

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN SẢN XUẤT PROTEASE KIỀM TÍNH NGOẠI BÀO TỪ ĐẤT

Nguyễn Thị Hà¹ và Nguyễn Châu Sang²

¹ Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

² Lô 12A Khu Công nghiệp Trà Nóc, Quận Ô Môn, Thành phố Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 24/05/2014

Ngày chấp nhận: 30/12/2014

Title:

Isolation, selection and identification of bacteria producing external alkaline protease from soil

Từ khóa:

Bacillus pumilus Bp24, *Bacillus pumilus* DBF12 27, *Bacillus safensis* AL-75, protease kiềm

Keywords:

Alkaline protease, *Bacillus pumilus* Bp24, *Bacillus pumilus* DBF12 27, *Bacillus safensis* AL-75

ABSTRACT

Twenty three aerobic bacteria strains were isolated from 20 soil samples collected from slaughterhouse and landfill areas using Horikoshi I medium (pH 9). Their colonies fairly varied in shape, color and size. All of them were rod-shaped, capable of moving/motile and of 1-2.9 μm in length. Only 11 strains showed protease activity on Horikoshi I medium with 1% supplemented casein by forming hydrolytic halo ranged from 5.3 to 13.2 mm in diameter after incubating for 24 hours at 30°C. Later, these strains were grown in broth medium and then examined for their activity. As a result, except strain 11, the remaining displayed protease activity at different levels from 0,12 U/mL to 3,16 U/mL. Among them, strain LM6 originated from soil samples at the landfill revealed the highest activity of 3,16 U/mL. Analysis of morphology, physiology, biochemistry and 16S rDNA sequences indicated that LM4 shared 81% sequence homology with *Bacillus pumilus* Bp24; LM6 showed 99% sequence similarity with *Bacillus pumilus* DBF 12 27 and LM7 closely related 99% with *Bacillus safensis* AL-75.

TÓM TẮT

Từ 20 mẫu đất thu tại lò giết mổ gia súc và bãi rác, 23 dòng vi khuẩn hiếu khí đã được phân lập trên môi trường kiềm Horikoshi I (pH 9). Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn tương đối đa dạng về hình dạng, màu sắc và kích thước. Tất cả các dòng vi khuẩn đều có hình que và di động, kích thước từ 1 μm đến 2,9 μm . Có 11 dòng vi khuẩn biểu hiện hoạt tính protease trên môi trường kiềm Horikoshi I có bổ sung casein 1% với đường kính thủy phân trong khoảng 5,3 - 13,2 mm sau 24 giờ ủ ở 30°C. Theo dõi hoạt tính của protease trong môi trường lỏng cho thấy, ngoại trừ dòng LM10, tất cả các dòng còn lại đều biểu hiện hoạt tính protease ở các mức độ khác nhau trong khoảng 0,12 - 3,16 U/mL. Trong đó, dòng LM6 có nguồn gốc từ đất lò mổ cho hoạt tính cao nhất là 3,16 U/mL. Kết quả định danh dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy dòng LM4 tương đồng với dòng *Bacillus pumilus* Bp24 với mức độ tương đồng là 81%; LM6 tương đồng 99% với *Bacillus pumilus* DBF12 27 và LM7 tương đồng với *Bacillus safensis* AL-75 ở mức 99%.

1 GIỚI THIỆU

Enzyme nói chung và protease nói riêng đóng vai trò quan trọng trong các lĩnh vực sản xuất và đời sống của con người. Trước những đòi hỏi ngày càng cao về hiệu quả sản xuất cũng như những điều kiện trong các quy trình công nghiệp và ảnh hưởng của biến đổi khí hậu, nhu cầu về nguồn enzyme có hoạt tính cao hơn, bền hơn được đặt ra như một lẽ tất yếu. Trong khoảng 3000 loại enzyme đã được nghiên cứu, phần lớn đều thuộc nhóm trung tính (Genckal, 2004). Những enzyme này chỉ hoạt động tốt trong một khoảng pH và nhiệt độ rất hạn chế, do vậy chúng vẫn chưa là nguồn enzyme lý tưởng cho sản xuất. Chính vì lẽ đó, tìm kiếm những enzyme thay thế mới từ nguồn vi sinh vật vô cùng đa dạng là xu hướng chung trên thế giới và ở Việt Nam. Một trong những loại enzyme có thể thỏa mãn được yêu cầu trên đó là protease kiềm tính. Do đó, đây là một nghiên cứu khởi đầu mang tính cấp thiết và khả thi cao với nhiều tiềm năng ứng dụng cao.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Các dòng vi khuẩn trong tự nhiên từ đất lò giết mổ và bãi rác.

2.2 Phương pháp

– Thu mẫu: Các mẫu đất khác nhau bao gồm lò giết mổ và bãi rác trong khu vực hai tỉnh Cần Thơ và Hậu Giang.

