

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ENZYME NGOẠI BÀO CỦA VI KHUẨN *Bacillus licheniformis* KG7 ƯA NHIỆT TẠI NGUỒN NƯỚC NÓNG KÊNH GÀ NINH BÌNH

NGUYỄN QUỐC TRUNG

Học viện Nông nghiệp Việt Nam

NGÔ THỊ HIỀN

Chi cục Quản lý chất lượng nông lâm thủy sản Thanh Hóa

Enzyme là một sản phẩm quan trọng từ sinh vật mà chúng ta có thể khai thác, đặc biệt là từ đối tượng vi sinh vật. Với hoạt lực xúc tác vượt trội so với các chất xúc tác vô cơ, enzyme thực sự đã mang lại những thành tựu to lớn cho nhiều lĩnh vực như: công nghiệp, nông nghiệp, y học, bảo vệ môi trường... Do đó việc khai thác và sử dụng enzyme đang được rất nhiều nước trên thế giới quan tâm. Hàng năm thị trường enzyme trong công nghiệp trên thế giới đạt trên 3,3 tỉ USD năm 2010 và ước đạt 4,4 tỉ USD trong 2015 (BBC research, 2011).

Tuy nhiên với bản chất là protein enzyme rất dễ bị biến tính bởi những điều kiện cực đoan của môi trường đặc biệt là bởi nhiệt độ cao. Hơn nữa hầu hết các quá trình sản xuất đều cần thiết diễn ra ở nhiệt độ cao để tăng hiệu suất phản ứng, tiết kiệm nhiên liệu sản xuất... Vì vậy việc nghiên cứu và khai thác các enzyme bền nhiệt là một yêu cầu bức bách đang được đặt ra. Trong đó, các vi khuẩn ưa nhiệt thường sống ở môi trường có nhiệt độ cao thường xuyên như: suối nước nóng, núi lửa, núi rác... là nguồn tài nguyên sinh vật quan trọng sử dụng trong sản xuất các enzyme bền nhiệt.

Việt Nam là nước có nguồn suối nước nóng rất phong phú nhưng việc khai thác các nguồn lợi từ vi sinh vật trong đó còn rất ít được quan tâm. Suối nước nóng Kênh Gà, huyện Gia Viễn, Ninh Bình đã được nghiên cứu khai thác từ lâu, nhưng nhiệt độ và tính chất của nguồn nước đã bị thay đổi theo thời gian. Vì vậy cần thiết phải kịp thời nghiên cứu và khai thác hiệu quả những tác dụng trị liệu của nguồn nước, đặc biệt là nguồn tài nguyên vi sinh vật ưa nhiệt tại đây nhằm hướng tới các ứng dụng công nghiệp.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu: Mẫu nước lấy từ nguồn khoáng nóng Kênh Gà – Ninh Bình. Thời gian tiến hành: từ ngày 15/01 đến 15/07 năm 2009.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập vi khuẩn ưa nhiệt: Mẫu nước nóng được cấy trên môi trường thạch LB lỏng (trong 1 lít: Trypton 1g, Yeast extract 0.5g, NaCl 1g, bổ sung Agar và dẫn nước đến 1L), ở nhiệt độ 50°C. Theo dõi hình thái khuẩn lạc, tế bào, Gram +/-, khả năng di động để phân lập các chủng khác nhau. Lựa chọn các chủng có khuẩn lạc rõ, khả năng sinh trưởng, phát triển mạnh ở điều kiện nhiệt độ cao

Chiến lược phân tử vùng DNA-16S: Tách chiết DNA từ dịch nhân nuôi vi khuẩn (trong môi trường LB, lắc sau 24h) theo quy trình của Ferris (1996) có bổ sung protease K vào đệm chiết để phá thành tế bào của vi khuẩn bền nhiệt (PT Nghĩa, 2007). Nhân bản gen DNA 16S bằng phản ứng PCR với cặp mồi RIB16F (5'- gag ttt gat ccc ggc tca g-3') và RIB16R (5'- gtc acc ttg tta cga ctt -3') theo chu kỳ nhiệt (95°C-3', 35 chu kỳ: 94°-60", 55°-50", 72°-70" và 72°-7'). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng kit QIAquick (Qiagen). Sử dụng sản phẩm PCR đã tinh sạch làm khuôn trong PCR với từng mồi đơn RIB16F; RIB16R và

DTCS Quick Start Master Mix (Beckman coulter) với ddNTP đánh dấu huỳnh quang. Chế độ nhiệt: 1 chu kỳ: 96°-20"; 50°-20"; 60°-4'. Sản phẩm PCR được tinh sạch một lần nữa bằng kit QIAquick để đọc bằng máy CEQ8000 (Beckman Coulter, Mỹ). Trình tự đoạn DNA quy định rRNA 16S được đọc cả 2 chiều và lắp ghép lại. So sánh trình tự trên genebank sử dụng công cụ BLAST N 2.2.31, NCBI.

