PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG XẠ KHUẨN TỪ RONG BIỂN CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYME ALGINATE LYASE

ISOLATION AND SELECTION ACTINOBACTERIA GROWING ON SEAWEED WITH THE ABILITY TO PRODUCE ALGINATE LYASE

Nguyễn Thị Như Thường, Văn Hồng Cầm, Nguyễn Thị Anh Thư, Phạm Thị Lan
Viện Công nghệ Sinh học & Môi trường, Trường Đại học Nha Trang
Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Như Thường (Email: nhuthuongnt@ntu.edu.vn)
Ngày nhận bài: 09/01/2023; Ngày phản biện thông qua: 20/02/2023; Ngày duyệt đăng: 28/03/2023

TÓM TẮT

Enzyme thủy phân polysaccharide đóng một vai trò quan trọng trong khám phá chức năng sinh học của các oligosaccharit. Mặc dù đã có nhiều báo cáo về enzyme có nguồn gốc từ vi sinh vật có khả năng cắt mạch polysaccharit từ rong biển nhưng nghiên cứu về các enzyme được sinh tổng hợp từ xạ khuẩn thì còn rất hạn chế. Trong nghiên cứu này, có 20 chủng xạ khuẩn phân lập được từ rong nâu, trong đó chủng S1 được chứng minh là sinh tổng hợp enzyme alginate lyase có hoạt tính cao nhất với đường kính vòng tròn phân giải alginate đến 55 mm. Điều kiện thích hợp cho quá trình lên men sinh alginate lyase của chủng S1 là bổ sung 2% bột rong mơ Sargassum sp. và 2% muối NaCl, xạ khuẩn được nuôi cấy ở 30°C trên máy lắc với tốc độ 150 rpm/phút trong vòng 6 ngày. Phân tích trình tự 16S rRNA xác định chủng S1 là chủng Streptomyces sampsonii với độ tương đồng là 99,85% khi so sánh với trình tự gen 16S rRNA của các loài xạ khuẩn có sẵn trên Genbank.

Từ khóa: *Aginate lyase, rong biển, xạ khuẩn.*

ABSTRACT

Polysaccharide-degrading enzymes have played an important role in discovering of biological functional unsaturated oligosaccharides. Although many such enzymes that can degrade polysaccharides from seaweed have been reported, the enzymes extracted from actinobacteria are rather limited. In this study, there are 20 strains of actinobacteria isolated from brown seaweed, in which strain S1 showed the highest activity of alginate lyase with an alginolytic zone on an alginate agar plate of 55 mm. The optimum culture conditions for strain S1 contained the main ingredients of Sargassum sp. seaweed powder 2% and NaCl 2%; it was incubated at 30°C with sharking at 150 rpm within 6 days. Strain S1 was identified as Streptomyces sampsonii by 16S rRNA sequence analysis, with 99.85% similarity compared with 16S rRNA sequences of actinobacterial species on Genbank.

Key words: *Alginate lyase, seaweed, actinobacteria.*

I. TỔNG QUAN

Alginate là thành phần chính trong thành tế bào của rong nâu, và là một polysacarit tuyến tính bao gồm 1,4 -D-mannuronate và -L-guluronate được sắp xếp theo các trình tự khác nhau với các vùng đồng nhất của block mannuronate (poly-M) hoặc block guluronate (poly-G), hoặc hỗn hợp mannuronate và guluronate (poly-MG) [1] [2]. Sự khác nhau của cấu trúc alginate là do sự khác nhau về kích thước của các block và tỷ lệ M/G, điều này phụ thuộc vào nguồn rong biển [3]. Lee and Mooney [4] tổng kết rằng có khoảng 200 loại alginate khác nhau đang được sản xuất. Alginate thường có khối lượng phân tử từ 500 kDa đến 1000 kDa [5]. Hàm lượng alginate trong rong nâu chiếm đến khoảng 40 – 47% trọng lượng khô [6]. Ngoài ra, oligoalginate hay còn gọi alginate oligosaccharide (AOS) là các polyme phân tử thấp được tạo thành từ β-D-mannuronic acid (M) và α-L-guluronic acid (G) gắn với nhau qua liên kết (1→4) glycoside, có thể thu bằng cách sử dụng enzyme để thủy phân alginate từ rong biển, đặc biệt là rong nâu. Với độ nhớt thấp và khả năng hòa tan trong nước tốt, cũng như với đặc tính chống oxy hóa,

điều hòa miễn dịch, kháng khuẩn và kháng viêm, oligoalginate đã được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực y tế, thực phẩm chức năng, nông nghiệp xanh và một số lĩnh vực khác.

