

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN *BACILLUS* SINH LIPASE KIỀM TỪ RỪNG NGẬP MẶN

Dương Minh Lam*, Vũ Thị Lý

Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, 136 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: duong.minhnam@gmail.com

Đến Tòa soạn: 10/08/2011; Chấp nhận đăng: 04/10/2011

TÓM TẮT

Enzyme lipase đang được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến và công nghiệp dược phẩm trên toàn thế giới. Hiện nay, enzyme lipase giữ vị trí thứ 2 về lượng enzyme được sản xuất và tiêu thụ trên thị trường, sau enzyme protease. Gần đây, một số nghiên cứu về những ứng dụng mới của lipase trong công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa, công nghiệp thuộc da, thay đổi cấu trúc phân tử phục vụ ứng dụng làm mỹ phẩm đã được công bố... Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn được 8 chủng vi khuẩn có khả năng sinh lipase kiềm mạnh trong số 250 chủng vi khuẩn phân lập từ rừng ngập mặn. Cả 8 chủng biểu hiện hoạt tính mạnh tại giá trị pH 9 và môi trường 3% NaCl. Tất cả các chủng nghiên cứu đều là các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Các chủng vi khuẩn này biểu hiện những ứng dụng rất quý trong công nghiệp chế biến sử dụng môi trường mặn và kiềm. Đặc điểm và một số ứng dụng của enzyme được thảo luận chi tiết trong báo cáo.

Từ khóa: lipase kiềm, *Bacillus*, rừng ngập mặn, chất tẩy, thuộc da

1. MỞ ĐẦU

Lipases (triacyl glycerol acyl hydrolases) là những enzym có tính xúc tác rất linh hoạt và được sử dụng với nhiều mục đích khác nhau như trong chế biến thực phẩm, mỹ phẩm, chất tẩy rửa, công nghiệp thuộc da và biến đổi cấu trúc không gian của một số hợp chất hữu cơ từ dạng không hoạt động sang hoạt động [1, 2].

Lipase có ở nhiều loại thực vật, nhưng những hiểu biết về lipase thực vật vẫn còn hạn chế so với lipase từ động vật hay vi sinh vật. Lipase ở thực vật là enzym thủy phân các liên kết ester của triacylglycerol dự trữ của hạt đặc biệt là các loại hạt chứa dầu (như hạt ngô, dừa, bông, đậu phộng), triacylglycerol là nguồn năng lượng cung cấp cho quá trình nảy mầm của hạt. Các lipase thực vật đã được nghiên cứu và tinh sạch như lipases từ ngô, cải, đậu [2]. Hiện nay lipase thực vật cũng đang được ứng dụng trong chuyển đổi sinh học lipid. Lipase tuyến tụy là một trong những enzym động vật được biết đến sớm và trở thành mô hình cho những nghiên cứu về lipase ở động vật sau này. Lipase được chiết xuất từ tụy lợn đã được sử dụng từ lâu như là một enzym kỹ thuật sử dụng trong y học. Các lipase trong sữa biểu hiện hoạt tính xúc tác thủy phân glycerol chứa 1 gốc acyl (MAG). Một trong số lipase từ sữa người được nghiên cứu khá kỹ là esterase

được kích hoạt bởi muối mật. Mặc dù được nghiên cứu nhiều nhưng lipase từ động vật và thực vật không sở hữu một số đặc điểm cần thiết của quá trình công nghiệp [2, 3].

Lipase có thể thu được từ nhiều vi sinh vật khác nhau như nấm mốc, nấm men và vi khuẩn. Nhiều loài trong các chi nấm *Aspergillus*, *Candida*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* và *Yarrowia* sinh lipase mạnh, được nghiên cứu và ứng dụng ở các lĩnh vực khác nhau. Hầu hết lipase vi khuẩn có nguồn gốc từ *Bacillus* spp. [4, 5]. Một số khác từ các chi *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, và *Pseudomonas*... [6, 7].