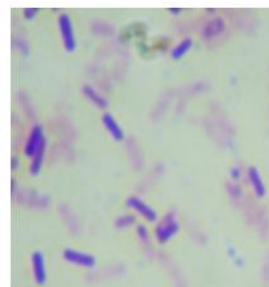
Xác định ảnh hưởng của các yếu tố môi trường: Ảnh hưởng của pH: chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB lỏng lắc ở 50°C, 150 vòng/phút trong 24h với 12 mức pH (5,5 - 6,0 - 6,5 - 7,0 - 7,5 - 8,0 - 8,5 - 9,0 - 9,5 - 10,0). Sau mỗi 2h tiến hành đo mật độ vi khuẩn bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm. Số liệu được sử dụng để xây dựng đường cong sinh trưởng để xác định pH tối ưu cho chủng vi khuẩn. Xác định ảnh hưởng của nhiệt độ: Chủng vi khuẩn được lựa chọn được nuôi trong môi trường LB lỏng lắc ở pH tối ưu, 150 vòng/phút trong 24h với 7 mức nhiệt độ (40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C). Sau mỗi 2h tiến hành đo mật độ vi khuẩn bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm. Số liệu được sử dụng để xây dựng đường cong sinh trưởng để xác định nhiệt độ tối ưu cho chủng vi khuẩn

Thử khả năng sinh enzyme ngoại bào: Dịch nuôi cấy vi khuẩn ở điều kiện tối ưu sau 24h được ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút và tiến hành xác định hoạt tính enzyme amylase, protease và cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Xác định ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính của enzyme ngoại bào theo phương pháp Anson cải tiến (Yang và Wang, 1994) sử dụng HCl để dừng phản ứng.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả phân lập

Sau khi phân lập trên môi trường LB rắn, chúng tôi sơ bộ thu được 8 chủng vi khuẩn (KG1, KG2, KG3, KG4, KG5, KG6, KG7 và KG8) sinh trưởng mạnh ở điều kiện 50°C. Các chủng này đều được đánh giá bước đầu về hình thái, khả năng di động trong đó tất cả được xác định là loại Gram dương. Để tiến hành các thí nghiệm đánh giá điều kiện nuôi cấy tối ưu và hoạt tính các enzyme ngoại bào, chúng tôi lựa chọn chủng KG7 có tốc độ sinh trưởng mạnh nhất để định danh dựa trên trình tự đoạn gen mã hóa rRNA 16S. Đặc điểm hình thái chủng KG7: khuẩn lạc màu trắng, trong, tròn, nhẵn và có vầng đục trên bề mặt. Tế bào Gram dương, hình que và có khả năng di động mạnh.



Hình 1. Hình thái tế bào isolate KG7 sau khi nhuộm Gram (NQTrung, 2009)

2. Kết quả định danh chủng KG7

DNA của chủng KG7 được tách chiết bằng quy trình Ferris, 1996 cải tiến khi tế bào vi khuẩn không bị phá vỡ ở điều kiện nhiệt độ cao, để khắc phục enzyme protease K bền nhiệt được bổ sung vào đệm chiết. DNA tổng số của chủng KG7 được kiểm tra trên gel Agarose 1% cho chất lượng tốt, băng DNA sáng, nét, ít bị đứt gãy (hình 2).