Alginate lyase là một loại enzyme cắt các liên kết glycosyl trong phân tử alginate bằng cơ chế khử β tạo ra các oligosaccharide không bão hòa [7]. Alginate có thể được phân loại dựa vào phân cắt đặc hiệu với cơ chất, như PolyM lyase phân cắt đặc hiệu block polyM và PolyG lyase phân cắt đặc hiệu block polyG [8]. Tuy nhiên, một số alginate lyase có thể phân cắt được cả block polyM và polyG (polyMG lyase), loại này thể hiện hoạt tính sinh học cao. Mặt khác, alginate lyase cũng có thể được phân loại là endo- và exo- alginate lyase, dựa vào vị trí cắt của chúng trong mạch của phân tử alginate [1]. Endo- alginate lyase cắt các liên kết glycosid bên trong mạch polymer, giải phóng sản phẩm là các oligosacarit không bão hòa (di-, tri- và tetra-sacarit). Ngoài ra, Exo- alginate lyase cắt mạch polymer ở hai đầu để tạo thành các monomer [9-11]. Alginate lyase đã được chiết xuất từ nhiều nguồn như rong biển, động vật thân mềm (*Littorina* spp., *Turbo cornutus*, *Haliotis* spp.), và các vi sinh vật biển [8]. Các vi khuẩn đã được công bố là có khả năng sinh các enzyme phân giải alginate trong rong nâu như *Alginovibrio aquatilis*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas maltophilia, Flavourbacterium* sp. và *Vibrio* sp. [12] (Kim và cs, 2013). Schaumann và Weide (1990) đã chứng minh rằng có bốn loài nấm biển có khả năng sản sinh ra alginate lyase phân cắt alginate là *Asteromyces cruciatus, Dendryphiella arenaria, Dendryphiella salina,* và *Corollospora intermedia* [13]. Ngoài ra, cũng có một số nghiên cứu về xạ khuẩn sinh tổng hợp alginate lyase như *Streptomyces*. sp ALG5 và *Streptomyces* sp. M3 [14, 15].

Xạ khuẩn (Actinobacteria) phân lập từ các mẫu có nguồn gốc từ biển được biết đến là một trong những nhóm vi khuẩn quan trọng. Cho đến nay một trong những chi của xạ khuẩn có số lượng loài lớn nhất được xác định là *Streptomyces*. Dhanasekaran (2012) cho biết, sau kháng sinh, enzyme là sản phẩm quan trọng nhất của *Streptomyces* [16]. Do đó, *Streptomyces* không chỉ được dùng để sản xuất kháng sinh có giá trị cao mà cũng là nguồn sản xuất các enzyme quan trọng trong công nghiệp như amylase, cellulase, gelatinase, caseinase, chitinase và lipase [17-20]. Những enzyme này có thể được áp dụng chung trong công nghệ sinh học và đặc biệt là trong lĩnh vực dinh dưỡng và y sinh [21]. Trong những năm gần đây, xạ khuẩn có nguồn gốc từ biển đã được nghiên cứu để sản xuất các enzyme phân giải polysaccharit của tảo biển như alginate lyase và fucoidanase. Trong đó, alginate lyase tách chiết từ các chủng vi sinh vật biển đã được phát triển để khám phá các cấu trúc polyme mới của alginate cho các ứng dụng khác nhau trong lĩnh vực nông nghiệp, công nghiệp và y tế [22].

Trong nghiên cứu này, các chủng xạ khuẩn biển phân lập từ rong nâu để khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme alginate lyase bằng phương pháp đĩa thạch có chứa 0,5% alginate. Ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình lên men sinh tổng hợp alginate lyase như nguồn carbon, nồng độ muối, thời gian nuôi cấy cũng được nghiên cứu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Rong nâu được thu gom tại khu vực xã Ninh Phước, Ninh Hòa (n=5) và bãi biển Hòn Chồng, Nha Trang (n=5). Rong được lưu giữ trong túi plastic ở 27°C tại phòng thí nghiệm Vi sinh, Trường Đại học Nha Trang trong vòng 7-14 ngày trước khi tiến hành các bước phân lập.

Ngoài ra, rong mơ (*Sargassum* sp.) sau khi thu gom được rửa bằng nước để loại bỏ những chất bẩn như cát, sau đó đem sấy khô ở 40°C. Rong khô được nghiền nhỏ đến kích thước 35-60 mesh (0,25 – 0,5 mm) để sử dụng làm cơ chất cung cấp nguồn carbon cho quá trình nuôi cấy xạ khuẩn sinh enzyme alginate lyase.

