

## NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÓA SINH VÀ ĐỊNH LOẠI CHỦNG VI KHUẨN MT38 PHÂN LẬP TỪ CHỢP MẮM TÔM CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ECTOINES

Đoàn Văn Thuộc

*Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*

**Tóm tắt** Chủng vi khuẩn MT38 có khả năng sinh tổng hợp ectoines được phân lập từ chợp mắm tôm là vi khuẩn Gram dương, ưa mặn trung bình, sinh trưởng tốt nhất ở nồng độ NaCl từ 8-10%, nhiệt độ 30-32°C, pH trung tính (7,0-7,2). Trình tự đoạn gen 16S rDNA và đặc điểm hóa sinh của chủng MT38 khá tương đồng với các vi khuẩn thuộc chi *Salimicrobium* nên chúng tôi đặt tên cho chủng này là *Salimicrobium* sp. MT38. Khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp ectoines của chủng *Salimicrobium* sp. MT38 ở các nồng độ NaCl khác nhau cũng đã được nghiên cứu: khối lượng sinh khối khô (cell dry weight - CDW) đạt giá trị cực đại (2,3 g/L) ở nồng độ 10% NaCl, trong khi đó hàm lượng ectoines đạt giá trị cực đại (15,9% khối lượng tế bào khô) ở nồng độ 15% NaCl.

**Từ khóa:** Ectoines, hợp chất tương thích, chợp mắm, *Salimicrobium*.

### 1. Mở đầu

Mắm tôm là sản phẩm truyền thống được chế biến theo phương pháp lên men theo công thức 5-8 nguyên liệu:1 muối [1]. Nguyên liệu thường được sử dụng làm mắm tôm là loài tép biển *Acetes japonicus*. Chợp mắm được ủ ở nhiệt độ cao trong thời gian từ 6 tháng đến 1 năm. Trong quá trình ủ, các vi sinh vật sẽ phân hủy và chuyển hóa các hợp chất cao phân tử thành các hợp chất đơn giản, ví dụ như chuyển hóa protein thành các axit amin. Do vậy, hàm lượng đạm dễ tiêu trong mắm tôm thường khá cao [1].

Để có thể sinh trưởng và hoạt động được trong điều kiện môi trường có hàm lượng muối cao – môi trường có áp suất thẩm thấu lớn, các vi sinh vật cần có cơ chế thích nghi đặc biệt để cân bằng áp suất thẩm thấu và tránh mất nước. Một trong những cơ chế thích nghi điển hình được rất nhiều vi khuẩn sử dụng là sinh tổng hợp các hợp chất tương thích. Hợp chất tương thích là các chất hữu cơ có phân tử nhỏ ví dụ như đường, các polyol, các axit amin và đồng phân, ectoines, và betaine. Các hợp chất tương thích thường trung hòa điện tích và có khả năng hòa tan cao [2]. Ectoines (ectoine và dẫn xuất hydroxyl của nó, hydroxyectoine – H-ectoine) là các hợp chất tương thích phổ biến được tìm thấy trong tế bào của nhiều vi khuẩn ưa mặn và chịu mặn. Bên cạnh chức năng giúp tế bào cân bằng áp suất thẩm thấu, rất nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh rằng các hợp chất tương thích nói chung và đặc biệt là ectoines nói riêng có khả năng bảo vệ enzyme, DNA, và tế bào chống lại các điều kiện môi trường bất lợi như tia UV, nhiệt độ cao hoặc thấp, điều kiện khô hạn và pH bất lợi [3-5].

Chủng MT38 là chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp ectoines được phân lập từ chợp mắm tôm thu thập từ xã Hải Chiểu, huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định. Trong nghiên cứu này các đặc điểm hóa sinh và chủng loại phát sinh của chủng vi khuẩn này được tiến hành nghiên cứu,

---

Ngày nhận bài: 19/8/2019. Ngày sửa bài: 29/9/2019. Ngày nhận đăng: 2/10/2019.

Tác giả liên hệ: Đoàn Văn Thuộc. Địa chỉ e-mail: [thuocdv@hnue.edu.vn](mailto:thuocdv@hnue.edu.vn)

ngoài ra sự ảnh hưởng của nồng độ NaCl của môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp ectoines của chủng vi khuẩn này cũng được khảo sát.