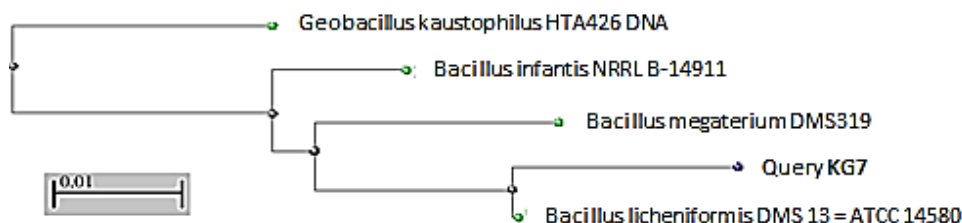
Hình 2. Băng DNA tổng số của isolate KG7 (trái) so sánh với DNA ladder λ HinIII (phải). (NQTrung, 2009)

Mẫu DNA chủng KG7 được sử dụng để nhân dòng đoạn gen rRNA 16S giữa 2 cặp mồi RIB16 F&R. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di đúng kích thước dự đoán khoảng 770 bp. Sản phẩm PCR tinh sạch tiến hành đọc trực tiếp trên máy CEQ8000 theo 2 chiều xuôi (RIB16F) và ngược (RIB16R) sau đó ghép trình tự. Kết quả

trình tự so sánh với chủng *Bacillus licheniformis* DSM 13 = ATCC 14580 thu được như Hình 3 và Hình 4 cho thấy chủng KG7 thuộc chi *Bacillus*, tạm đặt tên là *Bacillus licheniformis* KG7. Đây là loài vi khuẩn có tiềm năng ứng dụng to lớn trong công nghiệp với khả năng sinh enzyme ngoại bào rất đa dạng: proteases, pectate lyases, lipases and nhiều loại enzyme phân hủy polysaccharide (Veith, 2004). Toàn bộ genome của loài đã được giải trình tự với tên chủng *Bacillus licheniformis* DSM 13 = ATCC 14580 (Genbank, NCBI).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1256 bits(680)	0.0	718/736(98%)	3/736(0%)	Plus/Minus
Query 1	ACCTTCGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGT	60		
Sbjct 96626	ACCTTCGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGT	96567		
Query 61	GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGAGGCATGCTGATCCGC	120		
Sbjct 96566	GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGAGGCATGCTGATCCGC	96507		
Query 121	GATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCTGTGCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACCTGAGAAC	180		
Sbjct 96506	GATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCTGTGCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACCTGAGAAC	96447		
Query 181	AGATTGTGGGATTGGCTTAGAATCGCGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCCATTTGATAGC	240		
Sbjct 96446	AGATTGTGGGATTGGCTTAGAATCGCGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCCATTTGATAGC	96387		
Query 241	ACGTGTGTAGCCAGTCCATAAAGGGCATGATGATTTGACGTGCTCCCACTTCCTCC	300		
Sbjct 96386	ACGTGTGTAGCCAGTCCATAAAGGGCATGATGATTTGACGTGCTCCCACTTCCTCC	96327		
Query 301	CTTTCTCACCCCGAGTCACCTTAGAGTGCACCACTGAATGCTGGCACTAAGATCAAGGG	360		
Sbjct 96326	GTTTGTACCGGCGAGTCACCTTAGAGTGCACCACTGAATGCTGGCACTAAGATCAAGGG	96267		
Query 361	TTGCGCTCGTTGCGGACTTAAACCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACAACCATGCA	420		
Sbjct 96266	TTGCGCTCGTTGCGGACTTAAACCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACAACCATGCA	96207		
Query 421	CCACCTGTCACTCTGCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTC	480		
Sbjct 96206	CCACCTGTCACTCTGCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTC	96147		
Query 481	AGACCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAARCCACATGCTCCACCGCTTGTGCG	540		
Sbjct 96146	AGACCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAARCCACATGCTCCACCGCTTGTGCG	96087		
Query 541	GGCCCCGTCAATTGGTTTGAATTTAGTCTTCGACCGTACTCCCAAGGGCGGAGTGT	600		
Sbjct 96086	GGCCCCGTCAATTGGTTTGAATTTAGTCTTCGACCGTACTCCCAAGGGCGGAGTGT	96027		
Query 601	AATGCGTTTGTCTGACGACTAAAGGGCGGAAACCCCTTAACACTTAGCACTCATCGTT-A	659		
Sbjct 96026	AATGCGTTTGTCTGACGACTAAAGGGCGGAAACCCCTTAACACTTAGCACTCATCGTTA	95967		
Query 660	CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTGCTCCCGAGGCT-CGGCGCTCAGCG	718		
Sbjct 95966	CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTGCTCCCGAGGCT-CGGCGCTCAGCG	95908		
Query 719	TCAGTTACAGAACAGA 734			
Sbjct 95907	TCAGTTACAGAACAGA 95892			

Hình 3: So sánh trình tự của chủng KG7 với chủng *Bacillus licheniformis* DSM 13=ATCC 14580 trên Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

