoroughly polluted waste water, waste and production activities in the agricultural sector to create out.