Với sự đa dạng lớn về đặc tính, khả năng xúc tác hình thành nhiều liên kết ester khác nhau, các lipase vi sinh vật là đối tượng hấp dẫn cho những ứng dụng công nghiệp. Nỗ lực lớn đã được thực hiện để đưa các enzym hoạt động trong điều kiện pH kiềm vào trong nhiều lĩnh vực công nghiệp khác nhau, đặc biệt là công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa, công nghệ xử lý môi trường...[8]. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật sinh lipase kiềm từ môi trường đất và nước, đa số là các chủng *Bacillus* [2, 5, 6, 7, 9] trong đó, các trực khuẩn Gram dương có khả năng sinh mạnh lipase kiềm có tiềm năng được ứng dụng trong công nghiệp tẩy rửa [4, 5]. Việc tuyển chọn nguồn gen quý là rất cần thiết cho công nghệ sinh học hiện đại, tạo nguyên liệu cho việc chuyển các gen quý này vào đối tượng khác như vi khuẩn hoặc nấm nhằm làm chủ công nghệ điều khiển sản xuất enzym tái tổ hợp đạt hiệu quả cao [9].

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về lipase đã được báo cáo [9, 10]. Tuy nhiên, những nghiên cứu về lipase kiềm còn rất hạn chế. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh lipase kiềm từ các môi trường khác nhau nhằm tìm ra nguồn gen quý của Việt Nam cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng lipase kiềm trong các quy trình công nghiệp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các chủng vi sinh vật: 250 chủng vi khuẩn được phân lập từ đất rừng ngập mặn Giao Thủy, Nam Định năm 2009 và đang được lưu giữ trong bộ sưu tập Vi sinh vật rừng ngập mặn Việt Nam tại Bộ môn CNSH - Vi sinh, trường ĐHSP Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xác định khả năng sinh lipase

- *Môi trường kiểm tra khả năng sinh lipase của vi khuẩn*: Môi trường MPA (Merck) mặn (pH = 9,0) bổ sung 0,5 % dầu olive (Sigma) hoặc tributyrin (Sigma) đã được nhũ hóa: Dầu olive được nhũ hóa bởi đệm phosphat pH = 9 theo tỉ lệ 1 : 1, trộn đều với môi trường đã thanh trùng ở khoảng 50 °C rồi chia đều ra các hộp Petri.

- *Nghiên cứu khả năng phân giải lipid theo phương pháp cấy chấm điểm*: Môi trường chứa cơ chất nghiên cứu được chuẩn bị trong các hộp Petri sử dụng để xác định hoạt tính lipase của các chủng vi khuẩn nghiên cứu bằng cách cấy các chủng thuần lên môi trường thử hoạt tính và để trong tủ ấm 7 ngày. Hoạt tính lipase được xác định một cách định tính thông qua tỉ lệ giữa đường kính vòng phân giải và đường kính khuẩn lạc.

2.2.2. Phương pháp định lượng xác định hoạt tính lipase kiềm

Sử dụng phương pháp đo quang phổ hấp thụ với cơ chất là p – nitrophenyl palmitate (p-NPP) ở bước sóng OD_{410 nm} [2].

Nguyên lý: Lipase xúc tác phản ứng thủy phân cơ chất p - nitrophenol palmitat (p-NPP) tạo ra p - nitrophenol (p-NP) biểu hiện màu vàng đặc trưng trong môi trường pH kiềm. Hoạt độ của lipase được xác định bằng cách đo cường độ màu của dung dịch chứa p-NP trên máy UVIS ở bước sóng $\lambda = 410 \text{ nm}$.

Lập đồ thị chuẩn p-NP

Đồ thị chuẩn p-NP được tiến hành xây dựng dựa trên mối tương quan giữa hàm lượng p-NP và độ hấp thụ quang tại bước sóng 410 nm.

• Bước 1: Pha dung dịch p-NP 1 $\mu\text{mol/ml}$ (dung dịch A)

- Dung dịch p-NP ban đầu có nồng độ 10 mM được pha loãng 100 lần trong đệm Tris HCl (pH 9) để tạo nên dung dịch có nồng độ p-NP 1 $\mu\text{mol/ml}$.

- Dùng dung dịch p-NP 1 $\mu\text{mol/ml}$ pha loãng tiếp trong đệm Tris - HCl pH = 9,0 thành các nồng độ khác nhau: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ($\mu\text{mol/ml}$).

