

Khảo sát điều kiện lên men của chủng vi khuẩn biển *Bacillus velezensis* AlgSm1 để thu nhận alginate lyase

Cao Thị Thúy Hằng*, Võ Mai Như Hiếu, Phạm Đức Thịnh, Nguyễn Ngọc Linh,
Nguyễn Đình Thuát, Trần Thị Thanh Vân

Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 27/10/2020; ngày chuyển phản biện 3/11/2020; ngày nhận phản biện 7/12/2020; ngày chấp nhận đăng 30/12/2020

Tóm tắt:

Alginate lyase là enzym bẻ gãy mạch alginate để tạo ra các oligoalginate có hoạt tính sinh học nhằm ứng dụng trong các lĩnh vực y dược, công nghiệp, nông nghiệp... Trong nghiên cứu này, điều kiện lên men của chủng vi khuẩn biển *Bacillus velezensis* AlgSm1 đã được khảo sát nhằm thu nhận enzym alginate lyase có hàm lượng và hoạt tính cao. Các thành phần dinh dưỡng như nguồn carbon, nitơ, pH môi trường nuôi cấy ban đầu và thời gian lên men đã được khảo sát. Kết quả cho thấy, điều kiện để chủng *B. velezensis* AlgSm1 sinh tổng hợp alginate lyase có hoạt tính cao là 5 mg/ml alginate; nguồn nitơ tốt nhất là 0,8 mg/l cao chiết nấm men; pH môi trường ban đầu 5,5 và thời gian thu nhận enzym sau 18h lên men ở 28-30°C.

Từ khóa: alginate lyase, *Bacillus velezensis*, điều kiện lên men.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Alginate là một anion polysaccharide, phân bố rộng rãi trong thành tế bào của rong nâu và được tổng hợp bởi một số vi khuẩn, bao gồm cả *Pseudomonas aeruginosa* và *Azotobacter vinelandii* [1]. Đây là polysaccharide dị trùng hợp bao gồm hai axit uronic: α -L-guluronic (G) và β -D-mannuronic (M) sắp xếp với nhau thành các khối β -D-mannuronate (poly M), α -L-guluronate G (poly G) và heteropolymer (polyMG), các uronic acid này được liên kết với nhau thông qua liên kết 1,4-glycosidic [2]. Alginate đã được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm do các đặc tính vật lý độc đáo của nó để tạo thành gel. Tuy nhiên, việc ứng dụng alginate trong y học còn nhiều hạn chế do khối lượng phân tử lớn và độ nhớt cao. Do đó, nhiều nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu điều chế alginate khối lượng phân tử thấp với mục đích tăng khả năng ứng dụng trong lĩnh vực y dược cũng như trong việc nghiên cứu cấu trúc và hoạt tính sinh học của chúng [3]. Một trong những phương pháp để điều chế alginate khối lượng phân tử thấp là sử dụng alginate lyase để bẻ gãy mạch.

Alginate lyase là enzym có khả năng xúc tác cắt mạch alginate bằng sự khử liên kết glucoside để tạo ra các oligoalginate. Dựa vào đặc hiệu cơ chất, alginate lyase được chia làm 4 loại với tính đặc hiệu gồm: G-block (EC4.2.2.11), M-block (EC4.2.2.3),

GM-block và MG-block [4]. Dựa vào cơ chế hoạt động, alginate lyase được chia làm 2 nhóm là endolytic alginate lyase và exolytic alginate lyase. Dựa vào cấu trúc sơ cấp của enzym, alginate lyase nằm trong 7 họ của polysaccharide lyase là 5, 6, 7, 14, 15, 17 và 18. Hầu hết, exolytic alginate lyases nằm trong họ polysaccharide lyase số 15 và 17. Phần lớn alginate lyase thu nhận từ vi khuẩn được chia vào các họ polysaccharide lyase số 5, 7, 15 và 17. Alginate lyase thu từ động vật thân mềm thuộc họ polysaccharide lyase số 14 [5]. Alginate lyase đa chức là enzym có khả năng cắt liên kết G-M block được chia riêng vào họ polysaccharide lyase số 18 [5]. Ngoài ra, alginate lyase còn được phân loại theo trọng lượng phân tử: nhỏ (25-30 kDa), trung bình (khoảng 40 kDa) và lớn (hơn 60 kDa).

