

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *BACILLUS* CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP POLYMER NGOẠI BÀO POLYGLUTAMIC AXIT

Lê Anh Tuấn*, Lê Thị Hoàng Oanh, Phạm Văn Quang,
Nguyễn Đăng Lưu, Vũ Hồng Quân, Lê Ngọc Anh
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG Hà Nội

TÓM TẮT

Hiện nay hướng sử dụng các hoạt chất do vi sinh vật tạo ra để xử lý môi trường đang được quan tâm nghiên cứu. Axit polyglutamic (PGA) là một polymer sinh học được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau và có tiềm năng ứng dụng như chất keo tụ sinh học trong xử lý nước. Vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* có rất nhiều ứng dụng trong sản xuất các hoạt chất sinh học và có vai trò quan trọng trong sản xuất PGA. Nghiên cứu nhằm mục đích phân lập, tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* từ sản phẩm đậu tương lên men nhằm cung cấp nguồn giống cho các nghiên cứu nhằm sản xuất và ứng dụng PGA với vai trò là chất keo tụ sinh học trong xử lý môi trường. Sau khi sử dụng các phương pháp phân lập, chọn lọc và kiểm chứng bằng quang phổ hồng ngoại FT-IR kết quả thu được 4 chủng *Bacillus* từ sản phẩm đậu tương lên men Natto và đã tuyển chọn được 2 chủng có khả năng sinh tổng hợp PGA cao nhất gồm B11, B33, là tiền đề cho sản xuất PGA phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: Công nghệ sinh học; *Bacillus*; polymer ngoại bào; Polyglutamic Axit; Natto.

Ngày nhận bài: 17/7/2020; Ngày hoàn thiện: 30/7/2020; Ngày đăng: 31/7/2020

ISOLATION AND SELECTION OF *BACILLUS* STRAINS WITH CAPABILITY IN PRODUCTION OF POLYGLUTAMIC ACID

Le Anh Tuan*, Le Thi Hoang Oanh, Pham Van Quang,
Nguyen Dang Luu, Vu Hong Quan, Le Ngoc Anh
VNU - University of Science

ABSTRACT

Currently, attentions are drawn to studies about application of active substances produced by microbes in environmental treatment. Polyglutamic acid (PGA) is one of biological polymers that has multiple applications in different fields and has a great potential use as biological coagulant in water treatment. Bacteria under *Bacillus* group are useful in production of biologically active substances and have a significant role in PGA production. This study aimed to isolate and select *Bacillus* bacteria from fermented soya bean product in order to provide seed strain for further investigations on production and application of PGA in the role of biological coagulant. After using isolation, selection and verification methods by FT-IR infrared spectroscopy, four *Bacillus* strains from Natto fermented soybean products were obtained, of which two strains have been selected with better PGA production performance B11, B33, is a prerequisite for PGA production for further studies.

Keywords: Biotechnology; *Bacillus*; Biopolymer; Polyglutamic Acid; Natto.

Received: 17/7/2020; Revised: 30/7/2020; Published: 31/7/2020

* Corresponding author. Email: letuan.fes@hus.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Polymer sinh học là polymer của thế kỷ 21, được dùng để thay thế polymer tổng hợp ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như thực phẩm, nông nghiệp, y dược, môi trường,... Một trong những loại polymer sinh học quan trọng là polymer ngoại bào - một sản phẩm sinh ra từ hoạt động trao đổi chất của các vi sinh vật và tiết ra ngoài tế bào. Trong các loài vi sinh vật tiềm năng, *Bacillus subtilis* với khả năng sản xuất probiotic, enzyme như amylase, protease, thuốc trừ sâu, thuốc kháng sinh, nucleotide purine, D- ribose, polyhydroxybutyrate, polymer ngoại bào như axit polyglutamic (PGA) được nghiên cứu và ứng dụng nhiều [1]. PGA là một polymer anion, tính nhớt cao được tạo lên từ vô số các phân tử axit glutamic liên kết với nhau thông qua các liên kết γ , PGA tan trong nước, có khả năng phân hủy sinh học, ăn được, không độc với người và động vật [2]. PGA được ứng dụng trong các lĩnh vực như chất mang, chất giữ ẩm trong y dược [3], phụ gia ổn định chất lượng sản phẩm trong thực phẩm [4], và chất keo tụ hỗ trợ quá trình lắng trong lĩnh vực môi trường [5].