• Bước 2: Pha cơ chất p-NPP (0,2 mM) (dung dịch B)

- Cân 0,03 g p-NPP được hòa tan trong 5 ml dung môi bao gồm: acetonitrile–isopropanol theo tỉ lệ 1 : 4 (v/v), lắc đều cho cơ chất tan hết, ta được dung dịch C.

- Lấy dung dịch C (gồm p-NP, acetonitrile, isopropanol) pha vào dung dịch đệm Tris HCl (50 mM, pH 9) theo tỉ lệ 1 : 19 (v/v), ta được dung dịch cơ chất p-NPP (0,2 mM). Lưu ý: Chỉ cho dung dịch C vào dung dịch đệm mà không làm ngược lại để tránh tạo váng.

• Bước 3: Tiến hành phản ứng

- Phản ứng được thực hiện ở 35 °C, trong 10 phút.

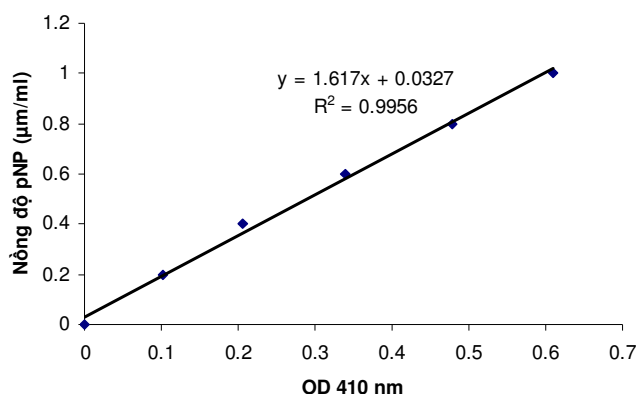
- Dùng 80 μl dung dịch A ở mỗi nồng độ trên + 800 μl dung dịch B, đun sôi 10 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng + 1520 μl H₂O khử ion, li tâm và đo OD_{410nm}.

• Bước 4: Lập đường chuẩn

Các chỉ số OD đo được của các nồng độ cơ chất khác nhau sẽ được sử dụng để xây dựng đồ thị chuẩn tương quan giữa hai giá trị này. Mức độ tin cậy của đồ thị được thể hiện qua sai số ngẫu nhiên R² như trình bày trong bảng 1 và hình 1 dưới đây.

Bảng 1. Kết quả OD 410 nm ở các nồng độ p-NP khác nhau

Nồng độ p-NP ($\mu\text{mol/ml}$)	OD _{410nm}
0	0
0,2	0,102
0,4	0,205
0,6	0,339
0,8	0,479
1,0	0,609



Hình 1. Đồ thị chuẩn về mối liên hệ giữa nồng độ p-NP và giá trị OD_{410 nm}

Từ đồ thị trên, ta có phương trình đường chuẩn $y = 1,617x + 0,0327$, với y là lượng p-nitro phenol có trong 1 ml dịch, x là giá trị OD₄₁₀ tương ứng. Hệ số tương quan $R^2 = 0,9956$ chứng tỏ mối liên hệ giữa y và x là chặt chẽ do đó có thể sử dụng phương trình trên để tính lượng p-nitro phenol giải phóng ra trong phản ứng định lượng lipase trong các thí nghiệm tiếp theo.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Tuyển chọn các chủng có khả năng sinh lipase

Để phù hợp với mục tiêu nghiên cứu, chúng tôi tiến hành tuyển chọn *Bacillus* sinh lipase trên môi trường MPA mặn bổ sung 0,5 % (v/v) dầu olive ở pH = 9,0. Gần 90 % các chủng *Bacillus* có khả năng sinh trưởng trong môi trường kiềm, tuy nhiên số chủng có khả năng phân giải lipid là không nhiều. Hình 2 thể hiện hoạt tính của một số chủng nghiên cứu trên cơ chất Tributyrin.

