

TINH SẠCH PROTEIN CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM TỪ CHỦNG *BACILLUS SUBTILIS* XL62

Đỗ Thị Tuyên, Lê Đình Quyền, Quyền Đình Thi, Nguyễn Ngọc Dũng

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Bacillus subtilis là vi khuẩn sinh tổng hợp nhiều peptide kháng nấm như iturin và bacillomycin. Chúng có cấu trúc peptidolipid mạch vòng và có hoạt tính kháng nấm, tan huyết. Chủng XL62 đã được phân lập từ mẫu đất và xác định chính xác loài *B. subtilis* dựa trên hình thái và phân tích trình tự 16S rDNA trong một nghiên cứu trước. Protein có hoạt tính kháng nấm được tinh sạch từ dịch nuôi cấy của chủng *B. subtilis* XL62 qua 3 bước gồm rửa muối ammonium sulfate, cột sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose và cột sắc ký lọc gel Biogel P100. Các phân đoạn tinh sạch có hoạt tính kháng nấm tương đối mạnh và có khối lượng phân tử khoảng 21 kDa trên điện di đồ SDS-PAGE. Protein kháng nấm này có hoạt tính ức chế mạnh sự sinh trưởng và phát triển của nấm *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani*. Protein tinh sạch từ chủng *B. subtilis* XL62 có hoạt tính kháng nấm mạnh đối với chủng nấm *F. oxysporum*. Hoạt tính kháng nấm vẫn còn duy trì khi ủ ở 80°C, thậm chí là 100°C trong 15 phút.

Từ khóa: *Bacillus subtilis* XL62, *Fusarium oxysporum*, protein có hoạt tính kháng nấm, *Rhizoctonia solani*, tinh sạch

MỞ ĐẦU

Các protein và peptide có hoạt tính kháng nấm đều được tách chiết phần lớn từ động vật (Iijima *et al.*, 1993; Wang, Ng, 2002), thực vật (Benhamou *et al.*, 1993; Joshi *et al.*, 1998; Lam *et al.*, 2000), vi khuẩn (Delcambe *et al.*, 1977; Kim, Chung 2004; Moyne *et al.*, 2004) và nấm (Lam, Ng, 2001; Wang, Ng, 2004; Theis *et al.*, 2005). Chất đối kháng sinh trưởng nấm (antifungal compounds, AFC) là những chất có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm gây bệnh ở cây trồng. Các hoạt chất kháng nấm này đều có bản chất là các hoạt chất thứ cấp, protein và peptide. Dựa trên cấu trúc hoặc chức năng, các protein và peptide có hoạt tính kháng nấm được phân loại thành nhiều lớp khác nhau, chẳng hạn như chitinase và chitinase-like protein (Benhamou *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 2000), ribonuclease (Liu *et al.*, 2007), chất ức chế protease (Joshi *et al.*, 1998).

Gần đây, một số chủng *Bacillus subtilis* đã được ứng dụng để kiểm soát bệnh cây trồng (Hwang, Chakravarty, 1992; Asaka, Shoda, 1996; Wulff *et al.*, 2002; Okigbo 2005), do vi khuẩn này phổ biến trong đất, chịu được nhiệt độ cao, sinh trưởng nhanh trong môi trường lỏng và sinh bào tử. Ngoài ra, *B. subtilis* thường tổng hợp các loại peptide kháng sinh nhỏ (khối lượng phân tử < 2.000 Da) không phải từ ribosome có hoạt tính kháng nấm, chẳng hạn như iturin (Delcambe *et al.*, 1977; Stein 2005), surfactin

(Peypoux *et al.*, 1999; Carrillo *et al.*, 2003), fengymycin, bacilysin (Loeffler *et al.*, 1986), bacillomycin (Peypoux *et al.*, 1980), mycosubtilin (Peypoux *et al.*, 1986) và mycobacillin (Majumdar, Bose, 1960; Sengupta *et al.*, 1971). *B. subtilis* hầu như cũng sinh tổng hợp ra rất nhiều loại protein (Moyne *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). Tuy nhiên, một số ít trong tổng số các loại protein trên đã được công bố là có hoạt tính kháng nấm.

Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã phân lập và nghiên cứu hoạt tính kháng nấm của dịch chiết ngoại bào từ *B. subtilis* XL62, ức chế mạnh các nấm bệnh như *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani* trên môi trường bột đậu tương và thu được các điều kiện lên men tối ưu để sinh tổng hợp protein có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng và phát triển của hai loại nấm này (Đỗ Thị Tuyên *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tách chiết, tinh sạch protein có khả năng kháng nấm *F. oxysporum* và *R. solani* từ *B. subtilis* XL62.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng *B. subtilis* XL62 đã được xác định loài bằng phân tích trình tự 16S rRNA, chủng nấm *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani* được

phân lập từ các mẫu đất do Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường PDA dùng để thử hoạt tính kháng nấm: 20 g dịch chiết khoai tây, 0,2 g glucose, 0,2 g agar. Môi trường NYD (g/l): 8 g cao thịt, 5 g cao nấm men, 10 g D-glucose.

Hóa chất

Sodium chloride, D-glucose từ Merck (Đức), màng lọc Minisart (Biotech), agar (Việt Nam), DEAE-cellulose, Biogel P100, Trisbase, NaHPO_4 , Na_2HPO_4 . Các hóa chất thí nghiệm khác đều ở dạng tinh khiết. Một số nguyên liệu dùng thay thế nguồn carbon và nitơ như tinh bột khoai tây, bột đậu tương được mua ở ngoài thị trường.

Thu nhận dịch lọc tế bào

Dịch lên men của chủng *B. subtilis* XL62 sau 5 ngày nuôi cấy ở 30°C được ly tâm 15 phút với 12.500 rpm. Thu dịch nổi rồi lọc vô trùng qua màng lọc có kích thước lỗ 22 μm .

Xác định hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn

Bào tử nấm *F. oxysporum* và *R. solani* (1×10^4 bào tử/ml) được hòa tan vào 1 ml dung dịch 0,2% Triton X-100 và trải đều 100 μl vào đĩa petri chứa môi trường PDA. Đục các lỗ thạch đường kính 10 mm, bổ sung 100 μl dịch lọc tế bào của chủng *B. subtilis* XL62, giữ ở 4°C sau 2 - 3 h rồi nuôi trong tủ ẩm 30°C. Sau 2 - 3 ngày nuôi cấy, quan sát vòng ức chế sinh trưởng nấm mốc.

Đối với dịch protein tinh sạch, đĩa PDA được bổ sung 0,1% ampicillin, đặt các khoanh giấy lọc thấm 15 μl dịch protein tinh sạch ở các phân đoạn khác nhau, từ 3 - 5 ngày ở 30°C.

Tủa ammonium sulfate và thẩm tích

Dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* XL62 trong môi trường NYD sau 5 ngày ở 30°C được ly tâm 15 phút với 12.500 rpm ở 4°C. Dịch nổi được tủa lần 1 với 30% (w/v) ammonium sulfate. Sau ly tâm, dịch nổi được tủa lần 2 với 70% (w/v) ammonium sulfate, khuấy 1 giờ ở 30°C và để qua đêm ở 4°C. Dịch tủa được ly tâm 20 phút với 12000 rpm. Tủa được hòa vào 4 ml đệm 20 mM phosphate pH 6,8. Dịch protein được thẩm tích, ly tâm với tốc độ 12.500 rpm trong 15 phút ở 4°C và loại bỏ phần kết tủa.