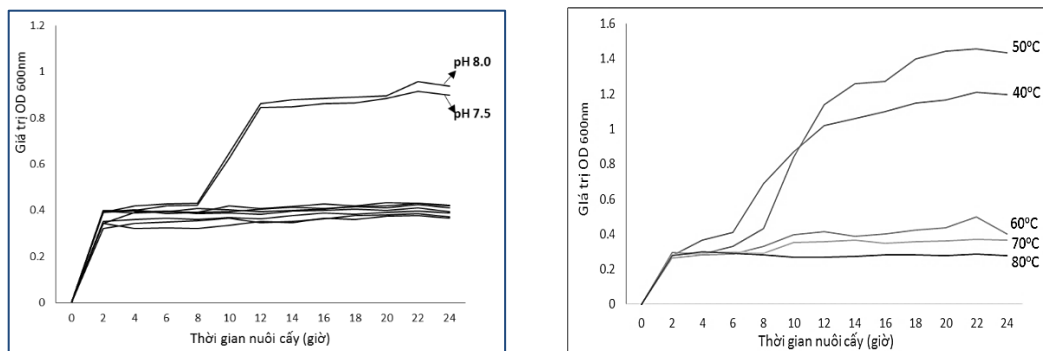


Hình 4: Cây phân loại chủng KG7 xây dựng bằng phần mềm BLASTN 2.2.31 (www.ncbi.nlm.nih.gov) (NQTrung, 2009)

3. Kết quả xác định ảnh hưởng của nhiệt độ, pH tối ưu

Chủng KG7 sinh trưởng trong môi trường LB lỏng, lác mạnh nhất ở pH 7,5-8,0, các mức pH <7,5 và >8,0 đều ức chế sinh trưởng của vi khuẩn (Hình 5). Nhiệt độ tối ưu là 50°C, đây là nhiệt độ tối thích cho loài *Bacillus licheniformis* nói chung (Veith, 2004). Chủng KG7 được

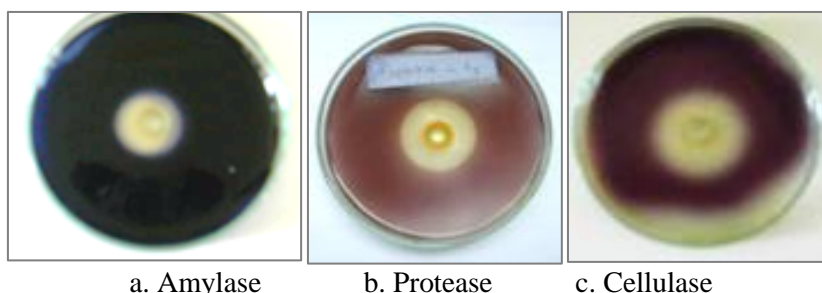
phân lập từ nguồn nước nóng nên có tiềm năng sinh các enzyme bền nhiệt rất hữu ích trong công nghiệp, vì vậy chúng tôi tiếp tục đánh giá khả năng sinh một số enzyme ngoại bào của chủng này.



Hình 5: Đường cong sinh trưởng trong 24h của chủng KG7 ở các điều kiện pH (trái) và nhiệt độ (phải)

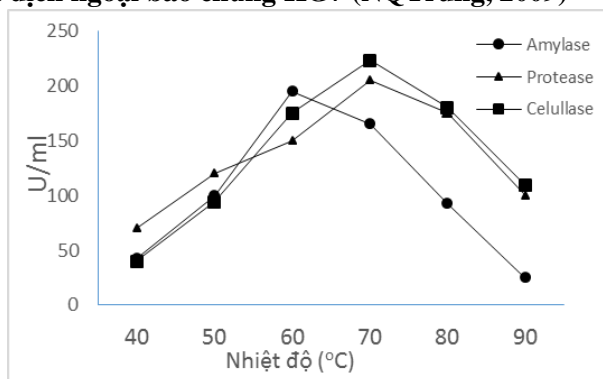
4. Đánh giá enzyme ngoại bào chủng KG7

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng, lắc và sau 24h hút dịch enzyme để thử hoạt tính. Hoạt tính của enzyme được thử bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Sau khi thử hoạt tính, chúng tôi nhận thấy chủng KG7 có khả năng sinh ra các loại enzyme: amylase, protease, cellulase.