Nghiên cứu cho thấy, có 8 chủng có khả năng phân giải lipid chiếm 2,4 % trong tổng số 250 chủng thử nghiệm. Điều này là khá phù hợp với những công bố trước đây của nhiều tác giả trong và ngoài nước khi nghiên cứu *Bacillus* sinh lipase kiềm. Tuy nhiên, tỉ lệ này thấp hơn nhiều nếu so sánh với một số nghiên cứu công bố về khả năng sinh lipase của *Pseudomonas*. Quyền Đình Thi và cs. [10] nghiên cứu khả năng sinh lipase của 102 chủng vi khuẩn *Pseudomonas* trên cơ chất tributyrin và đã chọn được 41 chủng biểu hiện hoạt tính lipase, chiếm 40,2 % số chủng nghiên cứu. Tỉ lệ lớn các chủng có khả năng sinh lipase có thể do đặc tính gây bệnh của chi *Pseudomonas*. Nhiều chủng *Pseudomonas* gây bệnh và lipase đã được chứng minh là liên quan chặt chẽ tới khả năng gây bệnh trên động vật của vi sinh vật gây bệnh. Mặt khác, tỉ lệ sinh lipase thấp của vi khuẩn *Bacillus* trong điều kiện kiềm có thể là do môi trường rừng ngập mặn là trung tính dưới, hoặc là do sự không phong phú nguồn cơ chất trong môi trường hoặc có thể các vi khuẩn này không phải là đối tượng chính chịu trách nhiệm phân hủy cơ chất lipid.

Ghanem và cs. [11] đã phân lập được 1606 chủng *Pseudomonas* và kiểm tra hoạt tính lipase của chúng. Tuy nhiên, chỉ có 2 chủng có tiềm năng được sử dụng như những chủng sản sinh lipase kiềm là *P. nitroreducens* và *P. fragi*. Qua những nghiên cứu này chúng ta có thể thấy vi khuẩn sinh lipase kiềm chiếm tỉ lệ lớn trong các nhóm sinh vật sinh lipase nghiên cứu.

3.2. Hoạt tính lipase của 8 chủng nghiên cứu

Bảng 2. Kết quả thử hoạt tính lipase

STT	Chủng VK	D-d (mm)	IU/ml
1	BT 10	17	0.12
2	B 33	16	0.03
3	B 289	17	0.14
4	B 314	20	0.13
5	B 31	20	0.13
6	B 32	21	0.09
7	TM 65	20	0.10
8	BT 109	20	0.15

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, 4 chủng có hoạt tính khá ổn định là BT 10, B289, B314, B31 và BT 109 có hoạt tính từ 0,12 - 0,15 IU/ml sau 24 giờ nuôi cấy. So sánh với một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy, các chủng tự nhiên có khả năng biểu hiện hoạt tính lipase kiểm như vậy là khá cao. Hoạt tính lipase được biểu hiện ở nấm *Mucor griseocyanus* dao động từ 0,04 – 0,1 IU/ml sau 4 ngày nuôi cấy [1]. Chủng *Bacillus coagulans* BTS-3 có khả năng biểu hiện hoạt tính lipase cao là 1,16 IU/ml sau 48 giờ nuôi cấy [4]. Như vậy, với mức độ biểu hiện mạnh và đặc tính quý của enzyme, những nghiên cứu tiếp theo như tối ưu hóa điều kiện biểu hiện, chuyển gen biểu hiện lipase ở các chủng này là cần thiết.

3.3. Khả năng phân giải các nguồn cơ chất khác nhau

Nghiên cứu khả năng biểu hiện hoạt tính lipase trên các cơ chất khác nhau sẽ giúp cho việc định hướng ứng dụng cũng như các nghiên cứu tiếp theo dễ dàng hơn. Trong nghiên cứu này, các loại cơ chất khác nhau bao gồm: dầu olive, mỡ lợn và tributyrin được sử dụng để đánh giá khả năng sinh lipase. Do bản chất liên kết có khác biệt giữa các loại cơ chất (bảng 3) nên việc xác định hoạt tính phân giải cơ chất là cần thiết để xác định loại phản ứng xúc tác của enzyme tuyển chọn được và giúp cho quá trình định hướng nghiên cứu và ứng dụng được đúng đắn.