– Phân lập: Sử dụng môi trường Horikoshi I có bổ sung cơ chất casein, pH 9 (Horikoshi, 1971). Glucose 10g, Polypeptone 5 g, Yeast extract 5 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, Na_2CO_3 10 g, Agar 20 g.

– Đánh giá khả năng sinh hoạt tính của các dòng vi khuẩn: 5 μl dịch vi khuẩn (10^9 CFU/mL) nhỏ trên đĩa thạch đã được đục lỗ và ủ ở 30°C trong vòng 24 giờ. Các dòng vi khuẩn có hoạt tính protease tạo vòng halo trên môi trường Horikoshi I. Đo đường kính thủy phân để đánh giá sơ bộ hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn. Trong đó, Đường kính thủy phân = Đường kính vòng Halo – Đường kính khuẩn lạc.

– Nuôi cấy thu nhận protease thô.

Vi khuẩn từ môi trường thạch nghiêng được cấy vào 25 ml môi trường Horikoshi I (Horikoshi, 1971) trong bình tam giác 250 ml. Những bình tam giác này sau đó được ủ ở 30°C, lắc 250 vòng/phút trong 24h. Sau đó, 2 ml dịch vi khuẩn (10^9 CFU/ml) được chuyển sang nuôi cấy trong 50

ml dung dịch Horikoshi I trong bình tam giác 250 ml ở 30°C, lắc 120 vòng/phút. Sau mỗi 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h và 96h, 1 ml dịch nuôi cấy được lấy ra và ly tâm ở 4°C, tốc độ 14.000 vòng/phút trong 5 phút. Phần dịch nổi được sử dụng để kiểm tra hoạt tính protease bằng phương pháp Kunitz cải tiến (1947).

– Xác định hoạt tính protease: Dịch protease được kiểm tra hoạt tính bằng phương pháp Kunitz cải tiến.

– Đơn vị hoạt tính protease (U/mL) được biểu hiện qua đơn vị TU là lượng enzyme cần thiết để thủy phân casein cho ra 1 μmol tyrosine trong một phút 37°C và pH9.

– Khảo sát thành phần, khối lượng của các protease trong dịch nuôi cấy vi khuẩn: Kết tủa protein bằng ammonium sulfate bão hòa. Sử dụng SDS-PAGE và kỹ thuật điện di hoạt tính protease với cơ chất casein.

– Xử lý số liệu: Các nghiệm thức của thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Excel và Statgraphics centurion phiên bản XVI.

– Định danh các dòng vi khuẩn: Các dòng vi khuẩn có hoạt tính cao được chọn để tiến hành định danh dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự; kết hợp với các đặc tính hình thái và sinh lý, sinh hóa đã được xác định.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập vi khuẩn sinh protease kiềm

Từ 20 mẫu đất thu ở các bãi rác và cơ sở giết mổ gia súc, 23 dòng vi khuẩn đã được phân lập ở điều kiện hiếu khí trên môi trường Horikoshi I (pH 9). Trong đó, mười chín dòng được phân lập từ 10 mẫu đất thu ở cơ sở giết mổ heo và bốn dòng được phân lập từ 10 mẫu đất thu từ bãi rác. Các dòng được ký hiệu là LMx và BRx với LM (lò mổ), BR (Bãi rác) và x là số thứ tự dòng vi khuẩn phân lập được

3.2 Đặc điểm hình thái và hoạt tính enzyme protease của các dòng vi khuẩn

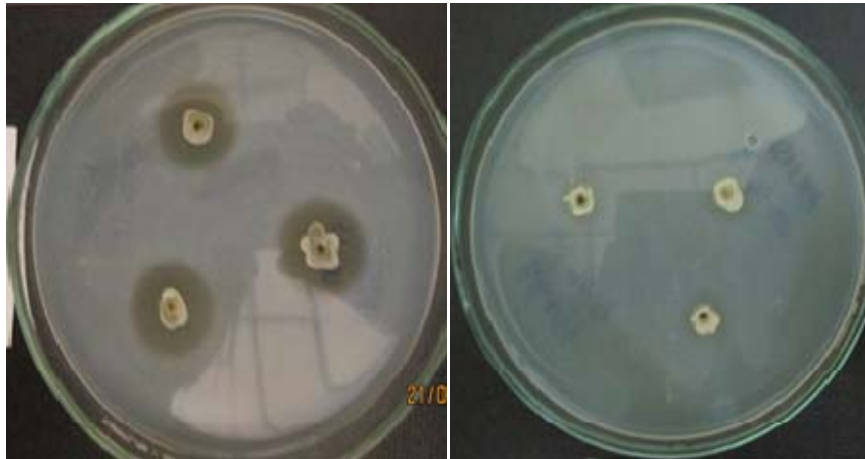
Thời gian trung bình để các tế bào vi khuẩn phát triển trên môi trường Horikoshi I (pH 9) là 12 giờ. Đa số các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, màu cà phê sữa nhạt, độ nổi lồi và bìa nguyên. Đường kính khuẩn lạc biến thiên từ 0,5 mm đến 3 mm. Khi quan sát trong môi trường nước cất vô trùng dưới kính hiển vi ở vật kính 100X (độ phóng đại 1000 lần), tất cả các dòng vi khuẩn có hình que

với chiều dài từ 1 μm đến 2,9 μm và đều có khả năng chuyển động.