Sắc ký trao đổi ion trên cột DEAE-cellulose

Dựa trên cơ sở của phản ứng trao đổi anion giữa protein trong hỗn hợp và các nhóm ion dimethylaminoethyl tích điện dương của chất mang trên cột DEAE-cellulose (dimethylaminoethyl-cellulose), khi hỗn hợp protein qua cột các protein tích điện âm gắn vào cột và sau đó được đẩy khỏi cột bằng dung dịch muối chứa ion có ái lực mạnh hơn đối với nhóm trao đổi ion của chất mang trên cột.

Ba ml dung dịch protein sau khi thẩm tích được đưa lên cột DEAE-cellulose (2,6 x 60 cm) đã cân bằng với đệm 20 mM phosphate pH 6,8. Protein trên cột được đẩy ra bằng đệm 20 mM phosphate pH 6,8 chứa 1 M NaCl với tốc độ dòng chảy 25 ml/h (Hình 1). Thu thể tích mỗi phân đoạn 1,5 ml. Sau khi phân đoạn trên cột, 3 đỉnh có nồng độ protein cao ở phân đoạn 7 (đỉnh 1), phân đoạn 17 (đỉnh 2) và phân đoạn 22 (đỉnh 3) được thu lại. Các phân đoạn có hoạt tính kháng nấm mạnh tiếp tục được đưa lên cột Biogel P100.

Sắc ký lọc gel Biogel P100

Là cột phân tách hỗn hợp protein theo nguyên tắc lọc gel, Biogel P100 là một polyacrylamide trong đó phân tử của chúng liên kết với nhau bởi các liên kết ngang tạo thành sàng phân tử bởi hệ thống lỗ lưới xếp. Dựa vào sự khác nhau về kích thước và phân tử lượng của các protein có trong hỗn hợp để phân tách.

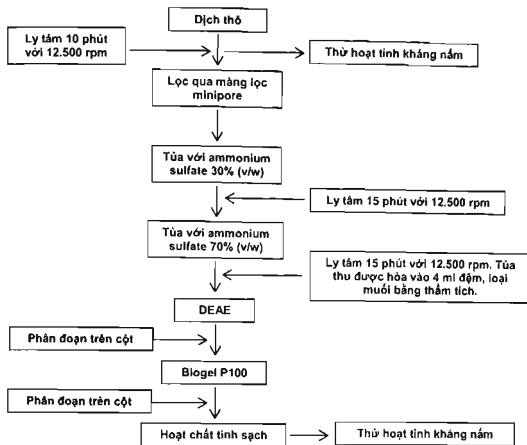
Các phân đoạn protein (thể tích 6 ml) sau khi qua cột DEAE-cellulose có hoạt tính kháng nấm cao, được đưa lên cột sắc ký lọc gel Biogel P100 (2,6 x 60 cm) đã cân bằng với đệm 20 mM phosphate pH 6,8. Protein được đẩy ra bằng đệm 20 mM phosphate pH 6,8 với tốc độ dòng chảy 25 ml/h. Thu 10 phân đoạn thể tích mỗi phân đoạn 1,5 ml. Dịch protein tinh sạch được dùng để đánh giá hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* và *R. solani*.

Điện di SDS-PAGE

Khối lượng phân tử tương đối và độ sạch của protein tinh sạch được đánh giá bằng điện di trên gel polyacrylamide (Laemmli 1970).

Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định theo Bradford (1976).



nh 1. Quy trình tinh sạch protein có hoạt tính kháng nấm

ẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

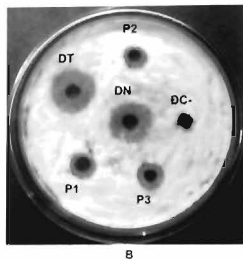
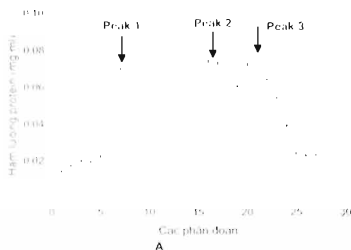
Sau khi xác định hoạt tính kháng nấm của dịch chiết cây chùng *B. subtilis* XL62 trong môi trường YD sau 5 ngày ở 30°C và dịch protein thô thu được sau khi tủa với muối ammonium sulfate nồng độ 70% (w/v) đã chứng tỏ dịch protein có hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* rất hiệu quả (Hình 2B). Điều này cho thấy dịch protein có hoạt tính kháng nấm và phát triển của nấm trong vòng đường kính khoảng từ 20 - 30 mm (Hình 2B).