2. Phân lập xạ khuẩn từ rong nâu

Các mẫu rong được tiệt trùng bề mặt bằng cách ngâm mẫu vào cồn 70% trong 1 phút, sau đó tiếp tục khử trùng mẫu bằng nước javel thương phẩm với tỷ lệ 1:5 (v/v) trong 5 phút,

cuối cùng là rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần cho sạch hoàn toàn chất khử trùng. Mẫu rong được cắt nhỏ, cân 1g cho vào ống effendoft, nghiền nát mẫu và cho vào 0,9 ml nước muối sinh lý, sau đó pha loãng mẫu đến 10^{-3} và cấy trang trên môi trường chọn lọc dành riêng cho xạ khuẩn. Môi trường phân lập xạ khuẩn được sử dụng là Humic acid vitamin B agar (HVA), glycerol asparagine agar (GAA), Starch Yeast Peptone Agar (SYP), và Starch Casein Agar (SCA). Các đĩa cấy sẽ được ủ ở 30°C trong 4 tuần để quan sát sự hình thành khuẩn lạc, sau đó cấy chuyển khuẩn lạc sang môi trường Half potato destro agar (HPDA) để quan sát hình thái, màu sắc. Các chủng xạ khuẩn phân lập được sẽ được lưu trữ trong glycerol 25% ở -18°C.

3. Khảo sát khả năng sinh enzyme alginate lyase của chủng xạ khuẩn phân lập được

Các chủng xạ khuẩn được sàng lọc về khả năng sinh alginate lyase bằng phương pháp đĩa thạch có chứa 0,5% alginate (HiMedia, Ấn Độ) với thuốc thử iốt 1% [23]. Các chủng xạ khuẩn được cấy thành 1 vòng tròn nhỏ lên đĩa thạch chứa 0,5% alginate, đem ủ ở 30°C trong 24 giờ, sau đó cho 5ml thuốc thử iốt 1% vào đĩa thạch và quan sát sự hình thành vòng tròn phân giải. Lựa chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp alginate lyase có hoạt tính cao dựa vào đường kính vòng tròn phân giải alginate tạo thành trên đĩa thạch (>15mm).

4. Thu hồi chế phẩm enzyme alginate lyase

Chủng xạ khuẩn có đường kính vòng tròn phân giải alginate cao nhất được lựa chọn cấy vào 50 ml môi trường ISP2 (4 g/L Yeast extract, 10 g/L Malt extract, 4 g/L glucose) trong bình tam giác 250 ml và được nuôi ở 30°C trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 3 ngày. Sau đó, 5 ml dịch nuôi cấy được chuyển vào 100 ml môi trường sinh tổng hợp alginate lyase có sử dụng rong nâu làm cơ chất gồm có các thành phần: 2% bột rong mơ *Sargassum* sp., 5 g/L peptone, 1 g/L yeast extract, 1 g/L glucose, 10 g/L NaCl, 2 g/L K_2HPO_4, 0.2 g/L $MgSO_4.7H_2O$ và 5 g/L NH_4Cl. Môi trường được hấp thanh trùng ở 121°C trong vòng 15 phút. Xạ khuẩn được nuôi ở nhiệt độ 30°C trên máy lắc với tốc độ 150 rpm/phút trong vòng 7-10 ngày.

Dịch enzyme thô được thu bằng cách ly tâm lạnh dung dịch nuôi cấy sau 7 ngày với tốc độ 8.000 vòng/phút trong 20 phút và thu dịch nổi. Dịch enzyme thô được kết tủa phân đoạn bằng muối $(NH_4)_2SO_4$ ở nồng độ 60%. Chế phẩm enzyme được thu hồi bằng ly tâm lạnh với tốc độ 8.000 vòng/phút trong 20 phút và phần tủa được hoà tan bằng dung dịch đệm 20 mM Tris HCL. Sau đó enzyme được tinh sạch bằng phương pháp thẩm tích (dialysis), dùng màng cellulose để loại muối. Chế phẩm enzyme này được phân tích hoạt độ enzyme bằng phương pháp DNS và hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford.

5. Xác định hoạt độ enzyme bằng phương pháp DNS

Hoạt độ alginate lyase được xác định bằng cách ủ 0,5 ml chế phẩm enzyme với 0,5 ml dung dịch sodium alginate 0,5% (dung dịch được pha trong đệm 20 mM Tris HCl, pH 8.0). Hỗn hợp enzyme và alginate được ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sau đó bổ sung 1 ml DNS và đun sôi ở 100°C trong 5 phút để dừng phản ứng. Lượng đường được giải phóng ra được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm [24]. Một đơn vị hoạt độ alginate lyase (U/ml) được tính bằng lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 µmol đường khử trong một phút ở điều kiện thí nghiệm.

6. Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford

Hàm lượng protein được xác định bằng cách cho vào ống nghiệm 0,5 ml chế phẩm enzyme và 2ml dung dịch thuốc thử Bradford, lắc đều và để yên trong vòng 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, mẫu được đo độ hấp thụ ánh sáng bằng máy đo quang phổ UV-VIS ở bước sóng 595 nm. Từ kết quả đo OD của mẫu thí nghiệm, so sánh với đồ thị đường chuẩn BSA để tính ra hàm lượng protein.

7. Đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy xạ khuẩn sinh tổng hợp alginate lyase

7.1 Ảnh hưởng của nguồn carbon

Rong mơ được sử dụng làm nguồn carbon cho quá trình lên men thu alginate lyase. Rong mơ sau khi sấy khô được nghiền nhỏ đến kích thước 35-60 mesh (0,25 – 0,5 mm), thử nghiệm với các tỷ lệ rong mơ khác nhau cho vào môi trường nuôi cấy xạ khuẩn sinh alginatae lyase bao gồm 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, và 3% (w/v). Mẫu được tiến hành nuôi cấy ở 30°C trên máy lắc với tốc độ 150 rpm/phút trong 7 ngày. Xác định hoạt tính của dịch enzyme thu được bằng phương pháp DNS để lựa chọn tỷ lệ thích hợp của bột rong mơ. Tỷ lệ bột rong mơ tối ưu tương ứng với tỷ lệ mà ở đó hoạt độ tương đối của enzyme là 100%.

7.2 Ảnh hưởng của nồng độ muối

Chủng xạ khuẩn lựa chọn được cấy vào 50 ml môi trường ISP2 trong bình tam giác 250 ml và được nuôi ở 27°C trên máy lắc với tốc độ 150 rpm/phút trong 3 ngày. Sau đó, 5 ml dịch nuôi cấy được chuyển vào 100 ml môi trường sinh tổng hợp alginate lyase có sử dụng rong mơ làm cơ chất với tỷ lệ thích hợp đã xác định ở mục 7.1, bổ sung muối với hàm lượng 1%, 2%, 3%, 4% và 5%; mẫu được ở 27°C trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong vòng 7 ngày. Xác định hoạt tính của dịch enzyme thu được bằng phương pháp DNS để lựa chọn tỷ lệ muối thích hợp. Nồng độ muối tối ưu tương ứng với nồng độ mà ở đó hoạt độ hoạt độ tương đối của enzyme là 100%.

7.3 Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Chủng xạ khuẩn lựa chọn được cấy vào 50 ml môi trường ISP2 trong bình tam giác 250 ml và được nuôi ở 27°C trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 3 ngày. Sau đó, 5 ml dịch nuôi cấy được chuyển vào 100 ml môi trường sinh tổng hợp alginate lyase có sử dụng rong nâu làm cơ chất và bổ sung muối với tỷ lệ thích hợp đã xác định ở Mục 7.1 và 7.2, mẫu được ủ ở 27°C trên máy lắc với tốc độ 150 rpm/phút trong vòng 10 ngày. Mẫu được lấy mỗi ngày để kiểm tra hoạt tính của enzyme bằng phương pháp DNS để xác định thời điểm sản xuất enzyme tối đa của xạ khuẩn. Thời gian tối ưu là thời gian tương ứng mà ở đó hoạt độ hoạt độ tương đối của enzyme là 100%.

8. Định danh xạ khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử

Các chủng xạ khuẩn lựa chọn được tách chiết DNA tổng số bằng bộ kit của QIAgen theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đoạn gen 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR (tổng thể tích 25 µl gồm 20 ng khuôn DNA, MyTaqTM HS Mix (Bioline), 0,2 pM mỗi mồi) bằng cặp mồi 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) và 1492R (5′- GGTTACCTTGTTACGACTT) [25] trên máy luân nhiệt Thermal cycler (BioRad) theo chương trình nhiệt như sau: biến tính ban đầu tại 94 C trong 3 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ của 94°C trong 40 giây, 47°C trong 40 giây, 72°C trong 90 giây và giai đoạn cuối ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được quan sát khi điện di trên gel agarose 1,5% nhuộm ethidium bromide. Sản phẩm PCR đúng kích thước sẽ được tinh sạch và gửi đi giải trình tự ở công ty TNHH DV&TM Nam Khoa. Kết quả trình tự nucleotide được so sánh với cơ sở dữ liệu ngân hàng gen bằng cách sử dụng công cụ BLAST trên NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm GENEIOUS 4.8.5.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập các chủng xạ khuẩn từ rong nâu