Khả năng sinh hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn trên môi trường thạch.

Sau 24 giờ ủ ở 30°C, sau khi nhuộm với TCA 10%, có 11/23 dòng vi khuẩn thể hiện khả năng tạo

vòng halo trên môi trường Horikoshi I có bổ sung casein nồng độ 1%. Đường kính thủy phân của các dòng vi khuẩn biến thiên từ 5,8 mm đến 13,2 mm (Hình 2). Trong đó, các dòng LM1, LM5, LM6, LM7, LM8, LM9 có đường kính thủy phân lớn hơn 7 mm, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ 5% so với các dòng còn lại.



A **B**
Hình 1: Vòng halo trên môi trường Horikoshi I bổ sung casein

A. Có tạo vòng halo; B. Không tạo vòng halo

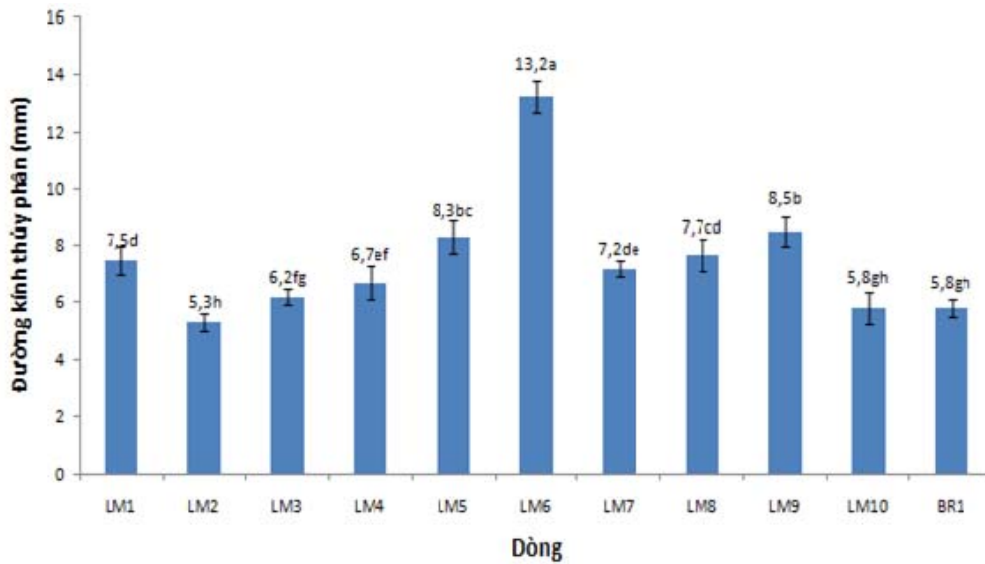
Phương pháp kiểm tra hoạt tính enzyme protease nhờ vào sự thủy phân casein tạo vòng halo là một phương pháp đơn giản và phổ biến dùng để đánh giá sơ bộ hoạt tính protease của vi khuẩn trong bước đầu phân lập. Tuy nhiên, để có kết quả chuyên biệt và chính xác hơn, các dòng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường lỏng và dịch enzyme thô được xác định hoạt tính bằng phương pháp Kunizt cải tiến (Kunizt, 1947).

3.3 Khả năng sinh hoạt tính của các dòng vi khuẩn trên môi trường lỏng

Để khảo sát hoạt tính protease khi nuôi cấy các dòng vi khuẩn trong môi trường lỏng, dịch enzyme thô của các dòng vi khuẩn (LM1, LM2, LM3, LM4, LM5, LM6, LM7, LM8, LM9, LM10, BR1) thu ở các thời điểm khác nhau được ủ với cơ chất casein ở 37°C trong dung dịch đệm glycine-NaOH pH 9 và phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung 600 μL acid trichloroacetic 10%. Kết quả cho thấy, dòng LM10 hầu như không có hoạt tính enzyme

trong môi trường lỏng. Các dòng LM6, LM7 và LM4 có hoạt tính cao nhất, đều trên 1,5 U/mL sau 60 giờ và 84 giờ nuôi cấy, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ 5% so với các dòng vi khuẩn còn lại.