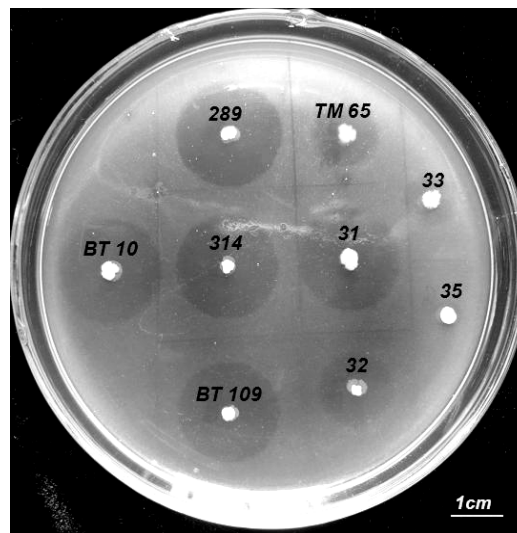
Bảng 3. Thành phần acid béo của một số lipid sử dụng trong nghiên cứu

Dầu hoặc mỡ	Tỉ lệ acid béo không no/no	Acid béo no			Không no đơn gốc	Không no đa gốc	
		Acid Myristic C14:0	Acid Palmitic C16:0	Acid Stearic C18:0	Acid Oleic C18:1	Acid Linoleic (ω6) C18:2	Acid Alpha Linolenic (ω3) C18:3
Dầu Olive	4,6	-	13	3	71	10	1
Mỡ lợn	1,2	2	26	14	44	10	-
Dầu lạc	4,0	-	11	2	48	32	-

Bảng 4. Khả năng phân giải các loại lipid khác nhau

Các loại lipid	Dầu olive	Mỡ lợn	Tributyrin
BT 10	++	+	+++
BT 109	++	++	+++
B 289	++	++	+++
B 314	++	++	+++
B 31	+	+	+++
B 32	++	++	++
TM 65	++	++	++
B 33	+	+	+

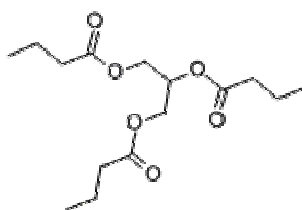
Ghi chú: “-” Không có hoạt tính; “+/-”Hoạt tính yếu; “+”Hoạt tính thể hiện rõ; “++”Hoạt tính mạnh; “+++” Hoạt tính rất mạnh



Hình 2. Khả năng sinh lipase phân giải tributyrin của một số chủng

Các loại cơ chất này khác nhau chủ yếu về các triglycerite, tuy nhiên chúng khác nhau ở số phân tử cacbon của axit béo và cấu hình không gian của phân tử. Chính sự khác nhau này quyết định lipid đó có dễ phân giải hay không. Kết quả kiểm tra hoạt tính trên cơ chất khác nhau của 8 chủng tuyển chọn được thể hiện trên bảng 4.

Kết quả nghiên cứu trên cho thấy, hầu hết các chủng chọn được có khả năng phân giải mạnh tributyrin. Điều này được giải thích như sau: các phân tử tributyrin có cấu hình không gian khá đơn giản (hình 3), phân tử của chúng bao gồm 3 chuỗi butyrate liên kết với gốc –OH của glycerol, bởi vậy lipase do vi khuẩn sinh ra dễ dàng cắt đứt liên kết ester này.



Hình 3. Cấu trúc phân tử tributyrin

Các nguồn cơ chất khác thường được tách chiết từ các sản phẩm tự nhiên và thường kém tinh khiết. Chúng chủ yếu là các lipid có mạch cacbon dài và cấu hình không gian phức tạp. Sự phức tạp này cản trở tần suất tiếp xúc giữa lipase và cơ chất của chúng, dẫn tới làm giảm hiệu quả xúc tác của enzym. Một vấn đề nữa, các lipid tách chiết từ tự nhiên thường chứa nhiều loại axit béo tự do, cản trở sự hoạt động của enzym và gây khó khăn cho việc thủy phân bởi enzym.

Tuy nhiên khả năng phân giải các lipid khó thủy phân như mỡ lợn đã khẳng định việc sử dụng lipase được sinh ra các chủng thu được từ nghiên cứu này có thể ứng dụng trong nhiều quá trình khác nhau như xử lý da trước khi thuộc, bổ sung vào sản phẩm chất tẩy rửa ... Nhưng để có thể có sản phẩm enzym, các nghiên cứu tiếp theo nhằm nâng cao hiệu suất sinh enzym, các yếu tố ảnh hưởng tới hoạt tính enzym, chuyển gen nhằm đạt hiệu suất cao và làm chủ quá trình lên men, nghiên cứu thử nghiệm enzym trong các lĩnh vực khác nhau là cần thiết ...