Protein được phân tách thành 3 đỉnh rõ ràng trên sắc ký đồ trao đổi ion DEAE-cellulose (Hình 2A). Phân đoạn này được thử hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum*, kết quả cho thấy dịch protein tinh sạch bộ đã có hoạt tính kháng nấm với vòng ức chế sự phát triển và phát triển của nấm trong vòng đường kính khoảng từ 5 - 10 mm (Hình 2B).

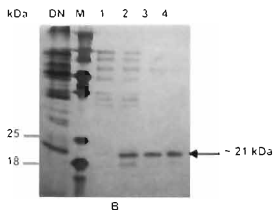
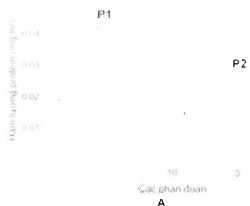
Trong bài báo này chúng tôi đi sâu vào nghiên cứu và tinh sạch các protein có hoạt tính kháng nấm

từ đỉnh 1 (peak 1). Còn các protein có hoạt tính kháng nấm từ đỉnh 2 và đỉnh 3 sẽ được công bố ở các báo cáo tiếp theo.

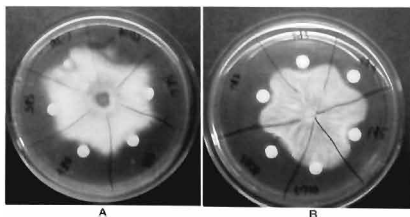
Các phân đoạn 5 đến 11 xung quanh protein thu được từ đỉnh 1 được trộn lại và đưa lên cột Biogel P100. Sau sắc ký Biogel P100, thu được 2 đỉnh chính (P1) và đỉnh phụ (P2) (Hình 3A). Độ sạch và khối lượng phân tử của các phân đoạn được đánh giá sơ bộ trên gel điện di 12,5% polyacrylamide nhuộm bạc sử dụng thang protein chuẩn (Fermentas). Protein thu được khá sạch ở phân đoạn có băng ~21 kDa (Hình 3B). Khối lượng phân tử của protein kháng nấm này khác so với một số protein kháng nấm được tinh sạch từ *B. subtilis* như bacisubin (41,9 kDa) (Liu *et al.*, 2007), YxjF (12,23 kDa), endo-1-4-β-glucanase (46,60 kDa), YnfF (45,39 kDa), BamD (44,94 kDa), putative sensor kinase (53,38 kDa), bacillomycin D synthetase C (309,04 kDa) (NCBI search) và X98III (59,0 kDa) (Xie *et al.*, 1998).



Hình 2 Sắc ký đồ các phân đoạn qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose (A). (B) Hoạt tính kháng *F. oxysporum* của các phân đoạn protein sau khi qua cột DEAE-cellulose (DC- đối chứng âm - dịch môi trường NYD. DN dịch nổi sau ly tâm; DT dịch thu). P1, P2 và P3: các phân đoạn ở đỉnh 1, 2 và 3)



Hình 3 Sắc ký đồ (A) và điện di đồ (B) các phân đoạn tinh sạch qua cột Biogel P100 (DN: dịch protein thô; 1—4: các phân đoạn 1—4 qua cột Biogel P100)



Hình 4. Hoạt tính kháng nấm của protein được tách ra từ *B. subtilis* XL62 trên hai chủng nấm *F. oxysporum* (A) và *R. solani* (B). (DC-) đệm 20 mM phosphate pH 6,8, (DC+) dịch nổi từ chủng *B. subtilis* XL62; fd 2, fd 3, fd4, fd5: dịch protein tinh sạch sau khi qua cột Biogel P100