Hiện nay, các nghiên cứu về vi khuẩn *Bacillus subtilis* tập trung chủ yếu vào các khả năng sinh enzyme, khả năng kháng khuẩn, khả năng xử lý ô nhiễm hữu cơ; hay nghiên cứu về các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển cũng như tối ưu hóa quá trình sản xuất sinh khối vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Tuy vậy, chưa có nhiều nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp polymer ngoại bào PGA.

Nhận thấy những triển vọng ứng dụng và lợi ích của PGA đem lại cho cộng đồng và môi trường, đề tài đã tiến hành phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PGA nhằm chủ động nguồn giống sử dụng trong các nghiên cứu và ứng dụng tiếp theo.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

2.1.1. Nguồn phân lập

Đề lựa chọn được các chủng *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp PGA, đề tài lựa chọn sản phẩm đậu tương lên men để tiến hành phân lập.

2.1.2. Hóa chất:

Môi trường phân lập *Bacillus* Soyabean Casein Digest Medium (SCDM) với thành phần Triptone (17 g/l), Soya peptone (3 g/l), NaCl (5 g/l), K_2HPO_4 (2,5 g/l), Dextrose (2,5 g/l) và pH 7.3 ± 0.2

Môi trường tăng sinh: Glucose (25 g/l); Axit L Glutamic (20 g/l); Axit citric (10 g/l); NH_4Cl (6 g/l); K_2HPO_4 (1 g/l); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g/l); $MnSO_4$ (0.05 g/l); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.2 g/l); $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ (0.03 g/l)

Môi trường Agar- $CaCO_3$: $CaCO_3$ (10 g/l); Agar (20 g/l).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn

Các chủng *Bacillus* được phân lập từ đậu tương lên men bằng phương pháp trải trên môi trường thạch SCDM, ủ ở nhiệt độ $37^\circ C$ trong thời gian 1-2 ngày. Các khuẩn lạc được làm thuần và bảo quản trong ống thạch nghiêng ở $4^\circ C$.

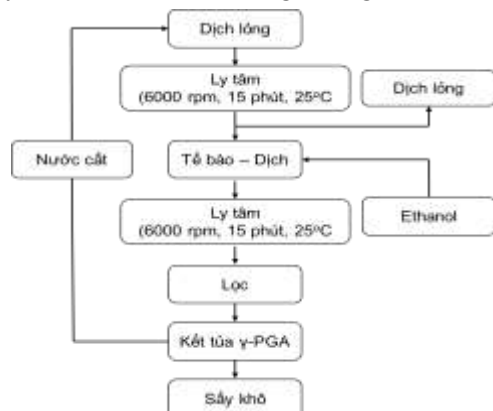
2.2.2. Chọn lọc chủng vi khuẩn

Môi trường Agar- $CaCO_3$ được chuẩn bị và đổ ra đĩa petri, đợi đông rắn và khoan giếng trên môi trường. Cho 0,5 ml dịch nuôi cấy sau khi ly tâm vào các giếng thạch và nuôi ở $37^\circ C$. Đo và so sánh vòng phân giải sinh ra xung quanh giếng sau 48 giờ. Các nghiệm thức được thực hiện 3 lần lặp lại, các chủng có vòng phân giải lớn sẽ được tuyển chọn để thử khả năng sinh tổng hợp PGA.