Vi khuẩn biển là nguồn chính để thu nhận enzym vì có nhiều ưu điểm vượt trội về chất lượng cũng như khả năng sản xuất alginate lyase [4]. Trong đó, alginate lyase từ vi sinh vật biển được nghiên cứu khá nhiều. Một số chủng vi khuẩn có thể kể đến: gram dương là *Bacillus circulans* và gram âm là *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* đã được nghiên cứu cho sản xuất alginate lyase [6]. Vi khuẩn là sinh vật có khả năng sinh sản nhanh, phát triển mạnh, thích ứng tốt với điều kiện công nghiệp. Môi trường dinh

*Tác giả liên hệ: Email: caohang.nitra@gmail.com

Study on culture conditions for extracellular alginate lyase production by *Bacillus velezensis* AlgSm1

Thi Thuy Hang Cao*, Mai Nhu Hieu Vo, Duc Thinh Pham, Ngoc Linh Nguyen, Dinh Thuat Nguyen, Thi Thanh Van Tran

Nhatrang Institute of Technology Research and Application, VAST

Received 27 October 2020; accepted 30 December 2020

Abstract:

Alginate lyase is an enzyme that degrades alginate to create bioactive oligoalginate for application in medicine, industry, agriculture... In this study, cultural conditions of marine bacteria, *Bacillus velezensis* AlgSm1 have been investigated for producing alginate lyase with high content and activity. The nutritional components such as carbon source, nitrogen source, initial pH value, and cultural time were investigated. The results showed that the cultural conditions of *B. velezensis* AlgSm1 to biosynthesize alginate lyase with high activity were 5 mg/ml alginate, 0.8 mg/ml yeast extract; pH 5.5 and 18-hours fermentation at 28-30°C.

Keywords: alginate lyase, *Bacillus velezensis*, culture conditions.

Classification number: 1.6

đường để nuôi vi khuẩn rẽ tiền, dễ kiếm. Do đó, enzym thu được từ việc nuôi vi khuẩn sẽ nhanh hơn, giá thành rẽ hơn. Nhiều yếu tố như nguồn carbon, nitơ có ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật cũng như việc sản xuất alginate lyase. Tuy nhiên, chỉ có một vài báo cáo liên quan đến tối ưu hóa điều kiện của quá trình lên men nuôi cấy vi sinh vật để sản xuất alginate lyase [7, 8]. Hầu hết các công bố liên quan đến sản xuất alginate lyase từ vi khuẩn biển đều sử dụng môi trường biển có bổ sung alginate là nguồn carbon cảm ứng vi khuẩn sinh enzym [7-9]. Do đó, khi nghiên cứu vi sinh vật sinh enzym alginate lyase thì cần nghiên cứu ảnh hưởng của chất cảm ứng.

Trong công trình trước [10], chúng tôi đã tìm ra được chủng vi khuẩn biển *B. velezensis* AlgSm1 có khả năng bề mặt alginate chiết từ rong *Sargassum mclurei* thu nhận tại vùng biển Khánh Hòa, Việt Nam, do đó trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát điều kiện nuôi cấy của chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 để có thể thu nhận enzym với hiệu suất cao nhất.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Cơ chất: alginate từ rong nâu *Sargassum mclurei* được cung cấp bởi Phòng Hóa phân tích và triển khai công nghệ, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang và được chiết theo quy trình nghiên cứu của Zvyagintseva và cs (2003) [11].

Môi trường chung nuôi cấy vi khuẩn: môi trường chung để lên men vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 là MB có chứa 10 g pepton, 5 g saccharose, 0,1 g KH_2PO_4 , 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 500 ml nước cất và 500 ml nước biển, pH 7,0-7,2 [10].

Phương pháp nghiên cứu

Thu nhận dịch chiết enzym: chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 được lên men trong môi trường MB lỏng (không chứa agar) trong 24h ở 30°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút. Sau đó, ly tâm dịch nuôi cấy ở 3.000 vòng/phút, 10°C trong 30 phút. Phần dịch nổi thu nhận được sử dụng như là dịch enzym ngoại bào, phần sinh khối tế bào được huyền phù lại với đệm 10 mM Tris HCl 0,02M, pH 7,5, phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm với tần số 20 Hz trong tổng thời gian 2 phút. Dịch chiết thu sau khi ly tâm với tốc độ 9.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C được sử dụng như là dịch chiết nội bào để thử nghiệm hoạt tính enzym.