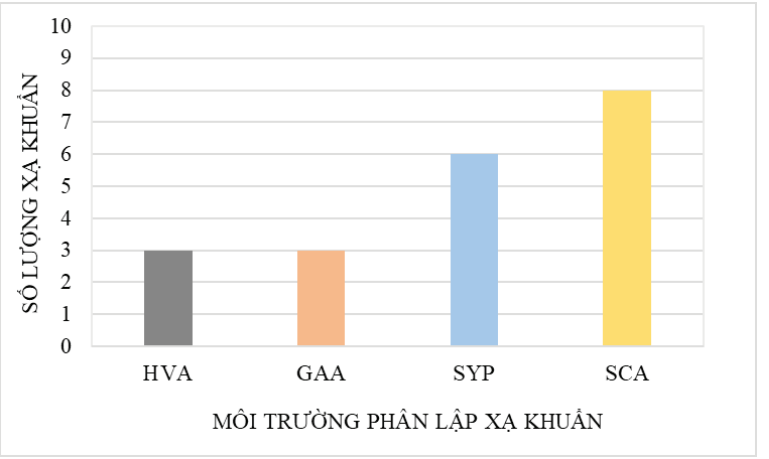
Từ các mẫu rong nâu khác nhau, 20 chủng xạ khuẩn được phân lập trên 4 loại môi trường khác nhau gồm HVA, GAA, SYP và SCA, trong đó có nhiều nhất là 8 chủng xạ khuẩn được phân lập trên môi trường SCA, 5 chủng trên SYP và hai môi trường HVA và GAA đều phân lập được 3 chủng xạ khuẩn (Hình 3). Các chủng xạ khuẩn này khi được làm thuần trên môi trường HPDA, chúng thể hiện đặc điểm hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau như màu trắng, xám, vàng, đỏ (Hình 1B, Hình 2). Đặc biệt, chủng S1 có dạng những vòng tròn đồng tâm cách nhau một khoảng nhất định, nguyên nhân là do chủng xạ khuẩn này sinh ra chất ức chế sinh trưởng làm cho sợi mọc yếu đi khi đi qua vùng này, qua được vùng có chất ức chế thì chúng lại sinh trưởng mạnh tạo thành vòng tiếp theo, cứ thế khuẩn lạc tạo thành có dạng những vòng tròn đồng tâm (Hình 1A).

A **B**

Hình 1: Chủng S1 được phân lập trên môi trường SCA (A) và làm thuần trên môi trường HPDA (B).

Chủng S8 **Chủng S6** **Chủng S16**

Hình 2: Một số chủng xạ khuẩn được phân lập và làm thuần trên môi trường HPDA.



Hình 3: Số lượng chủng xạ khuẩn phân lập được trên 4 loại môi trường khác nhau.

2. Sàng lọc chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp alginate lyase

Tất cả các chủng xạ khuẩn phân lập được cấy trên đĩa thạch có chứa 0,5% alginate, sau 24 giờ ủ ở 30°C, cho 5ml thuốc thử 1% iốt vào các đĩa để quan sát sự hình thành vòng tròn phân giải alginate. Kết quả cho thấy, có 17 chủng (chiếm tỷ lệ 85%) thể hiện khả năng sinh tổng hợp alginate lyase, trong đó chủng S1 có hoạt tính mạnh nhất với đường kính vòng tròn phân giải lên đến 55mm (Hình 4). Chỉ có 3 chủng được phân lập từ rong nâu không sinh enzyme alginate lyase. Như vậy có thể nói rong nâu là nguồn nguyên liệu tiềm năng để thu nhận các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp alginate lyase.

3. Đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy xạ khuẩn sinh tổng hợp alginate lyase

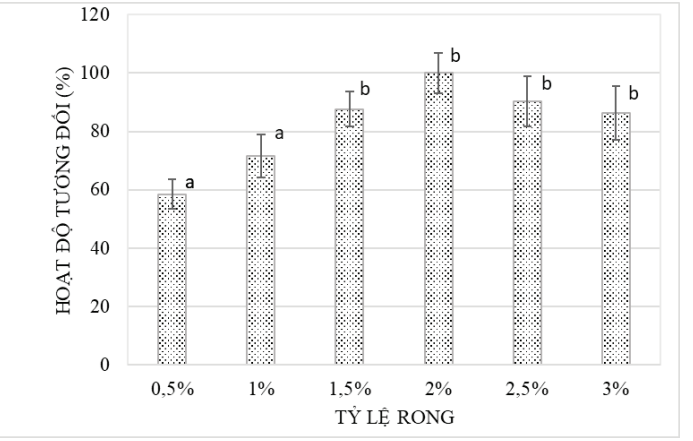
Bột rong mơ *Sargassum* sp. được sử dụng để bổ sung nguồn carbon vào môi trường nuôi cấy và là chất cảm ứng để xạ khuẩn sinh tổng