4. KẾT LUẬN

Phân lập được 250 chủng *Bacillus* từ rừng ngập mặn, trong đó có 8 chủng có khả năng sinh lipase kiềm, hoạt động tốt ở pH 9, nồng độ muối 3 %. Với đặc tính này, enzym lipase từ các chủng nghiên cứu hứa hẹn những ứng dụng trong một số ngành công nghiệp.

Khả năng phân giải các loại dầu khác nhau của các chủng thu được là khác nhau. Tributyrin là loại dầu được phân giải mạnh nhất, dầu nành khó phân giải nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sharma R., Chisti Y. and Banerjee U. C. - Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances* **19** (2001) 627–662.
2. Vulfson E. N. - Industrial applications of lipases. In: Woolley P, Peterson SB, editors. *Lipases-their structure, biochemistry and applications*, Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1994, pp. 271–88.
3. O'Connor C. J. and Walde P. - The Effect of Proteins on Bile-Salt-Stimulated Human Milk Lipase Activity against 4-Nitrophenylacetate, *Journal of Colloid and Interface Science* **112** (1986) 488–496.
4. Abada E. A. E. - Production and Characterization of a Mesophilic Lipase Isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1, *Pakistan Journal of Biological Sciences* **11** (2008) 1100–1106.
5. Annamalai N., Elayaraja S., Vijayalakshmi S. and Balasubramanian, T. - Thermostable, alkaline tolerant lipase from *Bacillus licheniformis* using peanut oil cake as a substrate, *African Journal of Biochemistry Research* **5** (2011) 176–181.

6. Ahmed E. H., Raghavendra T. and Madamwar D. - An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis, *Bioresource Technology* **101** (2010) 3628–3634.
7. Kanwar L. and Goswami P. - Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase, *Enzyme and Microbial Technology* **31** (2002) 727–735.
8. Guncheva M. and Zhiryakova D. - Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **68** (2011) 1–21.
9. Phùng Thu Nguyệt, Nguyễn Hồng Thanh, Jan-Christer Janson và Trương Nam Hải. – Nghiên cứu lên men lượng lớn chủng *Escherichia coli* BL21 tái tổ hợp mang gen mã hóa lipase của *Bacillus subtilis* FS2, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* **47** (2) (2009) 109-116.
10. Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Bầy, Mai Thị Thanh, Nguyễn Thị Thảo, Lê thị Thu Giang, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Ngọc Dũng. - Phân lập chủng vi khuẩn sinh tổng hợp lipase từ nước thải và khảo sát hoạt tính lipase của 102 chủng *Pseudomonas*, *Tạp chí Di truyền và Ứng dụng*, số **4** (2003).
11. Ghanem, E. H., Al-Sayed, H. A. and Saleh, K. M. - An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **16** (2000) 459-464.

ABSTRACT

STUDY ON *BACILLUS* PRODUCING ALKALINE LIPASE ISOLATED FROM MANGROVES

Dương Minh Lam*, Vũ Thị Ly

Hanoi National University of Education, 136 Xuan Thuy Str. Hanoi

*Email: duong.minhnam@gmail.com

Lipases are enzymes that have been extensively used in the processing industries and in medicine worldwide. In fact lipases take the second rank in enzyme production, after protease. Recently, there have been several new applications of lipase introduced such as industrial detergents, tanning industry, changing the chemical structure of molecules... In this study, we selected eight among 250 strains of bacteria isolated from mangroves that are capable of producing strong alkaline lipase. The lipase shows high activity at pH 9, in 3 % salt concentration solution. All eight strains were identified as *Bacillus* spp. These bacteria actually possess meaningful applications in the processing procedures that require alkaline and saline conditions in the industry. The applications and characteristics of lipase were studied and discussed in detail.

Keywords: alkaline lipase, *Bacillus*, mangroves, detergents, tanning