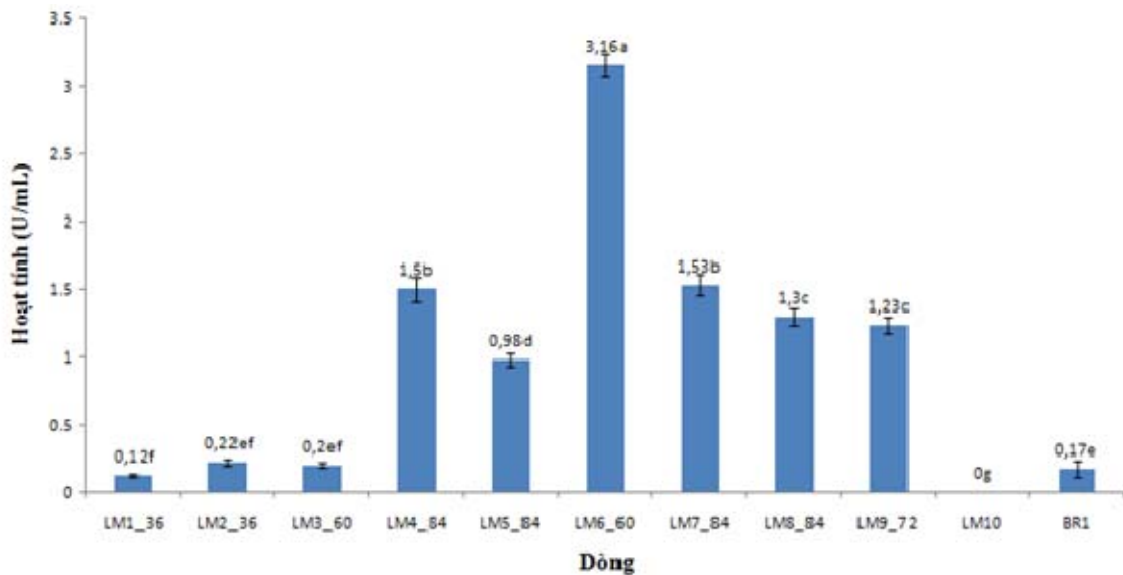
Theo kết quả nhận được dòng LM1 và dòng LM10 tuy có vòng tròn đường kính thủy phân khá lớn lần lượt là 7,5 mm và 5,8 mm (Hình 2) nhưng hoạt tính rất thấp (LM1) hoặc không thể hiện hoạt tính (LM10) trong dung dịch nuôi cấy (Hình 2). Trong khi đó, dòng LM4 có vòng tròn đường kính thủy phân nhỏ hơn so với LM1 là 6,7 mm (Hình 1), lại cho hoạt tính tốt khi nuôi cấy ở môi trường lỏng (1,5 U/mL) sau 84 giờ nuôi cấy. Điều này có thể là do thời điểm khảo sát hoạt tính của các dòng trên hai loại môi trường là khác nhau và sự khác biệt về bản chất của môi trường nuôi cấy. Trước đó, trong một nghiên cứu của Mao và *ctv.* (1992) đã cho thấy rằng dòng *Bacillus licheniformis* tạo kính thủy phân rất hẹp nhưng cho hoạt tính rất cao khi nuôi cấy trong môi trường lỏng.



Hình 2: Đường kính thủy phân của 11 dòng vi khuẩn trên môi trường Horikoshi I bổ sung casein sau 24 giờ ủ ở 30°C

Hoạt tính protease cao nhất ở dòng LM6 (3,16 U/mL) và thấp hơn ở hai dòng LM7 (1,53 U/mL) và LM4 (1,5 U/mL), khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại ở mức 5%. Hoạt tính protease thô trong nghiên cứu của Rajes và *ctv.*

(2005) là 2,43 U/mL ở dòng *Bacillus mojavensis*; Khan và *ctv.* (2011) là 0,7 U/mL ở dòng *Bacillus CEMB 10370*, tương đối thấp hơn so với các dòng khảo sát trong nghiên cứu này.



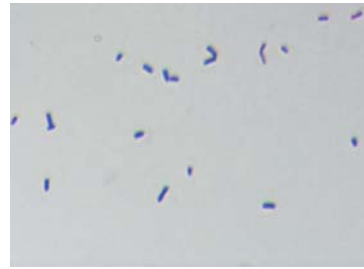
Hình 3: Hoạt tính của các dòng vi khuẩn tại thời điểm đạt cao nhất