Chủng S1 **Chủng S5** **Chủng S14**

Hình 4: Sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme alginate lyase. Chủng S1 có đường kính vòng phân giải: φ55mm, chủng S5: φ 40mm, chủng S14: không phân giải alginate.

hợp alginate lyase. Kết quả thí nghiệm bổ sung các tỷ lệ rong mơ từ 0,5% đến 3% vào môi trường nuôi cấy cho thấy khi bổ sung 2% bột rong mơ vào môi trường nuôi cấy chủng S1 thì sinh enzyme alginate lyase có hoạt tính cao nhất (hoạt độ tương đối 100%) (Hình 5). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Nguyễn Thị Như Thường và cộng sự (2021) [26] với đối tượng là rong nâu Bull Kelp. Với tỷ lệ rong mơ là 2%, 2,5% và 3%, hoạt độ tương đối không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p>0,05), do đó nên sử dụng tỷ lệ 2% để tiết kiệm nguyên liệu.

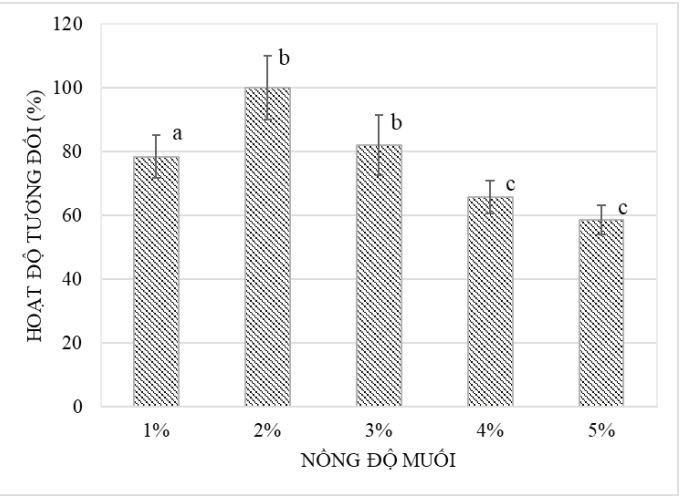
Xạ khuẩn trong nghiên cứu này có nguồn



Hình 5: Ảnh hưởng của tỷ lệ rong đến khả năng sinh tổng hợp enzyme.

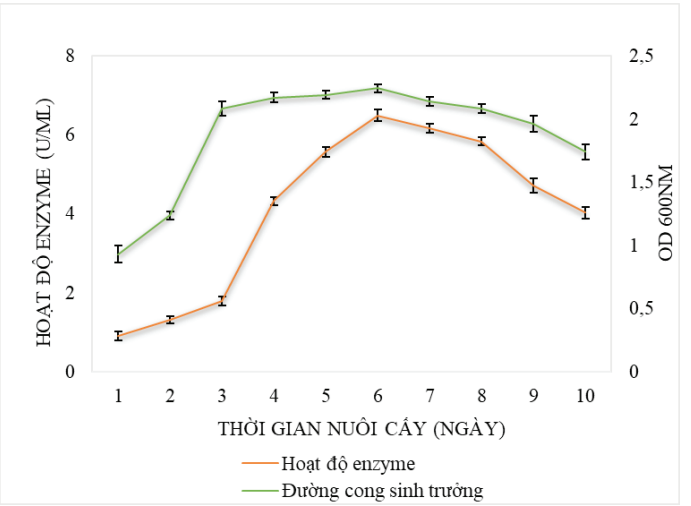
gốc từ biển, vì vậy việc bổ sung hàm lượng muối phù hợp vào môi trường nuôi cấy để cho chúng sinh trưởng tốt là cần thiết. Kết quả ở Hình 6 cho thấy, hoạt độ tương đối của alginate lyase từ chủng S1 đạt 100% khi bổ sung 2% muối NaCl, khi tăng nồng độ muối lên 3% thì hoạt độ giảm nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p>0,05), khi tăng lên đến 4% và 5% thì hoạt độ tương đối giảm mạnh xuống còn khoảng 60%. Trong một số nghiên cứu về alginate lyase từ vi khuẩn, môi trường nuôi cấy thích hợp cho *Microbulbifer* sp. ALW1 và *Vibrio furnissii* H1 từ nong nâu bị phân hủy để sinh tổng hợp enzyme là môi trường có bổ sung muối với nồng độ tương ứng lần lượt là 3% và 2,5% [27, 28]. Như vậy nồng muối thích hợp để bổ sung vào muôi trường nuôi cấy vi sinh vật biển có thể dao động trong khoảng 2% đến 3%, tùy thuộc vào từng loài vi sinh vật. Trong nghiên cứu này thì nồng độ muối 2% được lựa chọn là nồng độ thích hợp.