2.2.3. Tách, tinh sạch PGA

Sau thời gian nuôi cấy, lọc lấy phần dịch lỏng của môi trường và đem ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút để loại bỏ phần rắn lơ lửng. Sau khi ly tâm pha dịch lỏng thu được với cồn 95° , PGA sẽ kết tủa. Sản phẩm thu được tiếp tục hòa vào nước rồi thực hiện

lại quá trình, sau khi thực hiện quá trình tinh sạch ta thu được sản phẩm [6]. Đem sản phẩm sấy ở 40°C đến khối lượng không đổi.



Hình 1. Quy trình thu hồi và tinh sạch PGA

2.2.4. Kiểm chứng PGA thu được

Sau khi thu được polymer ngoại bào, sử dụng phương pháp quang phổ hồng ngoại FT-IR để xác định các loại nhóm chức và các liên kết có trong phân tử hợp chất hóa học nhằm kiểm chứng khả năng sinh PGA của *Bacillus*.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập vi khuẩn *Bacillus* sp. từ đậu tương lên men

Vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PGA thường là các chủng thuộc *Bacillus* [7], [8], là vi khuẩn sinh bào tử, gram dương, đặc điểm hình thái dạng hình que khi soi trên kính hiển vi, khuẩn lạc tròn mép viền thường có hình

răng cưa. Đây là những đặc tính nhận dạng để đánh giá phân loại và lựa chọn giống. Từ mẫu đậu tương lên men tiến hành phân lập bằng môi trường thạch SCDM, sau đó quan sát hình thái khuẩn lạc, kết quả sau khi phân lập, được 4 chủng vi khuẩn qua các phương pháp hình thái, nhuộm bào tử, nhuộm gram, được đánh số từ B11 đến B44. Các chủng này có đặc điểm hình thái khuẩn lạc như thống kê tại bảng 1 và hình 2.

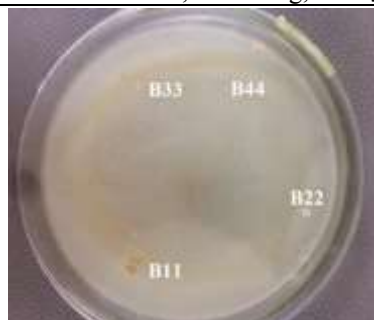
3.2. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp polymer ngoại bào của chủng vi khuẩn

Khi nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường tăng sinh sẽ tạo ra được sản phẩm PGA. Khi bổ sung CaCO_3 vào môi trường sẽ có phản ứng axit-bazơ giữa CaCO_3 với PGA tạo muối nên làm tan CaCO_3 tạo vòng thủy phân. Vì vậy có thể sử dụng phương pháp đục lỗ thạch để xác định vòng phản ứng nhằm lựa chọn chủng vi khuẩn có khả năng tạo PGA nhiều nhất, đường kính vòng thủy phân đo được càng lớn chứng tỏ khả năng sinh tổng hợp PGA của chủng vi khuẩn đó càng cao.

Thực hiện tuyển chọn vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PGA trên môi trường chứa 1% CaCO_3 + 2% agar + H_2O được ủ sau 72h rồi nhuộm bằng Lugol cho thấy chủng B22 và B44 không có vòng phân giải CaCO_3 , chủng B11 và B33 có vòng phân giải CaCO_3 .