Thử nghiệm hoạt tính enzym: hoạt tính alginate lyase được đánh giá bằng phương pháp đĩa thạch alginate [10]. 100 μl dịch enzym được đưa lên đĩa thạch MB chứa 0,5% alginate. Đĩa thạch được ủ ở 37°C, trong 6h, sau đó nhuộm bởi gram's iodine. Hoạt tính alginate lyase được tính bằng đường kính vòng phân giải không bị nhuộm màu bởi thuốc nhuộm.

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon trong môi trường lên men: chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 được lên men trong môi trường MB lỏng với các nguồn carbon khác nhau ở nồng độ 5 mg/ml bao gồm: saccharose, glucose và alginate.

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ trong môi trường lên men: chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 được lên men trong môi trường MB với nguồn carbon là alginate 5 mg/ml, nitơ thay đổi là: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , pepton, cao chiết nấm men. Bình môi trường nuôi cấy được lắc với tốc độ 180 vòng/phút trong 24h ở 28-30°C.

Khảo sát pH ban đầu của môi trường lên men: chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 được lên men trong môi trường MB lỏng với nguồn carbon và nitơ ở nồng độ đã được lựa chọn là alginate 5 mg/ml và cao chiết nấm men 0,8 mg/ml, pH môi trường thay đổi từ 4,0 đến 9,0 với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 24h ở 28-30°C.

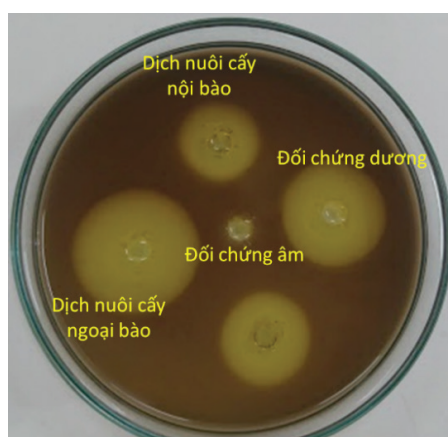
Khảo sát thời gian lên men: chủng vi sinh vật lựa chọn được nuôi trong môi trường lên men với thành phần môi trường tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn. Tốc độ nuôi cấy

180 vòng/phút ở 28-30°C trong khoảng thời gian 1-32h. Tốc độ sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn được xác định theo phương pháp đo độ đục ở bước sóng 660 nm, hoạt tính alginate lyase được đo bằng phương pháp đĩa thạch alginate.

Kết quả và thảo luận

Xác định vị trí thu nhận alginate lyase

Dịch chiết nội bào và ngoại bào của chủng vi khuẩn nghiên cứu được thử nghiệm hoạt tính alginate lyase bằng phương pháp đĩa thạch alginate (hình 1). Kết quả cho thấy, dịch chiết ngoại bào có đường kính vòng phân giải trên đĩa thạch alginate cao hơn so với dịch chiết nội bào. Do đó, trong các nghiên cứu tiếp theo chúng tôi tập trung thử nghiệm hoạt tính enzym trên dịch chiết ngoại bào. Kết quả này của chúng tôi tương tự với các kết quả nghiên cứu về alginate lyase từ vi khuẩn biển chủ yếu là dịch enzym ngoại bào như extracellular alginate lyase từ chủng vi khuẩn *Pseudoalteromonas atlantica* AR06 [12], *Bacillus* sp. Alg07 [3].