Để xác định thời gian tối ưu để chủng S1 sinh tổng hợp alginate lyase có hoạt tính cao nhất, mối quan hệ giữa đường cong sinh trưởng



Hình 6: Ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng sinh tổng hợp enzyme.

và hoạt độ enzyme được phân tích trong suốt quá trình nuôi cấy từ ngày 1 đến ngày 10 (Hình 7). Kết quả về đường cong sinh trưởng cho thấy chủng S1 sinh trưởng mạnh từ ngày thứ 3, pha cân bằng bắt đầu từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 7, qua ngày 8, 9, 10 thì mật độ sinh khối giảm dần. Tương ứng với sự gia tăng về mật độ sinh khối, hoạt độ enzyme tăng vọt sau 4 ngày nuôi cấy và đạt giá trị cao nhất vào ngày thứ 6 (6,5 U/ml). Sau đó hoạt độ enzyme giảm nhẹ từ ngày thứ 7, đến ngày thứ 10 thì giảm còn 4,03 U/ml. Kết luận là chủng S1 sinh alginate lyase có hoạt tính cao nhất vào ngày thứ 6 – giữa pha cân bằng trong đường cong sinh trưởng.



Hình 7: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự sinh trưởng của xạ khuẩn và khả năng sinh tổng hợp enzyme.

4. Định danh chủng xạ khuẩn tiềm năng

Để đạt được kết quả định danh đến loài, chủng xạ khuẩn S1 được ly trích DNA và thực hiện phản ứng PCR để khuyếch đại đặc hiệu trên vùng gen 16S-rRNA. Dựa vào kết quả Bảng 1 cho thấy chủng xạ khuẩn S1 có mức độ tương đồng trên 99% khi so sánh với các chủng xạ khuẩn có sẵn trên ngân hàng gen dựa vào trình tự gen vùng 16S rRNA. Cụ thể là chủng S1 có mức độ tương đồng 99,85% với loài *Streptomyces sampsonii*. Tương tự như kết quả BLAST trên NCBI, kết quả khi phân tích cây phát sinh loài của chủng xạ khuẩn cũng cho thấy chủng S1 gần

với xạ khuẩn *Streptomyces sampsonii* và không có tương đồng với loài vi khuẩn gây bệnh *Escherichia coli* (Hình 8). Xạ khuẩn *Streptomyces sampsonii* đã được chứng minh là loài có khả năng tạo ra loại kháng sinh có hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn [29].

Bảng 1: Mức độ tương đồng trình tự gene của chủng xạ khuẩn S1 với trình tự gene của các chủng xạ khuẩn có sẵn trên ngân hàng gene dựa vào trình tự gen vùng 16S-rRNA.

Chủng xạ khuẩn	Xác định loài trên ngân hàng gen	Mã số	Độ tương đồng (%)
S1	Streptomyces sampsonii	MN422300.1	99,85%

Hình 8: Cây phát sinh loài của chủng xạ khuẩn S1 với các loài xạ khuẩn có quan hệ họ hàng gần dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA.