## 2. Nội dung nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 2.1.1. Nghiên cứu đánh giá khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp ectoine của chủng vi khuẩn MT38 ở các nồng độ muối khác nhau

Chủng vi khuẩn MT38 được nuôi trên môi trường LB có nồng độ muối 10%, 12,5%, 15% và 17.5% nhiệt độ 35 °C, tốc độ lắc 180 vòng/phút. Sau 30 giờ nuôi cấy, thu mẫu để xác định khối lượng tế bào khô (CDW) và phân tích hàm lượng ectoines tích lũy trong tế bào.

#### 2.1.2. Nghiên cứu đặc điểm hóa sinh của chủng MT38

Đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn tuyển chọn được xác định dựa vào bộ kit ID 32 E (Biomérieux, Pháp). Qui trình kiểm tra được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

#### 2.1.3. Định loại vi khuẩn bằng kỹ thuật di truyền phân tử

Nuôi cấy chủng tuyển chọn trên môi trường MPA lỏng trong 13 giờ. Li tâm thu sinh khối và tiến hành tách chiết DNA tổng số theo các bước trong bộ kit “GeneJET Genomic DNA Purification Kit”. DNA tổng số được sử dụng để tiến hành phản ứng PCR nhằm khuếch đại đoạn trình tự gen 16S rRNA với cặp mồi: 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'. Sản phẩm PCR được gửi tới công ty 1<sup>st</sup> Base (Singapore) để giải trình tự. Trình tự gen sau đó được so sánh với ngân hàng gen để xác định chủng loại phát sinh của chủng vi khuẩn tuyển chọn. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa vào phần mềm Mega 6 [6].

#### 2.1.4. Các phương pháp phân tích

##### 2.1.4.1. Phương pháp xác định sinh khối khô

Sinh khối khô (CDW) được xác định theo các bước như sau: chuẩn bị eppendorf 2 ml đánh số thứ tự, sấy khô đến khối lượng không đổi sau đó cân để xác định khối lượng ban đầu của từng eppendorf. Hút 2 lần mỗi lần 1,5 mL dịch nuôi cấy cho vào eppendorf, li tâm 12000 vòng/phút trong 5 phút, giữ lại sinh khối tế bào. Rửa sinh khối bằng nước cất, sấy khô eppendorf chứa sinh khối ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi. Cân để xác định khối lượng sinh khối khô có trong từng ống eppendorf, mỗi mẫu lặp lại 3 lần để lấy giá trị trung bình.

##### 2.1.4.2. Phương pháp xác định hàm lượng ectoine

Ectoine trong tế bào được tách chiết theo phương pháp đã được mô tả bởi Kunte *et al.* [7]. Cân 10 mg sinh khối tế bào khô hòa trong 570  $\mu$ L dung dịch có chứa hỗn hợp methanol/chloroform/nước theo tỷ lệ 10:5:4 (v/v). Trộn đều hỗn hợp trong 5 phút sau đó bổ sung 170  $\mu$ L chloroform và 170  $\mu$ L nước. Tiếp tục trộn đều hỗn hợp trong 10 phút, ly tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút để phân tách pha chloroform và pha methanol với nước. Dung dịch ưa nước phía trên có chứa ectoine sẽ được sử dụng để phân tích. Hàm lượng ectoine tích lũy trong tế bào được xác định bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột Aminex HPX-87C, dung dịch chạy là 5mM CaCl<sub>2</sub> tốc độ dòng chảy là 0,3 L/phút, nhiệt độ cột 65°C. Ectoine và hydroxyectoine tinh sạch mua của công ty Sigma (Mỹ) được sử dụng để xây dựng đồ thị chuẩn. Dựa vào đồ thị chuẩn để xác định hàm lượng ectoine trong từng mẫu thí nghiệm.

### 2.2. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

#### 2.2.1. Một số đặc điểm hóa sinh của chủng vi khuẩn M38

Một số đặc điểm hóa sinh của chủng M38 đã được chúng tôi xác định, kết quả nghiên cứu được trình bày trong Bảng 1. Chủng MT38 là vi khuẩn Gram dương, sinh trưởng tốt nhất ở pH=7,0-7,2; nhiệt độ 30-32°C; nồng độ NaCl khoảng 8-10%. Chủng MT38 có khả năng hình thành Indole, có khả năng sinh tổng hợp alpha-glucosidase. Tuy nhiên, chủng M38 không có khả

năng sinh tổng hợp ornithine decarboxylase, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, urease, lipase, beta-glucosidase, beta-glucoronidase, N-acetyl-beta-glucosaminidase, beta-galactosidase, alpha-glucosidase, alpha-galactosidase, alpha-maltosidase và L-aspartic acid arylamidase. Khả năng sử dụng nguồn các bon của chủng vi khuẩn MT38 khá hạn chế: chủng này chỉ có sử dụng một số nguồn các bon như D-glucose, sucrose, D-arabitol, 5-ketogluconate; các nguồn các bon khác như L-arabitol, D-manitol, D-maltose, adonitol, palatinose, malonate, L-arabinose, D-trehalose, L-rhamnose, inositol, D-cellobiose, D-sorbitol đều không thể sử dụng bởi chủng MT38.

