

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN SINH TỔNG HỢP CELLULASE NGOẠI BÀO TỪ CHỦNG MIP_GN36 (XẠ KHUẨN *Streptomyces thermocarboxydus*) ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG

Chu Thanh Bình^{1*}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định ảnh hưởng của nồng độ cơ chất cellulose, nhiệt độ, pH ban đầu, thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào của chủng MIP_GN36 (xạ khuẩn *Streptomyces thermocarboxydus*).

Đối tượng, phương pháp: *Streptomyces thermocarboxydus* MIP_GN36 được hoạt hóa từ bộ sưu tập chủng vi sinh vật thuộc Khoa Vi sinh vật, Viện Y học dự phòng Quân đội. Xác định hoạt tính cellulase của chủng MIP_GN36 bằng phương pháp định lượng đường khử (theo Miller, 1959).

Kết quả: Điều kiện thích hợp để chủng xạ khuẩn MIP_GN36 sinh tổng hợp cellulase cao nhất gồm: ở nhiệt độ 45°C; pH ban đầu 7,0; nồng độ cơ chất cellulose 1,5%; sau 120 giờ nuôi cấy hoạt tính enzyme là 22,5 U/mL. Đây là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo để tạo chế phẩm vi sinh xử lý rác thải hữu cơ.

Từ khóa: *Streptomyces thermocarboxydus*, MIP_GN36, cellulase.

ABSTRACT

Objectives: These studies aim to determine the effects of some factors (cellulose substrate concentration, temperature, pH, time fermentation) on the ability to synthesize extracellular cellulase of the *Streptomyces thermocarboxydus* MIP_GN36.

Subjects, methods: MIP_GN36 was activated from the preserved type of Microbial collection of the Department of Microbiology-Military Institute of Preventive Medicine. Cellulase activity of MIP_GN36 was determined by the reducing sugar quantification method according to Miller (1959).

Results: Suitable conditions for biosynthesize cellulase by MIP_GN36 strain are at a temperature of 45°C, pH of 7.0, cellulose substrate concentration of 1.5% and after 120 hours of fermentation, the cellulase activity is 22.5. U/mL. This result will be the basis for further research to produce bioproducts for waste treatment.

Keywords: *Streptomyces thermocarboxydus*, MIP_GN36, cellulase.

*Chịu trách nhiệm nội dung: Chu Thanh Bình, Email: chuthanhbinhvvn@gmail.com

Ngày nhận bài: 25/3/2024; mời phản biện khoa học: 5/2024; chấp nhận đăng: 20/5/2024.

¹Viện Y học dự phòng Quân đội.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cellulase là chất xúc tác sinh học quan trọng được ứng dụng rộng rãi trong thực tế, như trong quá trình phân hủy lá cây và các hợp chất từ cellulose. Cellulase (EC 3.2.1.4) xúc tác quá trình thủy phân liên kết 1,4-β-Glucoside trong cellulose tạo thành các oligosaccharit và đường đơn. Enzyme này đóng vai trò quan trọng trong tự nhiên bằng cách phân hủy polysaccharide, một chất trong thành phần vách tế bào thực vật [1]. Cellulase có thể được sinh tổng hợp từ nhiều nhóm sinh vật như nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn, động vật nguyên sinh và thực vật. Trong đó, việc thu nhận cellulase từ các loài vi sinh vật rất được coi trọng bởi khả năng sinh trưởng với tốc độ nhanh, số lượng lớn và hoạt tính enzyme cao. Các sản phẩm từ thực vật (cành lá

rụng, cây chết), rác thải nông nghiệp (rơm rạ), rác thải sinh hoạt, rác thải công nghiệp... nếu không được sử dụng hoặc không được tái chế sẽ gây ô nhiễm môi trường. Do đó, việc nghiên cứu sản xuất ra lượng lớn cellulase để xử lý nguồn sinh khối giàu cellulose là điều rất cần thiết.

Xạ khuẩn thường tồn tại trong đất, lá, rác thải, trầm tích của hệ sinh thái nước ngọt và biển. Xạ khuẩn đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy cellulose bằng cách tiết ra enzyme ngoại bào. Chi *Streptomyces* là chi chiếm ưu thế trong xạ khuẩn, cung cấp cellulase chủ yếu từ ngoại bào và được coi là "nhà sản xuất" cellulase nhiều nhất. Chúng tôi khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp cellulase ngoại bào của chủng xạ khuẩn *Streptomyces thermocarboxydus* MIP_GN36, định

hướng ứng dụng sản xuất chế phẩm cellulase từ chủng xạ khuẩn MIP_GN36 trong thời gian tới.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces thermocarboxydus* MIP_GN36 phân lập từ đất vùng rẫy cây Gừng khu vực huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên; lưu giữ trong bộ sưu tập giống tại Khoa Vi sinh vật, Viện Y học dự phòng Quân đội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Vật liệu môi trường sử dụng trong cấy chuyền và bảo quản chủng [2]: ISP4 (g/L) tinh bột 5; cao nấm men 2; NaCl 1; Agar 20.