Các phương pháp tách chiết protein có hoạt tính kháng nấm từ *B. subtilis* XL62 đều giống như các phương pháp tách chiết protein kháng nấm khác đã công bố (Wang and Ng 2002; Wang and Ng 2004; Ngai *et al.*, 2005). Các phương pháp sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose và sắc ký lọc gel Biogel P100 đều được sử dụng để tách chiết các protein có hoạt tính kháng nấm trong các nghiên cứu trước đây (Lam *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007).

Dịch protein sau tinh sạch trên cột Biogel P100 được xác định hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* và *R. solani* trên đĩa PDA. Dịch protein tinh sạch có hoạt tính ức chế mạnh sự sinh trưởng và phát triển của cả nấm *F. oxysporum* lẫn *R. solani* (Hình 4). Định chính (P1) được thổi ra từ cột Biogel P100 có hoạt tính kháng nấm và trên điện di SDS-PAGE có khối lượng phân tử khoảng 21 kDa (Hình 3B).

KẾT LUẬN

Protein có hoạt tính kháng nấm được tinh sạch từ dịch nuôi cấy *B. subtilis* XL62 trong môi trường NYD, sau khi qua 3 bước tinh sạch: tủa muối 30-70% ammonium sulfate, sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose và sắc ký lọc gel Biogel P100. Trên gel điện di 12,5% polyacrylamide, protein tinh sạch có khối lượng phân tử ~21 kDa. Các phân đoạn tinh sạch có hoạt tính kháng nấm tương đối mạnh. Protein kháng nấm này có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng và phát triển của nấm *F. oxysporum* và *R. solani*, đặc biệt là đối với chủng nấm *R. solani*.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ từ Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020, đề tài: Nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm BCF phòng chống bệnh cây trồng do nấm *Fusarium* sp. và *Rhizoctonia solani*, 2009 - 2011.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Asaka O, Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl Environ Microbiol* 62(11): 4081-4085.

Benhamou N, Broglie K, Broglie R, Chet I (1993) Antifungal effect of bean endochitinase on *Rhizoctonia solani*: ultrastructural changes and cytochemical aspect of chitin breakdown. *Can J Microbiol* 39(3): 318-328.

Bradford MN (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Carrillo C, Teruel JA, Aranda FJ, Ortiz A (2003) Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta* 1611(1-2): 91-97.

Delcambe L, Peypoux F, Besson F, Guinand M, Michel G (1977) Structure of iturin and iturin-like substance. *Biochem Soc Trans* 5(4):1122-1124.

Đỗ Thị Tuyên, Lê Đình Quyền, Nguyễn Ngọc Dũng, Quyền Đình Thi (2010) Nghiên cứu khả năng ức chế của chủng *Bacillus subtilis* đối với chủng nấm *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani* gây bệnh cây trồng. *Tạp chí Bảo vệ thực vật* 2(230): 3-7.

Hwang SF, Chakravarty P (1992) Potential for the integrated control of *Rhizoctonia* root-rot of *Pisum sativum* using *Bacillus subtilis* and a fungicide. *J Plant Dis* 99(6): 626-636

Iijima R, Kurata S, Naton S (1993) Purification, characterization and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J Biol Chem* 268(16): 12055-12062.

Joshi BN, Sainani MN, Bastawade KB, Gupta VS, Ranekar PK (1998) Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochem Biophys Res Commun* 246(2): 382-387.

Kim PI, Chung KC (2004) Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol Lett* 234(1): 177-183.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lam SK, Ng TB (2001) Isolation of a novel thermolabile heterodimeric ribonuclease with antifungal and antiproliferative activities from roots of the sanchi ginseng *Panax notoginseng*. *Biochem Biophys Res Commun* 285(2): 419-423.