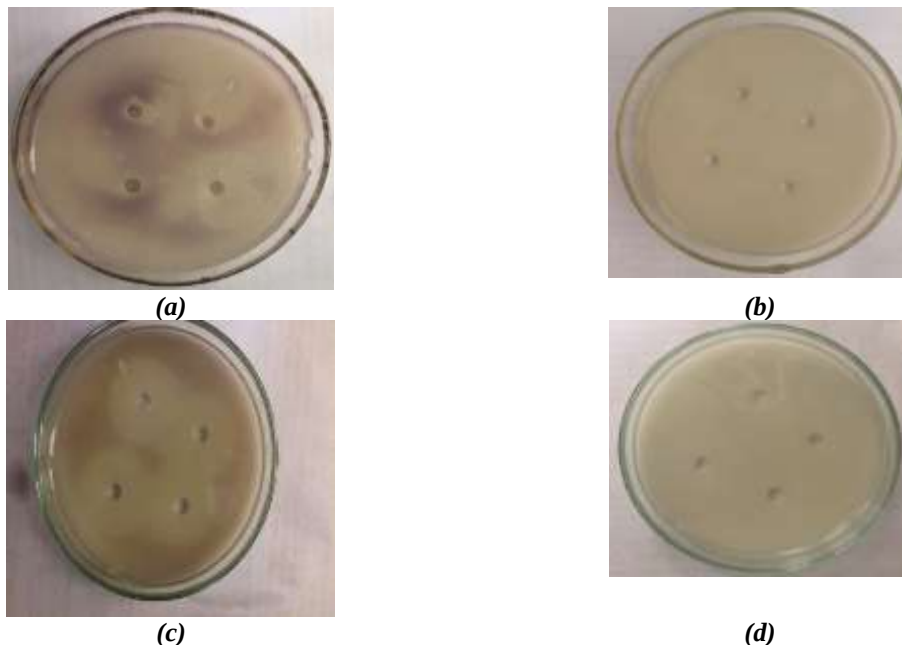
Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn phân lập từ đậu lên men

TT	Chủng	Đặc điểm hình thái	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Nhuộm Gram
1	B11	Tròn không đều, màu vàng đậm, nhẵn, mép răng cưa.	2 - 4	+
2	B22	Màu trắng hồng, nổi cộm, bề mặt trơn, mép mịn.	2 - 2,5	+
3	B33	Dạng tròn, màu trắng ngà, bề mặt lồi, trơn.	2	+
4	B44	Tròn đều, màu trắng, bề mặt trơn bóng, mép răng cưa.	1 - 1,5	+



Hình 2. Khuẩn lạc của chủng vi khuẩn phân lập từ đậu lên men

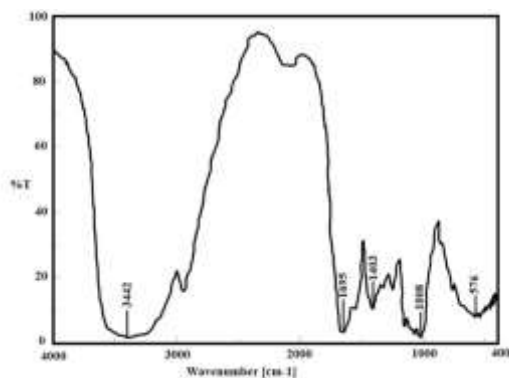
Như vậy, chủng B22 và B44 không có khả năng sinh tổng hợp polymer ngoại bào; chủng B33 và B11 có vòng phân giải (hình 3a và 3c), trong đó chủng B33 tạo vòng phân giải lớn nhất với đường kính 2 cm.



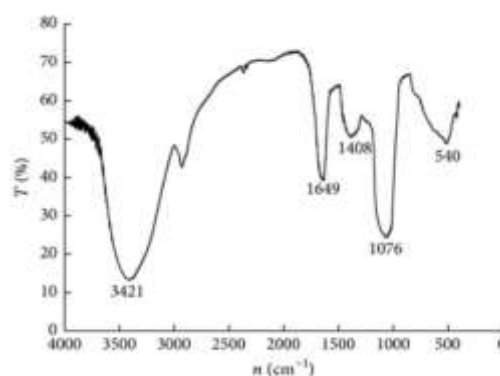
Hình 3. Vòng phân giải của chủng: (a) B11, (b) B22, (c) B33, (d) B44

3.3. Phổ hồng ngoại FT-IR của polymer ngoại bào thu được

Các sản phẩm sau khi tinh sạch được phân tích bằng phổ hồng ngoại trong vùng phổ có tần số sóng 4000 - 400 cm^{-1} . Kết quả thu được sau khi phân tích sẽ bao gồm các đỉnh peak. So sánh kết quả thu được với kết quả của mẫu chuẩn sẽ biết được sản phẩm thu được có phải PGA hay không. Kết quả phân tích phổ thu được như hình 4 và phổ FT-IR của γ -PGA được thể hiện ở hình 5 [9].