Hình 6: Vòng phân giải cơ chất của dịch ngoại bào chủng KG7 (NQTrung, 2009)

Tiếp tục đánh giá hoạt tính xúc tác của 3 enzyme ở các mức nhiệt độ khác nhau (hình 7) thu được amylase có hoạt tính xúc tác cao nhất ở 60°C, protease và cellulase có hoạt tính xúc tác cao nhất ở 70°C. Như vậy 3 enzyme ngoại bào của chủng KG7 đều có thể xếp vào nhóm bền nhiệt (thermophilic enzyme) với khoảng nhiệt độ hoạt động trên 60°C. Trong công nghiệp, việc ứng dụng enzyme đồng thời với nâng nhiệt độ xử lý nguyên, vật liệu sẽ tăng tốc độ phản ứng, tăng năng suất và giảm chi phí. Vì vậy, cần tiếp tục đánh giá để tiến tới khai thác các enzyme bền nhiệt từ chủng vi khuẩn ưa nhiệt KG7 từ nguồn khoáng nóng của Việt Nam.



Hình 7: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của các enzyme amylase, protease, cellulase

III. KẾT LUẬN

Đã phân lập và định danh được chủng KG7 thuộc loài *Bacillus licheniformis*, tạm đặt tên là *Bacillus licheniformis* KG7. Kết quả xác định trong môi trường LB lỏng, KG7 sinh trưởng tốt nhất ở 50°C và pH 7.5-8.0. Tiếp tục đánh giá khả năng sinh enzyme bền nhiệt của chủng KG7 xác định được hoạt tính của 3 loại enzyme ngoại bào là: amylase, cellulase, protease. Hoạt tính cao nhất của enzyme amylase là 60°C (195,2U/ml), của cellulase là 70°C (205U/ml) và protease là 70°C (223,4U/ml).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Dereeper A., S. Audic, J.M. Claverie, G. Blanc**, 2010. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. BMC Evol Biol (PubMed)
2. **Ferris, M. J., G. Muyzer, D.M. Ward**, 1996. Applied Environmental Microbiology, 62(2): 340-6.
3. **Phan Tuấn Nghĩa, Nguyễn Quốc Trung, Nguyễn Cảnh Thắng, Nguyễn Thị Thanh Hương, Lê Tuấn Anh, Nguyễn Thị Vân Anh, Nguyễn Anh Bảo**, 2007. Phân lập chủng vi khuẩn sinh enzyme amylase ngoại bào bền nhiệt từ suối nước nóng Bang, Quảng Bình. Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng, 3 (4): 37-43.
4. **Veith, B., C. Herzberg, S. Steckel, J. Feesche, K. H. Maurer, P. Ehrenreich, S. Bäumer, A. Henne, H. Liesegang, R. Merkl, A. Ehrenreich, G. Gottschalk**, 2004. Journal of Molecular Microbiology Biotechnology, 7(4): 204-211.
5. **Yang SS., JY. Wang**, 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. Bot. Bull. Acad. Sin. 40: 259-265
6. **Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner, W. Miller**, 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol 2000; 7(1-2): 203-214.
7. Enzymes in Industrial Applications: Global Markets 2011. BBCresearch.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR ENZYMES OF THERMOPHILIC *Bacillus licheniformis* KG7 STRAIN IN KENH GA HOT SPRING, NINH BINH

NGUYEN QUOC TRUNG, NGO THI HIEN

SUMMARY

A potentially new thermophilic bacteria strain (code name KG7) was from Kenh Ga hot spring, Ninh Binh province. It is rod-shaped, high mobility and Gram-positive bacteria. Study on DNA sequence of rRNA 16S between primers pair (RIB16F&R) identified KG7 strain was belong to *Bacillus* genus with 98% homologous to *Bacillus licheniformis* DSM 13 = ATCC 14580 strain (GenBank). In this study, we named KG7 strain as *Bacillus licheniformis* KG7. Growth curve of KG7 strain was constructed in 24h in liquid LB medium and optimal condition was determined as in 50°C and pH 7.5-8.0. Extracellular enzyme assay revealed activities of protease, amylase and cellulase after growing KG7 strain in 24h. Thermostability of these enzymes was analyzed with modified Anson's method. Highest activity of amylase was in 60°C (195,2U/ml), cellulase was in 70°C (205U/ml) and protease was 70°C (223,4U/ml). The result of thermophilic bacteria isolation and thermostable enzymes characterization was one of the contribution to utilization of micro-organism resource of Vietnam.