**Bảng 1. Kết quả kiểm tra đặc điểm hóa sinh của chủng vi khuẩn M38**

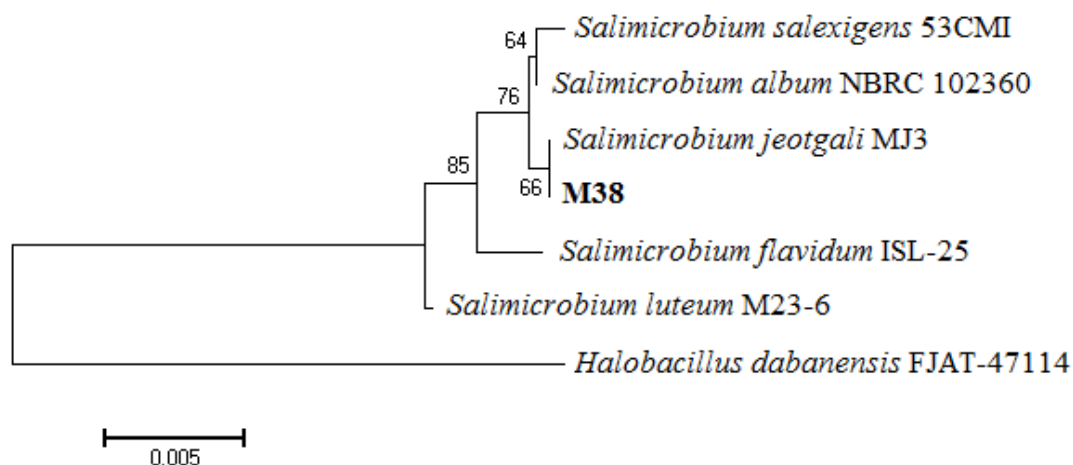
<b>Đặc điểm hóa sinh</b>	<b>Biểu hiện</b>	<b>Đặc điểm hóa sinh</b>	<b>Biểu hiện</b>
Gram	+	pH tối ưu	7,0-7,2
Nhiệt độ tối ưu	30-32°C	NaCl tối ưu	8-10%
Ornithine decarboxylase	-	Hình thành Indole	+
Arginine dihydrolase	-	N-acetyl-beta-glucosaminidase	-
Lysine decarboxylase	-	Beta-galactosidase	-
Urease	-	D-glucose	+
L-arabitol	-	Sucrose	+
Galacturonate	-	L-arabinose	-
5-ketogluconate	+	D-arabitol	+
Lipase	-	Alpha-glucosidase	+
Phenol đỏ	-	Alpha-galactosidase	-
Beta-glucosidase	-	D-trehalose	-
D-manitol	-	L-rhamnose	-
D-maltose	-	Inositol	-
Adonitol	-	D-cellobiose	-
Palatinose	-	D-sorbitol	-
Beta-glucoronidase	-	Alpha-maltosidase	-
Malonate	-	L-aspartic acid arylamidase	-

*Ghi chú:* (+) có khả năng sinh tổng hợp enzyme và sử dụng, (-) không có khả năng sử dụng

### **2.2.2. Nghiên cứu định loại chủng vi khuẩn tuyển chọn**

Chúng tôi đã tiến hành tách chiết bộ gen của chủng MT38, sau đó tiến hành PCR nhờ cặp mồi đặc hiệu để phân lập đoạn trình tự gen 16S rDNA của chủng vi khuẩn MT38. Chúng tôi đã phân lập được đoạn trình tự gen 16S rDNA có kích thước khoảng 1500 bp. Sản phẩm PCR sau đó đã được công ty 1<sup>st</sup> Base giải trình tự. Trình tự gen sau đó đã được chúng tôi sử dụng để so sánh với các trình tự 16S rDNA có trong ngân hàng gen thế giới. Kết quả cho thấy đoạn trình tự gen 16S rDNA của chủng MT38 khá tương đồng với trình tự của các chủng vi khuẩn thuộc chi

*Salimicrobium*. Đặc biệt, trình tự đoạn gen 16S rDNA của chủng MT38 tương đồng tới 99,5% với trình tự gen của chủng *Salimicrobium jeotgali* MJ3 (Hình 1).