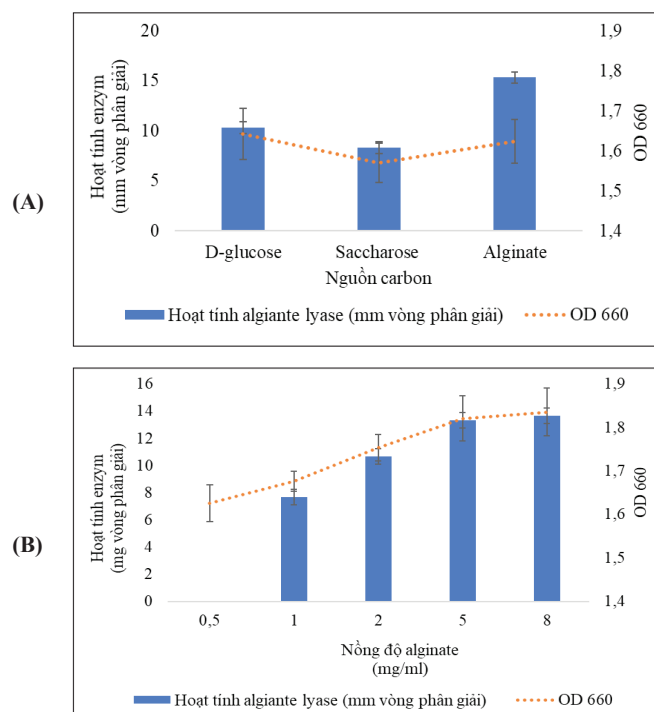


Hình 1. Hoạt tính dịch chiết nội bào và ngoại bào của chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 trên môi trường đĩa thạch alginate chiết từ rong *S. Mcclurei* (đối chứng âm là môi trường MB không chứa vi khuẩn, đối chứng dương là alginate lyase từ Sigma).

Ảnh hưởng của nguồn carbon

Chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 được nuôi cấy trong các môi trường có bổ sung các nguồn carbon khác nhau, nuôi lắc 180 vòng/phút trong 24h ở nhiệt 30°C để kiểm tra hoạt tính alginate lyase từ dịch chiết ngoại bào. Kết quả thí nghiệm (hình 2A) cho thấy, sự sinh trưởng của vi khuẩn biển *B. velezensis* AlgSm1 trong 3 môi trường có nguồn carbon khác nhau không đáng kể, trong đó sinh trưởng tốt nhất trong môi trường chứa D-glucose với giá trị OD660 đạt 1,64 sau 24h lên men và đường kính vòng phân giải alginate là 10±0,5 mm. Trong khi đó, chủng vi khuẩn này lên men trong môi trường chứa alginate đạt giá trị OD660 là 1,62, thấp hơn không đáng kể so với môi trường chứa D-glucose, nhưng hoạt tính alginate lyase lại tốt nhất với đường kính vòng phân giải lên đến 15±0,5 mm. Do

đó, nguồn carbon phù hợp cho chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 sinh alginate lyase là alginate. Kết quả khảo sát nồng độ alginate tối ưu để chủng vi khuẩn này sinh alginate lyase được thể hiện ở hình 2B. Kết quả cho thấy ở nồng độ 8 mg/ml, chủng vi khuẩn biển này sinh enzym tốt nhất với đường kính vòng phân giải là 13,6±0,5 mm. Tuy nhiên, ở nồng độ alginate là 5 mg/ml hoạt tính alginate lyase thấp hơn không đáng kể với đường kính vòng phân giải alginate là 13,3±0,5 mm, do đó để tiết kiệm chi phí và dễ dàng cho quá trình tinh sạch enzym ngoại bào, chúng tôi lựa chọn nồng độ alginate cho chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 sinh enzym là 5 mg/ml.

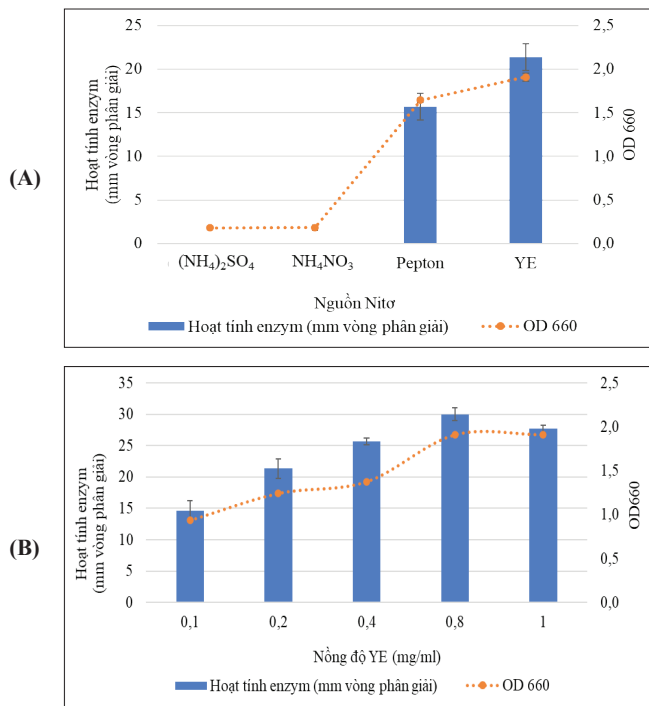


Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn carbon (D-glucose, saccharose, alginate) và nồng độ alginate lên sự sinh trưởng và hoạt tính alginate lyase từ chủng *B. velezensis* AlgSm1.