- Môi trường sử dụng cho nghiên cứu lên men sinh tổng hợp cellulase: môi trường A2 (cao thịt 3g/L; peptone 5g/L; glucose 10g/L; pH 7,0); môi trường Bennet (cao nấm men 1,0g/L; cao thịt 1,0g/L; glucose 10,0g/L; pH 7); môi trường 79 (glucose 10g/L; peptone 10g/L; NaCl 6g/L; pH 7,0).

- Cơ chất carboxymethyl cellulose (CMC) (Merck) bổ sung vào mỗi môi trường 0,5%.

Tất cả các thí nghiệm tiến hành trong bình tam giác 250 ml chứa 50 ml dịch môi trường, bổ sung 2% dịch nhân giống 24 giờ (OD λ600 nm = 0,7), tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sau 4 ngày nuôi cấy, li tâm 10.000 vòng/phút, 4°C, loại bỏ sinh khối, thu dịch cellulase thô và xác định hoạt tính cellulase.

- Cây phát sinh chủng loại được thiết lập trên cơ sở khoảng cách di truyền theo Kimura bằng việc sử dụng phương pháp Neighbor-joining dựa trên phần mềm MEGA6 [3].

- Hoạt hóa chủng: hoạt hóa MIP_GN36 từ ống nghiệm sang đĩa petri chứa môi trường thạch ISP4. Sau 3-5 ngày nuôi cấy, quan sát hình thái khuẩn lạc và sự thuần khiết chủng. Tiếp tục cấy chuyền sang môi trường ISP4 dịch thể, lắc tốc độ 150 vòng/phút, sử dụng bình giống cấp I cho các thí nghiệm xác định hoạt tính sinh tổng hợp cellulase.

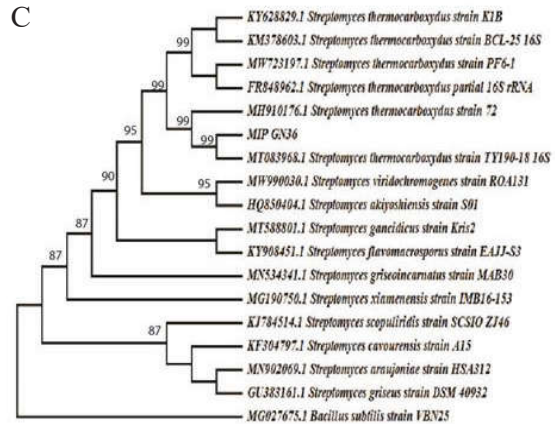
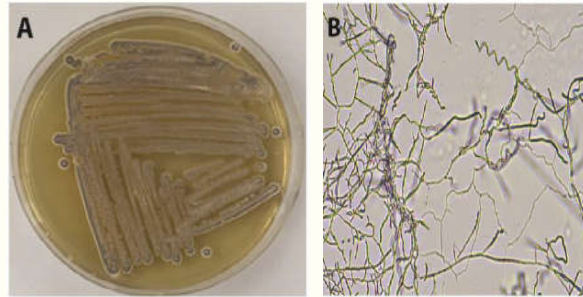
- Xác định hoạt tính cellulase theo Miller (1959) [4]: dựa trên cơ sở khi đường khử (sản phẩm thủy phân của cellulose) phản ứng với thuốc thử 3,5-acid dinitrosalicylic (DNS) có màu vàng chanh tạo thành 3-amino, 5-nitro salicylic acid có màu đỏ cam và hấp thụ cực đại ở bước sóng 540 nm. Cường độ màu của sản phẩm phản ứng tỉ lệ thuận với lượng đường khử được tạo ra nhờ hoạt động xúc tác của cellulase. Hỗn hợp phản ứng gồm 300 µL CMC 1% (trong đệm sodium acetate 0,05M; pH 5,0) với 150 µL dịch enzyme thô được ủ ở 50°C trong 30 phút. Ngừng phản ứng bằng cách bổ sung 600 µL DNS, hỗn hợp được đun sôi trong 5 phút để tạo màu. Đo độ hấp

phụ quang của sản phẩm tạo thành ở bước sóng 540 nm. Một đơn vị hoạt tính của enzyme được định nghĩa là lượng enzyme có khả năng xúc tác chuyển hóa 1 µmol glucose trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng cây phát sinh chủng loại

- Xây dựng cây phát sinh chủng loại:



Hình 1. A, B: Hình thái khuẩn lạc và cấu trúc sinh bào tử chủng xạ khuẩn MIP_GN36 sau hoạt hóa; C: Cây phát sinh loài của chủng dựa trên 16s rRNA.