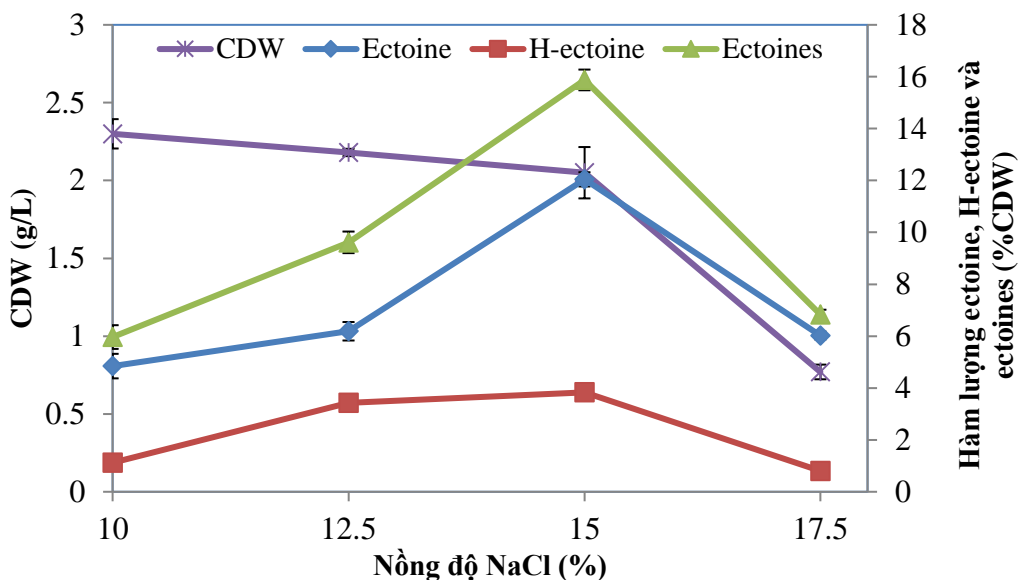


**Hình 1. Cây phát sinh chủng loại thể hiện mối quan hệ gần gũi giữa chủng MT38 và các loài vi khuẩn thuộc chi *Salimicrobium*.**

Chủng *Salimicrobium jeotgali* MJ3 là vi khuẩn Gram dương được phân lập từ hải sản lên men truyền thống ở Hàn Quốc [8]. Chủng vi khuẩn này cũng có rất nhiều đặc điểm hóa sinh tương đồng với chủng MT38, ví dụ như đều là vi khuẩn Gram dương, có khả năng hình thành indole, sinh trưởng tốt ở pH trung tính, nhiệt độ 30-32°C, nồng độ NaCl khoảng 10%. đều có khả năng sinh tổng hợp  $\alpha$ -glucosidase nhưng không tổng hợp  $\beta$ -galactosidase. Tuy nhiên giữa 2 chủng này cũng có sự khác biệt ở khả năng sử dụng một số nguồn các bon như D-manlitol, D-sorbitol. Dựa vào sự tương đồng của đoạn trình tự gen 16S rDNA và các đặc điểm hóa sinh chúng tôi kết luận MT38 là loài vi khuẩn thuộc chi *Salimicrobium* và được đặt tên là *Salimicrobium* sp. MT38.

### 2.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp ectoines của chủng MT38

Sau 30 giờ nuôi cấy ở các nồng độ muối khác nhau (10%; 12,5%; 15% và 17,5%), kết quả trong hình 2 cho thấy hàm lượng ectoines bao gồm cả ectoine và H-ectoine tăng khi nồng độ NaCl trong môi trường tăng lên. Hàm lượng ectoines (bao gồm cả ectoine và H-ectoine) tích lũy trong tế bào tăng từ 6% ở nồng độ 10% NaCl lên 9,6% ở nồng độ 12,5% NaCl và đạt giá trị cực đại là 15,9% (12% ectoine và 3,9% hydroxyectoine) ở nồng độ 15% NaCl; sau đó giảm xuống chỉ còn 6,8% ở nồng độ 17,5% NaCl. Ngược lại với xu hướng tăng của ectoines khi nồng độ NaCl tăng, sự sinh trưởng của chủng M38 bị ức chế ở khi nồng độ muối tăng. Khối lượng sinh khối khô (CDW) của chủng M38 đạt giá trị cực đại (2,3 g/L) ở nồng độ 10% NaCl, CDW giảm dần và chỉ còn 0,77 g/L ở nồng độ 17,5% NaCl. Kết quả thu được trong nghiên cứu này cũng tương tự như kết quả thu được trong các nghiên cứu trước kia: khi tăng nồng độ NaCl trong môi trường nuôi cấy hàm lượng ectoine sẽ tăng nhưng tốc độ sinh trưởng sẽ giảm [9, 10]. Tuy nhiên, hàm lượng ectoines tích lũy trong tế bào sẽ không luôn tăng tỷ lệ thuận với hàm lượng NaCl trong môi trường, khả năng tích lũy ectoines sẽ giảm khi nồng độ muối trong môi trường tăng cao vượt ngưỡng chống chịu của tế bào vi khuẩn.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp ectoines của chủng vi khuẩn M38