Ghi chú: giá trị x sau tên dòng là thời điểm đạt hoạt tính cao nhất của dòng đó

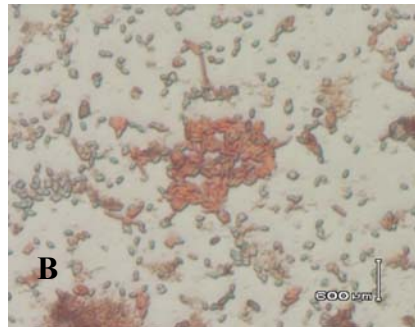
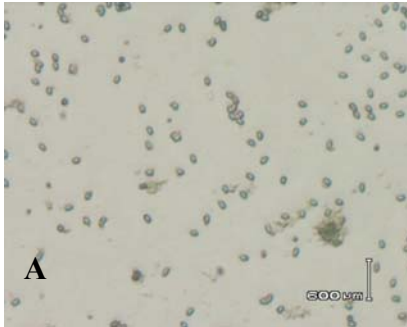
3.4 Định danh các dòng vi khuẩn sinh protease kiềm tính cao

3.4.1 Định danh qua đặc điểm hình thái và sinh lý

Các dòng vi khuẩn LM6, LM7 và LM4 được tiến hành nhuộm gram và nhuộm nội bào tử. Cả ba dòng đều cho kết quả là gram dương và có khả năng hình thành nội bào tử. Rất có thể 3 dòng này đều thuộc giống *Bacillus* (Hình 4 và 5).



Hình 4: Kết quả nhuộm gram dòng LM6 ở độ phóng đại 1000 lần

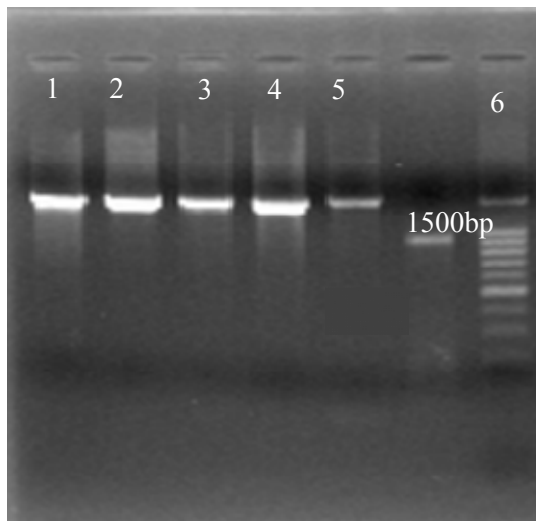


Hình 5: Kết quả nhuộm nội bào tử của dòng LM4 (A) và LM6 (B) ở độ phóng đại 1000 lần

3.4.2 Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

ADN của ba dòng vi khuẩn LM7, LM6 và LM4

đã được ly trích và khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F và 1495R. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các mẫu DNA đều xuất hiện băng ở vị trí khoảng 1500bp so với thang chuẩn (Hình 6).



Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm PCR của các dòng vi khuẩn

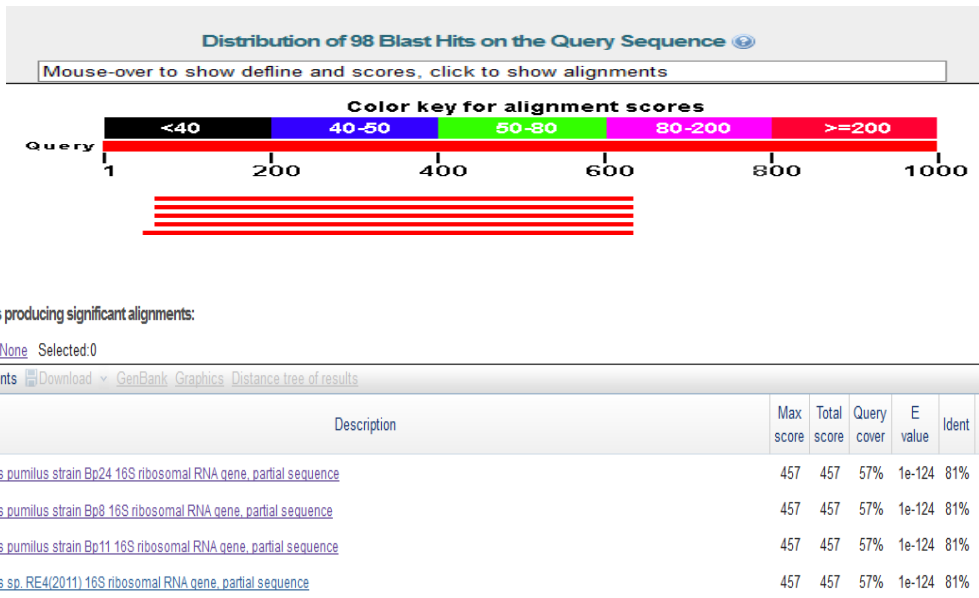
Giếng 6: Thang chuẩn 100bp

Giếng 1- 4: Lần lượt là sản phẩm PCR của các dòng LM4, LM6, LM7 và LM7 lặp lại

Giếng 5: Đối chứng dương

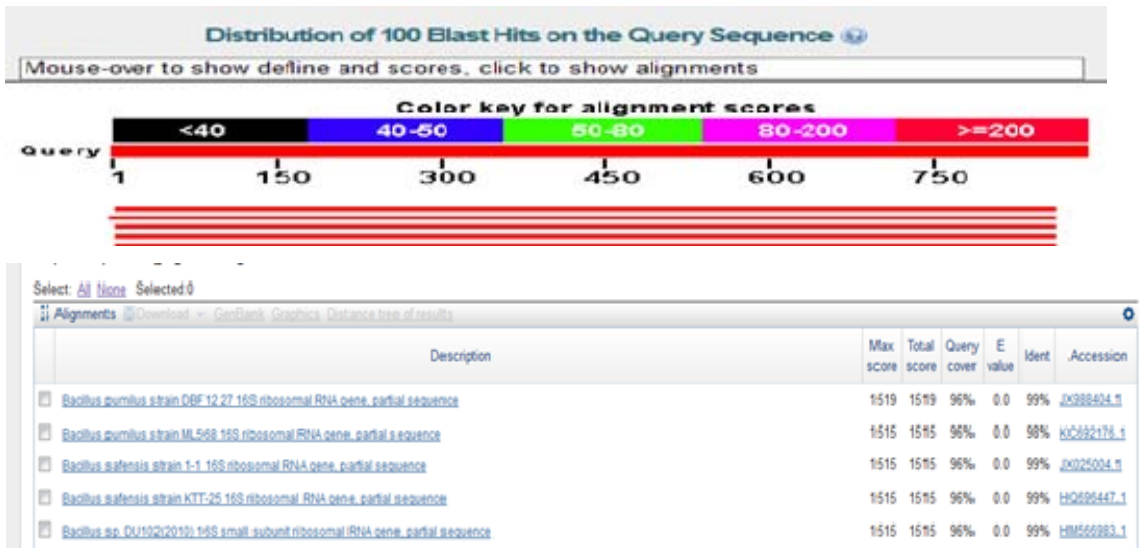
Khi so sánh trình tự 16S rDNA (Phụ lục) của dòng LM4 với dữ liệu ngân hàng gen bằng chương trình BLAST, kết quả cho thấy trình tự gen của

dòng LM4 tương đồng với trình tự gen của loài *Bacillus pumilus* Bp24 với mức độ tương đồng là 81% (Hình 7).



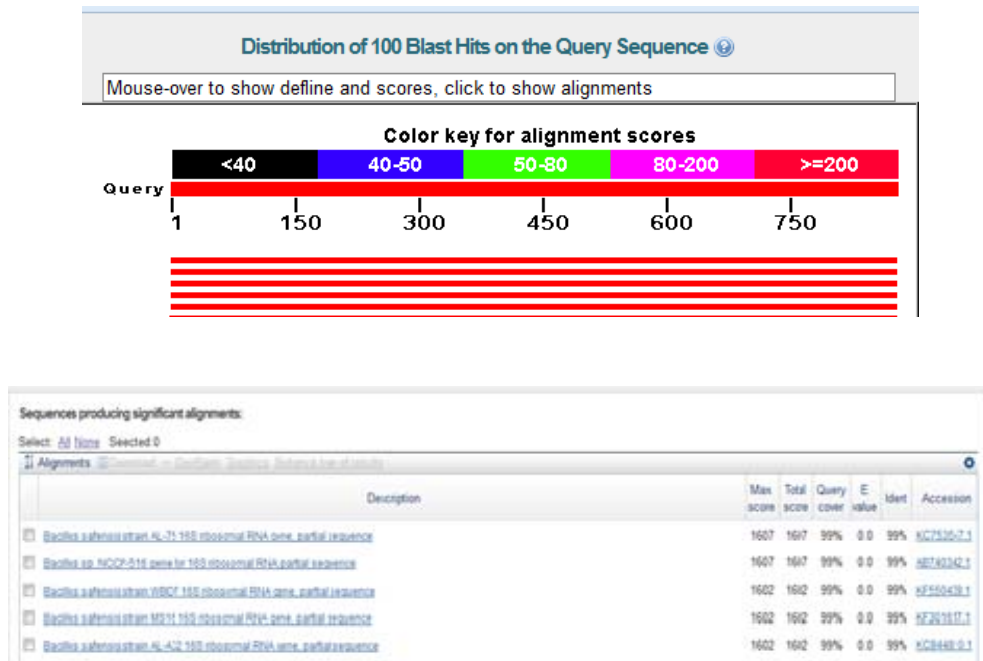
Hình 7: Kết quả so sánh trình tự dòng vi khuẩn LM4 với cơ sở dữ liệu NCBI

Kết quả tra cứu bằng BLAST cho thấy trình tự gen của dòng LM6 tương đồng với trình tự gen của loài *Bacillus pumilus* DBF12 27 với độ tương đồng 99% (Hình 8).