Hình 4. Phổ FT-IR của sản phẩm sau khi tinh sạch thu được từ chủng *Bacillus* sp.



Hình 5. Phổ FT-IR của γ -PGA trong một nghiên cứu của Huixia Zhang và các cộng sự (2016)

Phổ FT-IR của γ -PGA sau tinh sạch, thu được bởi chủng *Bacillus* sp. (Hình 4) và γ -PGA mẫu chuẩn (Hình 5) cho thấy sự tương đồng rất lớn về hình dạng và có các đỉnh peak với số sóng tương tự. Đỉnh hấp thụ ở số sóng 3442 cm^{-1} đại diện cho gốc NH trong nhóm amin của γ -PGA; đỉnh với số sóng 1695 và 1403 lần lượt thể hiện các gốc -CONHR và gốc cacboxyl -COOH; các đỉnh với số sóng 1008 và 576 đặc trưng cho các gốc -CH₂ hoặc -CH₃ và (CH₂)_n với n>4. Như vậy, qua việc so

sánh và đánh giá các peak của 2 đồ thị, ta có thể thấy sản phẩm sau khi tinh sạch thu được từ chủng *Bacillus sp.* đã thể hiện phổ đặc trưng cho các liên kết hóa học của γ -PGA.

4. Kết luận

Từ nguồn đầu lên men đã phân lập được 4 chủng *Bacillus sp.* và tuyển chọn được 2 chủng B11 và B33 có khả năng sinh tổng hợp PGA, chủng B33 có khả năng sinh tổng hợp PGA cao nhất. Tuy chỉ là bước đầu nghiên cứu trong phòng thí nghiệm nhưng là nghiên cứu cơ bản có mang tính ứng dụng cụ thể cho điều kiện sản xuất polymer ngoại bào PGA phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên trong đề tài mã số TN.19.17.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. M. Marvasi, P. T. Visscher, and L. C. Martinez, "Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis," *FEMS microbiology letters*, vol. 313(1), pp. 1-9, 2010.
- [2]. I. N. Najar, and S. Das, "Poly-glutamic acid (PGA)-Structure, synthesis, genomic organization and its application: A Review," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 6(6), pp. 2258-2280, 2015.
- [3]. I. B. Bajaj, and R. S. Singhal, "Sequential Optimization Approach for Enhanced Production of Poly- γ -Glutamic Acid from Newly Isolated *Bacillus subtilis*," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 47(3), pp. 313-322, 2009.
- [4]. E. Baruch, A. M. Belostotskii, and Y. Mastai, "Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of polyols," *Journal of Molecular Structure*, vol. 874(1-3), pp. 170-177, 2008.
- [5]. V. Campos, J. M. Domingos, D. N. Anjos, and V. S. Lira, "Study of fluvial water treatability using γ -polyglutamic acid based biopolymer coagulant," *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, vol. 91(3), pp. 1-8, 2019.
- [6]. B. Manocha, and A. Margaritis, "A novel Method for the selective recovery and purification of γ -polyglutamic acid from *Bacillus licheniformis* fermentation broth," *Biotechnology progress*, vol. 26(3), pp. 734-742, 2010.
- [7]. M. Ashiuchi, T. Kamei, D. H. Baek, S. Y. Shin, M. H. Sung, K. Soda, T. Yagi, and H. Misono, "Isolation of *Bacillus subtilis* (chungkookjang), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57(5-6), pp. 764-769, 2001.
- [8]. I. N. Bajaj, and R. S. Singhal, "Flocculation Properties of Poly γ Glutamic Acid Produced from *Bacillus subtilis* Isolate," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 4(5), pp. 745-752, 2011.
- [9]. J. H. Zhang, and M. Luo, "Cloning and Expression of the γ -Polyglutamic Acid Synthetase Gene pgs BCA in *Bacillus subtilis* WB600," *BioMed Research International*, vol. 2016, vol. 1-7, 2016.