IV. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 20 chủng xạ khuẩn từ rong nâu, trong đó có 85% chủng có khả năng sinh tổng hợp alginate lyase. Chủng S1 được chứng minh là sinh enzyme alginate lyase có hoạt tính cao nhất với đường kính vòng tròn phân giải alginate đến 55mm. Để chủng S1 sinh enzyme có hoạt tính cao nhất thì trong môi trường nuôi cấy cần bổ sung bột rong mơ 2% và muối NaCl 2%, và quá trình lên men được thực hiện ở bể lắc ổn nhiệt 30^{o}C, với tốc độ 150 rpm/phút trong 6 ngày. Phân tích trình tự 16S rRNA xác định chủng S1 là chủng *Streptomyces sampsonii* với độ tương đồng là 99,85% khi so sánh với trình tự gen 16S rRNA của các loài xạ khuẩn có sẵn trên Genbank. Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa trong việc tìm ra loài xạ khuẩn từ rong biển có khả năng sinh enzyme alginate lyase có hoạt tính tốt, ứng dụng để thủy phân alginate tạo thành các oligosaccharide được sử dụng như là chất điều hòa sinh trưởng thực vật, kích thích cho sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wong, T., L. Preston, and N. Schiller, *Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications.* Annual Review of Microbiology, 2000. 54: p. 289-340.
2. Haug, A., B. Larsen, and O. Smidsrod, *Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid.* Acta Chem Scand, 1967. 21: p. 691-704.
3. Andriamanantoanina, H. and M. Rinaudo, *Characterization of the alginates from five madagascan brown algae.* Carbohydrate Polymers, 2010. 82(3): p. 555-560.
4. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: Properties and biomedical applications.* Progress in Polymer Science, 2012. 37(1): p. 106-126.
5. Rioux, L.E., S.L. Turgeon, and M. Beaulieu, *Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds.* Carbohydrate Polymers, 2007. 69(3): p. 530-537.
6. Holdt, S. and S. Kraan, *Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation.* Journal of Applied Phycology, 2011. 23(3): p. 543-597.
7. Rahman, M.M., et al., *Isolation and characterization of two alginate lyase isozymes, AkAly28 and AkAly33, from the common sea hare Aplysia kurodai.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2010. 157(4): p. 317-25.
8. Zhu, B. and H. Yin, *Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications.* Bioengineered, 2015. 6(3): p. 125-31.
9. Kim, H.T., et al., *Characterization of a recombinant endo-type alginate lyase (Alg7D) from Saccharophagus degradans.* Biotechnology Letters, 2012. 34(6): p. 1087-1092.
10. Park, H.H., et al., *Cloning and characterization of a novel oligoalginate lyase from a newly isolated bacterium Sphingomonas sp. MJ-3.* Mar Biotechnol (NY), 2012. 14(2): p. 189-202.
11. Ochiai, A., et al., *Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from Agrobacterium tumefaciens.* J Biol Chem, 2010. 285(32): p. 24519-28.
12. Kim, E.J., et al., *Microbacterium oxydans, a novel alginate- and laminarin-degrading bacterium for the reutilization of brown-seaweed waste.* Journal of Environmental Management, 2013. 130(0): p. 153-159.
13. Schaumann, K. and G. Weide, *Enzymatic degradation of alginate by marine fungi*, in *Thirteenth*

International Seaweed Symposium, S. Lindstrom and P. Gabrielson, Editors. 1990, Springer Netherlands. p. 589-596.

14. Kim, H.S., *Characterization of Recombinant PolyG-Specific Lyase from a Marine Bacterium, Streptomyces sp. M3.* Journal of Life Science, 2010. - 20(11): p. 1582-1588.
15. Kim, D.E., E.Y. Lee, and H.S. Kim, *Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium Streptomyces sp. ALG-5.* Mar Biotechnol (NY), 2009. 11(1): p. 10-6.
16. Dhanasekaran, D., N. Thajuddin, and A. Panneerselvam, *Applications of actinobacterial fungicides in agriculture and medicine*, in *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. 2012, IntechOpen.
17. Gulve, R. and A. Deshmukh, *Antimicrobial activity of the marine actinomycetes.* International Multidisciplinary Research Journal, 2012. 2(3).
18. Bredholt, H., et al., *Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: diversity and biological activity.* Marine drugs, 2008. 6(1): p. 12-24.
19. Ramesh, S. and N. Mathivanan, *Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009. 25(12): p. 2103-2111.
20. Kumar, V., et al., *Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes.* Braz J Microbiol, 2012. 43(1): p. 205-14.
21. Nawani, N., et al., *Actinomycetes: role in biotechnology and medicine.* BioMed research international, 2013. 2013: p. 687190-687190.
22. Zhang, C. and S. Kim, *Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects.* Marine drugs, 2010. 8(6): p. 1920-1934.
23. Sawant, S.S., B.K. Salunke, and B.S. Kim, *A rapid, sensitive, simple plate assay for detection of microbial alginate lyase activity.* Enzyme Microb Technol, 2015. 77: p. 8-13.
24. Miller, G.L., *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.* Analytical Chemistry, 1959. 31(3): p. 426-428.
25. Frank, J.A., et al., *Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes.* Applied and environmental microbiology, 2008. 74(8): p. 2461-2470.
26. Nguyen, T.N.T., et al., *Purification and Characterization of a Novel Alginate Lyase from a Marine Streptomyces Species Isolated from Seaweed.* Marine Drugs, 2021. 19(11): p. 590.
27. Zhu, Z., et al., *Research progress of alginate lyases on function and application.* IOP conference series., 2018. 199(5): p. 052016.
28. Zhu, Y., et al., *Characterization of an extracellular biofunctional alginate lyase from marine Microbulbifer sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates.* Microbiological Research, 2016. 182: p. 49-58.
29. Radhakrishnan, S. and M. Varadharajan, *Isolation, Identification, and screening of polyene antifungal compound producing Streptomyces sampsonii MDCE7 from Agroforestry Soil.* Methods in Actinobacteriology, 2022: p. 379-389.