Hình 8: Kết quả so sánh trình tự dòng vi khuẩn LM6 với cơ sở dữ liệu NCBI

Kết quả so sánh bằng chương trình BLAST trình tự gen 16S rRNA của dòng vi khuẩn LM7 trên ngân hàng gen NCBI cho thấy dòng vi khuẩn LM7 tương đồng 99% với loài *Bacillus safensis* AL-75 (Hình 9).



Hình 9: Kết quả so sánh trình tự dòng vi khuẩn LM7 với cơ sở dữ liệu NCBI

Các dòng vi khuẩn thuộc loài *Bacillus pumilus* và *Bacillus safensis* đều được ghi nhận có khả năng sản xuất protease kiềm tính đã được quan tâm nghiên cứu. Cả ba dòng *Bacillus pumilus* Bp24, *Bacillus pumilus* DBF12 27 và *Bacillus safensis* AL-75 hứa hẹn khả năng ứng dụng cao trong các lĩnh vực đời sống như ngành công nghiệp thuộc da, sản xuất chất tẩy rửa, thực phẩm và xử lý môi trường.

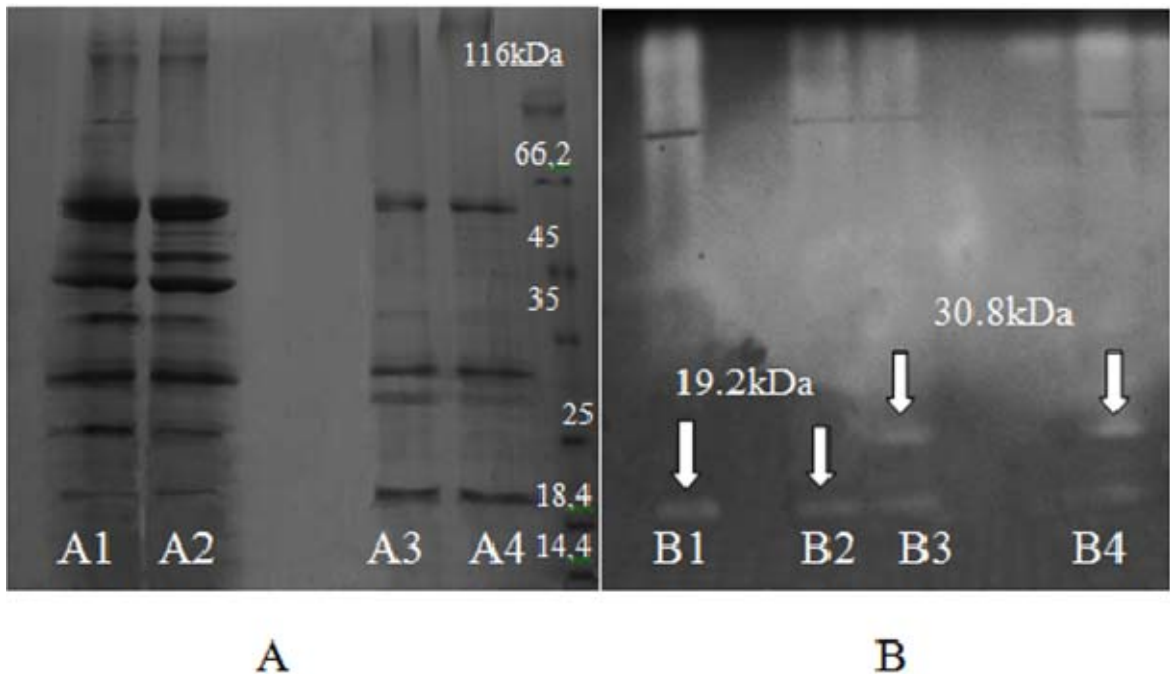
3.5 Thành phần, khối lượng phân tử các protease sinh tổng hợp từ dòng LM6

Chủng LM6 với hoạt tính cao nhất 3,16 U/mL được sử dụng để khảo sát thành phần protease trong dịch nuôi cấy. Protein trong dịch nuôi cấy được kết tủa bằng muối ammonium sulfate và khảo sát thành phần, khối lượng protease bằng kỹ thuật điện di nhuộm hoạt tính với cơ chất casein (Đương Thị Hương Giang, 2010).