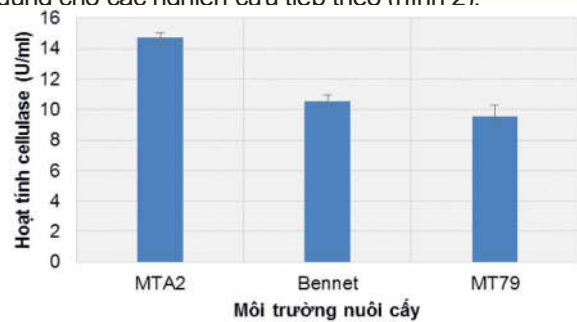
Trong nghiên cứu trước, chủng MIP_GN36 đã được giải trình tự 16s rRNA (1183 nu) và được so sánh trên GenBank [2]. Ở nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên phần mềm MEGA 6, trình tự gen 16S-rRNA của chủng MIP_GN36 có độ tương đồng cao > 99% với các trình tự gen 16S-rRNA của các xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* là *S. thermocarboxydus* KTY190 mã số MT083968.1; *S. thermocarboxydus* strain 72 mã số MH910176.1; *S. thermocarboxydus* strain PF6-1 mã số MW723197.1; *S. thermocarboxydus* BCL-15 mã số KM78603.1; *S. thermocarboxydus* K1B mã số KY628829.1 (hình 1).

Theo công bố của Wasana Suyotha (2023), *S. thermocarboxydus* ME742 có khả năng phân giải tốt lignocellulose chất thải của các nhà máy chế biến dầu cọ, thúc đẩy quá trình phân hủy, giảm thời gian ủ xuống còn một nửa [5]. Kano Kasuga (2018)

đã công bố chủng *S. thermocarboxydus* C42 vừa có khả năng phân hủy cellulose, vừa có khả năng sinh kháng sinh. Nhóm nghiên cứu đã nhân dòng các gen liên quan đến 2 quá trình này và biểu hiện thành công trên *Escherichia coli* JM109 [6]. Như vậy, chủng MIP_GN36 cũng có kết quả nghiên cứu trùng với Kasuga. Bài báo trước đã trình bày hoạt tính sinh kháng sinh của chủng MIP_GN36 [2]. Trong bài báo này, chúng tôi tập trung nghiên cứu hoạt tính sinh cellulase.

3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện lên men cho sinh tổng hợp cellulase của chủng xạ khuẩn MIP_GN36

- Ảnh hưởng của môi trường lên men: *S. thermocarboxydus* MIP_GN36 sinh tổng hợp cellulase cao nhất là môi trường A2 (đạt 14,75 U/ml), môi trường Bennet (đạt 10,54 U/ml) và môi trường 79 (đạt 9,73 U/ml). Do vậy, môi trường A2 có bổ sung 0,5% CMC; 1% glucose; 0,5% pepton và 0,3% cao thịt được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo (hình 2).

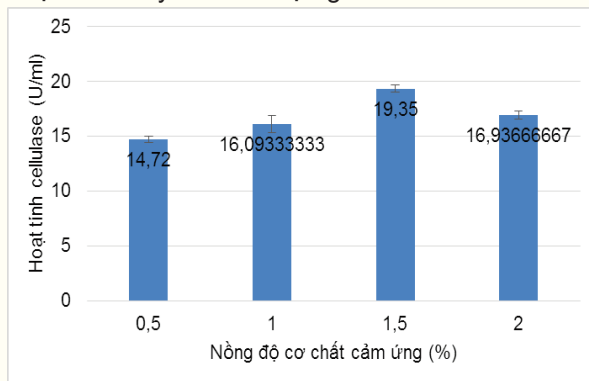


Hình 2. Hoạt tính cellulase trên các môi trường nuôi cấy.