Trong một nghiên cứu khác về ảnh hưởng của nguồn carbon lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. TAG8, các nhà khoa học cũng đưa ra nguồn carbon mà chủng vi khuẩn sử dụng tối ưu là alginate nhưng nồng độ alginate là 8 mg/ml, lớn hơn so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi là 5 mg/ml [6]. Điều này có thể là do các chủng vi khuẩn *Bacillus* có nguồn gốc khác nhau và tác động trên nguồn cơ chất khác nhau. Trong nghiên cứu này, alginate sử dụng được chiết xuất từ rong nâu *S. mcclurei* ở Việt Nam, còn H. Tavafi và cs (2017) đã sử dụng alginate thương mại của Sigma [6].

Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Hình 3 thể hiện sự ảnh hưởng của nguồn nitơ trong môi trường lên men đến khả năng sinh và hoạt tính alginate lyase ngoại bào của chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1.

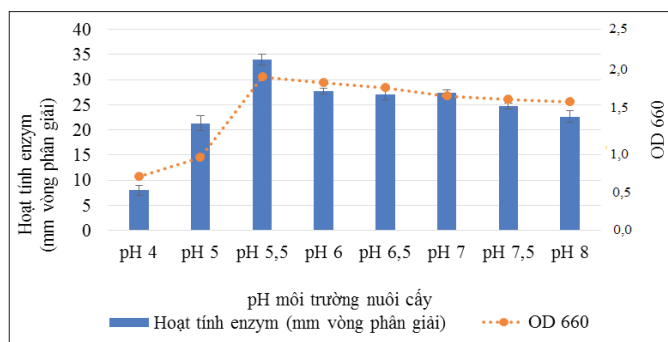


Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ và nồng độ của YE lên sự sinh trưởng và hoạt tính alginate lyase từ chủng *B. velezensis* AlgSm1.

Kết quả cho thấy, khi sử dụng nguồn nitơ vô cơ (NH₄)₂SO₄ và NH₄NO₃, vi khuẩn sinh trưởng yếu và dịch ngoại bào không thể hiện hoạt tính enzym. Còn khi sử dụng nguồn nitơ hữu cơ là peptone và cao chiết nấm men (YE) để lên men, có thể thấy hoạt tính alginate lyase thể hiện một cách rõ rệt. Kết quả cho thấy, nguồn nitơ thích hợp cho chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 lên men là YE với nồng độ 0,8 mg/ml.

Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy

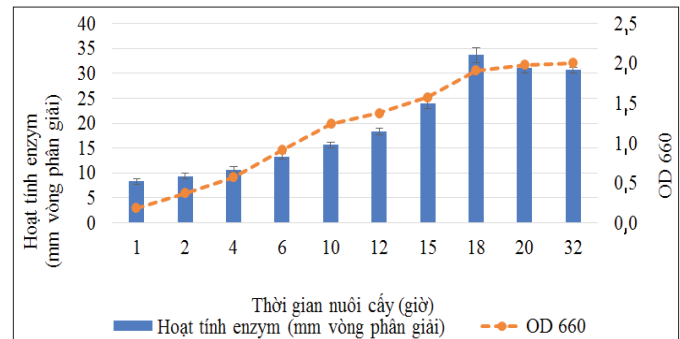
Hình 4 thể hiện ảnh hưởng của pH trong lên men tới khả năng sinh và hoạt tính alginate lyase ngoại bào của chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1. Chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 có khoảng pH sinh trưởng khá rộng, pH 5-8 vẫn có thể sinh trưởng và phát triển tốt (tối ưu ở pH 5,5).



Hình 4. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên sự sinh trưởng và hoạt tính alginate lyase từ chủng *B. velezensis* AlgSm1.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Thời gian lên men là một trong những thông số được quan tâm nghiên cứu nhằm ứng dụng hiệu quả vào quá trình sản xuất vì nó liên quan trực tiếp tới quá trình vận hành máy móc, thiết bị và nhân công.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự sinh trưởng và hoạt tính alginate lyase từ chủng *B. velezensis* AlgSm1.