Khi thực hiện kết tủa bằng ammonium sulfate ở các nồng độ từ 20-90% bão hòa cho thấy hầu hết các protease kết tủa ở 2 nồng độ 60% và 80% AS bão hòa với hoạt tính lần lượt là 3,44 và 3,36 U/mL. Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE và điện di nhuộm hoạt tính với cơ chất casein các phân đoạn protease kết tủa cho thấy đã thu nhận được 2 loại protease có phân tử khối lần lượt là

30,8 và 19,2 kDa (Hình 10). Trong đó, protease có phân tử lượng 19,2 kDa kết tủa ở phân đoạn 60% AS bão hòa (B1, B2) và protease có phân tử lượng 30,8 kDa kết tủa ở phân đoạn 80% AS bão hòa (B3, B4). Tuy nhiên, ở phân đoạn 80% AS bão hòa vẫn còn lẫn tạp một lượng protease phân tử lượng 19,2 kDa. Điều này có thể do ở nồng độ muối 60% AS bão hòa vẫn còn một lượng nhỏ protease này hiện diện trong dung dịch enzyme thô. Trước đó, Kumar và Takagi (1999) cũng đã công bố hầu hết các protease kiềm tính có phân tử lượng trong khoảng 15-30 kDa, ngoại trừ một vài trường hợp ngoại lệ.

Kết quả điện di SDS-PAGE và điện di nhuộm hoạt tính cũng cho thấy cả hai loại protease thu nhận được đều ở dạng đơn phân và không có cầu nối disulfite trong cấu trúc phân tử của chúng. Cả hai thể hiện một băng duy nhất trên gel với khối lượng phân tử tương đương nhau và đều giữ được hoạt tính phân giải casein ngay cả khi được xử lý với BME (Hình 10. B2, B4) (BME là một chất khử có khả năng phá hủy các cầu nối disulfite (nếu có) trong cấu trúc của các enzyme, đồng thời làm mất đi khả năng xúc tác của các enzyme này). Trước đó, Singh và ctv. (2001) đã công bố tinh sạch được một protease đơn phân tử có khối lượng vào khoảng 28,7kDa từ *Bacillus sphaericus*.



Hình 10: Kết quả điện di trên gel arylamide (A) và điện di nhuộm hoạt tính trên cơ chất casein của các phân đoạn protein (B)

- A1. Phân đoạn 80% không xử lý BME; A2. Phân đoạn 80% có xử lý BME
 A3. Phân đoạn 60% không xử lý BME; A4. Phân đoạn 60% có xử lý BME
 B1. Phân đoạn 60% không xử lý BME; B2. Phân đoạn 60% có xử lý BME
 B3. Phân đoạn 80% không xử lý BME; B4. Phân đoạn 80% có xử lý BME

4 KẾT LUẬN

Từ 20 mẫu đất, 23 dòng vi khuẩn chịu kiềm hiếu khí đã được phân lập. Tất cả các dòng vi khuẩn đều có hình que và có khả năng chuyển động. Mười một trong số 23 dòng vi khuẩn được phân lập thể hiện hoạt tính protease với đường kính thủy phân trong khoảng 5,3 - 13,2 mm sau 24 giờ ủ ở 30°C.

Các dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh protease trong môi trường lỏng trừ dòng LM10. Trong đó dòng LM6 cho hoạt tính cao nhất 3,16 U/mL, kế tiếp là hai dòng LM4 và LM7 với hoạt tính lần lượt là 1,50 và 1,53 U/mL.

Kết quả định danh dựa trên các đặc tính hình thái, sinh lý và trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy dòng LM4 tương đồng 81% với *Bacillus pumilus* Bp24; dòng LM6 tương đồng với *Bacillus pumilus* DBF12 27 ở mức độ 99% và dòng LM7 tương đồng 99% với *Bacillus safensis* AL-75.

Kết quả SDS-PAGE và điện di nhuộm hoạt tính cho thấy dòng LM6 sản xuất 2 loại đơn phân

protease với khối lượng phân tử lần lượt là 19,2 và 30,8 kDa.

LỜI CẢM ƠN

Cám ơn Viện Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện vật chất cho thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dương Thị Hương Giang. 2010. Bài giảng hóa protein. Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.
2. Genckal, H. 2004. Study on alkaline protease production from *Bacillus* sp. (Unpublish master's thesis). Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey.
3. Khan, M.A., N. Ahmad, U.A. Zafar, I.A. Nasir, and M.A. Qadir. 2011. Isolation and screening of alkaline protease producing bacteria and physio-chemical characterization of the enzyme. *Afr. J. Biotech.*, 10(33): 6203-6212.

4. Kumar, C.G. and H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.*, 17:561.
5. Kunitz, M. 1947. Crystalline soyabean trypsin inhibitor. II. General properties. *Gen. Physiol.*, 30: 291-310.
6. Mao, W., R. Pan & D. Freedman. 1992. High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthetic medium. *Ind. Microbiol.*, 11:1-6.
7. Singh, J., N. Batra, R. C. Sobti. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Proc. Biochem.*, 36: 781.
8. Rajesh P., M. Dodia & S.P. Singh. 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Proc. Biochem.*, 40: 3569-3575.