EI-Naggar (2014) khảo sát môi trường nuôi cấy chủng xạ khuẩn *S. albobawolus* sử dụng một số nguồn cacbon khác nhau, thấy bã mía, bột cellulose, rơm bụi, cám lúa mì và trấu làm tăng khả năng sinh tổng hợp cellulase so với cơ chất CMC. Cellulase của chủng đạt cao nhất trên môi trường có bã mía (41,54 U/mL) và sinh tổng hợp cellulase thấp nhất trong môi trường bổ sung sucrose là nguồn carbon (14,07 U/mL) [7]. Theo một số tác giả khác thì tinh bột và maltose làm ức chế sản xuất cellulase lần lượt bởi chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. BRC1 và BRC2. Trong khi glucose và cellobiose cho khả năng cảm ứng tốt để hình thành cellulase bởi 2 chủng này [8]. Theo EI-Naggar và cộng sự (2014) thì chủng xạ khuẩn nghiên cứu cũng sinh tổng hợp cellulase cao nhất trên môi trường có chứa nguồn nitơ là pepton [7]. Như vậy, nguồn dinh dưỡng rất quan trọng trong việc sinh tổng hợp enzyme từ các chủng xạ khuẩn và mỗi chủng lại yêu cầu nguồn nitơ, cacbon và môi trường khác nhau.

- Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng: Cơ chất cảm ứng bổ sung vào môi trường khảo sát

A2 là CMC với tỉ lệ bổ sung 0,5-2%, bước nhảy là 0,5%, nhiệt độ nuôi cấy giữ ở 45°C. Kết quả nghiên cứu (hình 3) cho thấy khả năng sinh tổng hợp cellulase của MIP_GN36 biến động khá lớn. Hoạt tính cellulase thu được khi bổ sung 1,5% CMC đạt 19,35 U/ml tăng gần 25% so với khi sử dụng nồng độ CMC là 0,5%. Khi tăng nồng độ CMC lên 2%, hoạt tính enzyme thu được giảm.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng đến hoạt tính cellulase của chủng MIP_GN36.

Theo nghiên cứu của Yati Sudaryati Soeka (2019), khảo sát các cơ chất cho quá trình sinh tổng hợp cellulase từ vi sinh vật, hoạt tính enzyme thường đạt được cao hơn trên môi trường bổ sung CMC 1,75-2% [9]. Điều này do cellulase là enzyme cảm ứng được sinh tổng hợp phụ thuộc vào sự hiện diện của cơ chất cảm ứng [10]. Đối với enzyme cảm ứng, nồng độ chất cảm ứng rất quan trọng, thừa cơ chất sẽ ức chế quá trình sinh tổng hợp enzyme. Như vậy, đối với *S. thermocarboxydus* MIP_GN36, nồng độ CMC 1,5% được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và thời gian: ở nghiên cứu trước, chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng sinh trưởng của chủng MIP_GN36 [2]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn 3 dải nhiệt độ là 37°C, 45°C và 50°C, kết quả thể hiện ở bảng 1.

Nhiệt độ sinh tổng hợp cellulase thích hợp với chủng MIP_GN36 là 45°C (ở nhiệt độ 37°C và 50°C, hoạt tính cellulase thu được giảm, chỉ đạt 48% và 79% hoạt tính so với ở nhiệt độ 45°C). pH môi trường thích hợp cho sinh tổng hợp cellulase của xạ khuẩn MIP_GN36 đạt cao nhất (17,55 U/ml) trên môi trường có pH ban đầu 7,0. Ở các môi trường có pH 6,0 và 6,5, hoạt tính của chủng là 6,34 U/mL và 8,45 U/mL. Với các pH môi trường 7,5 và 8,0, hoạt tính cellulase đạt lần lượt 13,42 U/ml và 9,52 U/mL. Khoảng pH cho sinh tổng hợp cellulase ngoại bào của chủng MIP_GN36 cũng tương đương với kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả khi khảo sát pH môi trường cho sinh tổng hợp cellulase từ các chủng xạ khuẩn. Chellapandi P

(2008) đã công bố xạ khuẩn *S. albaduncus* có hoạt tính cao nhất ở pH từ 7-7,5; *Streptomyces* BRC1 và *Streptomyces* BRC2 ở pH từ 6,5-7,5 [11].