Nghiên cứu này cho thấy, thời gian lên men để chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 sinh trưởng phát triển và sinh enzyme alginate lyase tốt nhất là 18h nuôi cấy, ở môi trường lên men pH 5,5, nhiệt độ 30°C (hình 5). Ở 18h, vi khuẩn ở giai đoạn đầu của pha cân bằng trong quá trình sinh trưởng và sản sinh enzyme cao nhất. Ở thời điểm lên men 20-32h, là giai đoạn cân bằng của quá trình sinh trưởng và sau đó vi khuẩn sẽ bước vào giai đoạn suy thoái, enzym không được sản xuất thêm nữa. Do đó, thời gian thích hợp để thu nhận alginate lyase ngoại bào của chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 là 18h nuôi cấy.

Kết luận

Điều kiện lên men để chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 sinh trưởng và sản sinh alginate lyase tốt nhất là pH 5,5, với nguồn carbon là alginate 5 mg/ml, nguồn nitơ là cao chiết nấm men với hàm lượng là 0,8 mg/ml, thời gian lên men là 18 giờ, nuôi cấy ở 28-30°C. Kết quả của nghiên cứu giúp định hướng chủng vi khuẩn *B. velezensis* AlgSm1 sinh enzyme alginate lyase với hàm lượng và hoạt tính cao để tiếp tục nghiên cứu tinh sạch, xác định đặc tính xúc tác cũng như sử dụng enzym nhằm điều chế oligoalginate có hoạt tính sinh học ứng dụng trong lĩnh vực y dược, thực phẩm chức năng.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả của nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí của đề tài độc lập cấp quốc gia mã số ĐTĐL.CN-57/19 và đề tài KH&CN cấp Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang “Nghiên cứu thu nhận, tinh sạch và đặc tính xúc tác của alginate lyase từ chủng vi khuẩn biển *Bacillus Velezensis* AlgSm1”. Các tác giả chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. Iwamoto, et al. (2003), “Enzymatically depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytokine production in human mononuclear cells”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**(2), DOI: 10.1271/bbb.67.258.
- [2] K.Y. Lee, D.J. Mooney (2012), “Alginate: properties and biomedical applications”, *Prog. Polym. Sci.*, **37**, pp.106-126.
- [3] P. Chen, et al. (2018), “Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium bacillus sp. Alg07”, *Mar. Drugs.*, **16**, DOI: 10.3390/md16030086.
- [4] B. Zhu, H. Yin (2015), “Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications”, *Bioengineered*, **6**, pp.125-131.
- [5] V. Lombard, et al. (2014), “The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013”, *Nucleic Acids Res.*, **42**, pp.490-495.
- [6] H. Tavafi, et al. (2017), “Screening of alginate Lyase-producing bacteria and optimization of media compositions for extracellular alginate Lyase production”, *Iran. Biomed. J.*, **21**, pp.48-56.
- [7] X. Fu, et al. (2008), “Optimization of culturing condition and medium composition for the production of alginate lyase by a marine Vibrio sp. YKW-34”, *J. Ocean Univ. China*, **7**, pp.97-102.
- [8] T. Li, et al. (2017), “Screening of alginate degrading Bacteria and optimization of its enzyme-producing conditions”, *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, **53**(6), pp.1115-1121.
- [9] H. Yagi, et al. (2016), “Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium Cobetia sp. NAP1 isolated from brown algae”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, pp.2338-2346.
- [10] N.T. Thuận, T.N.H. Vy, V.T.D.T. Trang, C.T.T. Hằng, V.M.N. Hiếu, N.N. Linh, T.T.T. Vân (2019), “Tiềm năng sinh alginate lyase từ vi khuẩn biển phân lập được ở vùng biển Việt Nam”, *Tạp chí Sinh học*, **41**, tr.273-280.
- [11] T.N. Zvyagintseva, et al. (2003), “Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds: distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions”, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, **294**, pp.1-13.
- [12] R. Matsushima, et al. (2010), “Analysis of extracellular alginate lyase and its gene from a marine bacterial strain, *Pseudoalteromonas atlantica* AR06”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, pp.567-576.