Lam YW, Wang HX, Ng TB (2000) A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive *Allium tuberosum*. *Biochem Biophys Res Commun* 279(1): 74-80.

Liu Y, Chen Z, Ng TB, Zhang J, Zhou M, Song F, Lu F, Liu Y (2007) Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides* 28(3): 553-559.

Loeffler W, Tschen JSM, Vanitanakom N, Kulger M,

Knorrp E, Hsieh TF, Wu TG (1986) Antifungal effects of bacilysin and fengycin from *Bacillus subtilis* F29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J Phytopathol* 115(3): 204-213.

Majumdar SK, Bose SK (1960) Isolation and homogeneity of mycobacillin. *Arch Biochem Biophys* 90(1): 154-158.

Moyné AL, Cleveland TE, Tuzun S (2004) Molecular characterization and analysis of operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol Lett* 234(1): 43-49.

Ngai PHK, Zhao Z, Ng TB (2005) Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides* 26(2): 191-196.

Okigbo RN (2005) Biological control of postharvest fungal rot of yam (*Dioscorea* spp.) with *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia* 159(2): 307-314.

Peypoux F, Besson F, Michel G (1980) Characterization of a new antibiotic of iturin group bacilloycin D. *J Antibiot* 33(10): 1146-1149.

Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51(5): 553-563.

Peypoux F, Pommier MT, Marion D, Ptak M, Das BC, Michel G (1986) Revised structure of mycosubtilin, a lipodiolipid antibiotic from *B. subtilis*. *J Antibiot* 39(5):

636-641.

Sengupta S, Banerjee AB, Bose SK (1971) γ -Glutamyl and D- or L-peptide linkages in mycobacillin, a cyclic peptide antibiotic. *Biochem J* 121: 839-846.

Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56(4): 845-857.

Theis T, Marax F, Salvenmoser W, Stahl U, Meyer V (2005) New insight into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. *Res Microbiol* 156(1): 47-56.

Wang H, Ng TB (2002) Isolation of cicadin, a novel and potent antifungal peptide from juvenile cicadas. *Peptides* 23(1): 7-11.

Wang H, Ng TB (2004) Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides* 25(1): 1-5.

Wulff I-G, Mguni CM, Mortensen CN, Keswani CL, Hockenhull J (2002) Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *Eur J Plant Pathol* 108(4): 317-325.

Xie D, Peng J, Wang J, Hu J, Wang Y (1998) Purification and properties of antifungal protein X98III from *Bacillus subtilis*. *Acta Microbiol Sin* 38(1): 13-19

PURIFICATION OF AN ANTIFUNGAL PROTEIN FROM *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN XL62

Do Thi Tuyen, Le Dinh Quyen, Nguyen Ngoc Dung, Quyen Dinh Thi*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Bacillus subtilis strains produce the antifungal peptides such as iturin and bacillomycin. They have a cyclic structure of peptidolipid and potentially antifungal and hemolytic activity. The strain XL62 was isolated from a soil sample and identified as *B. subtilis* on the basis of its morphological, biochemical and physiological characteristics, and 16S rDNA analysis in a previous study. An antifungal protein was isolated from a culture of the strain *B. subtilis* XL62. The purification procedure comprised of three steps: ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography on diethylaminoethyl DEAE-cellulose and gel filtration chromatography on Biogel P100 column. The purified protein showed a molecular mass of ~21 kDa on SDS-PAGE and exhibited inhibitory activity on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. The purified antifungal protein from *B. subtilis* XL62 exhibited inhibitory activity against both *F. oxysporum* and *R. Solani*. The *F. oxysporum* strain showed the highest sensitivity to the antifungal protein. Antifungal activity was retained at temperatures up to 80°C, even at 100°C, after 15 minutes incubation

Keywords: Antifungal protein, *Bacillus subtilis* XL62, *Fusarium oxysporum*, purification, *Rhizoctonia solani*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37568260; Fax: 84-4-38363144; E-mail: quyen@ibt.ac.vn