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *S. thermocarboxydus* MIP_GN36

Yếu tố ảnh hưởng		Hoạt tính cellulase (U/mL)
Nhiệt độ	37°C	8,72 ± 0,34
	45°C	18,15 ± 0,56
	50°C	14,38 ± 0,86
pH	6,0	6,34 ± 0,36
	6,5	8,45 ± 0,58
	7,0	17,55 ± 0,45
	7,5	13,42 ± 0,28
	8,0	9,52 ± 0,63
Thời gian nuôi cấy (giờ)	48	4,62 ± 0,68
	72	7,34 ± 0,84
	96	18,35 ± 0,43
	120	22,5 ± 0,78
	144	19,34 ± 0,51
	168	7,25 ± 0,67

Trong khoảng thời điểm từ 48-72 giờ, quá trình sinh tổng hợp cellulase của chủng MIP_GN36 diễn ra chậm, hoạt tính cellulase đạt 4,62 U/mL và 7,34 U/mL. Khoảng từ 96-120 giờ, quá trình sinh tổng hợp cellulase của MIP_GN36 diễn ra mạnh mẽ, cụ thể tại thời điểm 96 giờ hoạt tính cellulase đạt 18,35 U/mL và 120 giờ đạt 22,5 U/mL. Lượng cellulase sinh ra giảm sau 144 giờ nuôi cấy và tiếp tục giảm mạnh ở ngày tiếp theo (hoạt tính cellulase ở 168 giờ là 7,25 U/mL). Như vậy, sau 120 giờ lên men, quá trình sinh tổng hợp cellulase bắt đầu ngừng, hoạt tính cellulase có xu hướng giảm. Điều này được giải thích do protease trong tế bào được sinh ra đã phân cắt và phá vỡ các cấu trúc cellulase, dẫn đến sự sụt giảm hoạt tính. Do đó, chúng tôi lựa chọn thời gian thu hồi cellulase trong khoảng từ 120-144 giờ. Theo các nghiên cứu của El-Naggar N.E.A (2014), Azzeddine B (2013), việc thu hồi cellulase từ các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* B-PNG23, *S. albogriseolus* sau 6-7 ngày lên men; sau 7 ngày, hoạt tính cellulase giảm [7, 12].

4. KẾT LUẬN

Xạ khuẩn *S. thermocarboxydus* MIP_GN36 sinh tổng hợp cellulase cao nhất trên trong môi trường A2, ở nhiệt độ 45°C, pH ban đầu 7,0, nồng độ cơ chất CMC 1,5%. Trong môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp trên, chủng MIP_GN36 sinh tổng hợp cellulase đạt 22,5 U/mL sau 120 giờ nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yati Soeka et al. (2019), "Characterization of cellulase enzyme produced by two selected characterization of cellulase enzyme produced by 2 selected", *Makara Journal of Science*, 23.
2. Chu Thanh Bình (2024), "Hoạt tính đối kháng với vi sinh vật gây bệnh cho người của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* MIP_GN36 phân lập từ đất vùng rễ cây Gừng (*Zingiber officinale*)", *Tạp chí Y học Quân sự*, Số 369, tr. 52-57.
3. K Tamura, G Stecher, D Peterson, A Filipinski, S Kumar (2013), "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
4. Miller G.L (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars", *Anal Chem.*, 31: 426-428.
5. Wasana Suyotha et al. (2023), "Evaluation of the potential use of thermotolerant lignocellulolytic *Streptomyces thermocarboxydus* ME742 and the mutant MEEMS15-16 as inoculum for effective composting of wastes from palm oil mill", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 54.
6. Kano KASUGA et al. (2018), "Heterologous expression of *Streptomyces* cellulase genes for the molecular breeding of antibiotic producing *Streptomyces* from cellulosic biomass", *Soc. Mater. Eng. Resour.*, 23 (2).
7. El-Naggar N.E.A, Abdelwahed N.A.M, Saber W.I.A, Mohamed A.A (2014), "Bioprocessing of some agro-industrial residues for endoglucanase production by the new subsp.; "*Streptomyces albogriseolus*" subsp. cellulolyticus strain NEAEJ", *Brazilian Journal of Microbiology* 45 (2): 743-756.
8. Chellapandi P, Jani H.M (2008), "Production of endoglucanase by the native strains of "*Streptomyces*" isolates in submerged fermentation", *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:122-127.
9. Yati Sudaryati Soeka (2019), "Characterization of cellulase enzyme produced by two selected strains of *Streptomyces macrosporeus* isolated from soil in Indonesia", *Makara Journal of Science*, 65-71.
10. Lugani Y, Singla R, Sooch B.S (2015), "Optimization of cellulase production from newli isolated *Bacillus* sp. Y3", *J. Bioprocess Biotech.*, 5:11.
11. Chellapandi P, Jani H.M (2008), "Production of endoglucanase by the native strains of "*Streptomyces*" isolates in submerged fermentation", *Brazilian Journal of Microbiology* 39:122-127.
12. Azzeddine B, Abdelaziz M, Estelle C, Mouloud K, Nawel B, Nabila B, Francis D, Said B (2013), "Optimization and partial characterization of endoglucanase produced by "*Streptomyces*" SP. B-PNG23", *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 65 (2): 549-558. □