### 3. Kết luận

Kết quả so sánh đoạn trình tự gen 16S rDNA và các đặc điểm hóa sinh cho thấy, chủng MT38 là một loài thuộc chi *Salimicrobium* nên được đặt tên là *Salimicrobium* sp. MT38. Khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp ectoines của chủng vi khuẩn MT38 phụ thuộc khá lớn vào nồng độ NaCl của môi trường nuôi cấy, hàm lượng ectoines đạt giá trị cực đại (15,9% khối lượng tế bào khô) khi được nuôi cấy trên môi trường có chứa 15% NaCl.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí từ Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (Nafosted) (đề tài mã số 106-NN.04-2016.11)

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Anh D.B.Q., Mi N.T.T., Huy D.N.A. and Hung P.V., 2014. *Isolation and optimization of growth condition of Bacillus sp. from fermented shrimp paste for high fibrinolytic enzyme production*. Arab. J. Sci. Eng., 40, pp. 23-28.
- [2]. Roberts M.F., 2005. *Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganism*. Saline Systems (On-line Journal), 1.5.
- [3]. Lippert G. and Galinski E. A., 1992. *Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, pp. 61-65.
- [4]. Van-Thuoc D., Hashim S.O., Hatti-Kaul R. and Mamo G., 2013. *Ectoine mediated protection of enzyme from the effect of pH and temperature stress: a study using Bacillus halodurans xylanase as a model*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 97, pp. 6271-6278.
- [5]. Schröter M.A., Meyer S., Hahn M.B., Solomun T., Sturm H. and Kunte H.J., 2017. *Ectoine protects DNA from damage by ionizing radiation*. Sci. Rep., 7.15272.
- [6]. Tamura K., Stecher G., Peterson D. and Filipski A., 2013. *MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. Mol. Bio. Evol., 30, pp. 2725-2729.
- [7]. Kunte H.J., Galinski E. A. and Trüper H. G., 1993. *A modified FMOC-method for the detection of aminoacid type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines)*. J. Microbiol. Meth., 17, pp. 129-136.

- [8]. Choi E.J., Jin H.M., Kim K.H. and Jeon C.O., 2014. *Salimicrobium jeotgali* sp. nov., isolated from salted, fermented seaffod. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 64, pp.3624-3630.
- [9]. Onraedt A.E., Walcarius B.A., Soetaert W.K. and Vandamme E.J., 2005. *Optimization of ectoine synthesis through fed-batch fermentation of Brevibacterium epidermis*. Biotechnol. Prog., 21, pp. 1206-1212.
- [10]. Van-Thuoc D., Guzmán H., Thi-Hang M. and Hatti-Kaul R., 2010. *Ectoine production by Halomonas boliviensis: Optimization using response surface methodology*. Mar. Biotechnology., 12, pp. 586-593.

## ABSTRACT

### **Biochemical characteristics and identification of an ectoines-producing bacterium isolated from fermenting shrimp paste**

Doan Van Thuoc

*Faculty of Biology, Hanoi National University of Education*

In this study, an ectoine producing bacterial strain, MT38, was isolated from fermenting shrimp paste and investigated. Strain MT38 is a Gram-positive and moderate halophilic bacterium, which grows optimally at NaCl concentration of 8-10%, a temperature of 30-32°C, and a neutral pH (7.0-7.2). The sequence of 16S rDNA gene and some biochemical characteristics of strain MT38 are similar to those of the genus *Salimicrobium*. Thus, the strain MT38 was named as *Salimicrobium* sp. MT38. The ability of growth and ectoine accumulation of the strain *Salimicrobium* sp. MT38 at different NaCl concentrations was also investigated. A maximum CDW of 2.3 g/L and ectoines production of 15.9% were obtained at NaCl concentrations of 10% and 15%, respectively.

**Keywords:** Ectoines, compatible solute, fermenting shrimp paste, *Salimicrobium*.