

KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP PYRUVATE VÀ POLY (3- HYDROXYBUTYRATE) CỦA VI KHUẨN ƯA MẶN PHÂN LẬP TỪ RỪNG NGẬP MẶN GIAO THỦY, NAM ĐỊNH

Hoàng Thị Lan Anh¹, Lưu Thị Tâm¹, Hoàng Thị Minh Hiền¹,
Nguyễn Cẩm Hà^{1,2}, Ngô Thị Hoài Thu¹, Yoshikazu Kawata³,
Ngô Thị Hoa Diệp⁴, Nguyễn Thanh Thủy⁵, Đặng Diễm Hồng^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

²Học Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, VAST, Việt Nam

³Viện Nghiên cứu sinh y, AIST, Nhật Bản

⁴Công ty CPSXTM Thiên Ân, Việt Nam

⁵Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, Việt Nam

TÓM TẮT: Axit pyruvic (pyruvate) là một axit α -oxocarboxylic quan trọng nhất, đóng vai trò trung tâm trong quá trình trao đổi năng lượng của cơ thể sống. Chúng được sử dụng rộng rãi như là vật liệu ban đầu trong quá trình sinh tổng hợp các dược chất có giá trị cũng như thuốc bảo vệ thực vật, polymer, mỹ phẩm và phụ gia thực phẩm. Bốn chủng vi khuẩn Gram âm, ưa muối ở mức trung bình và có khả năng tổng hợp pyruvate hoặc chất dẻo sinh học bioplastic- poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) đã được phân lập từ đất rừng ngập mặn huyện Giao Thủy, Nam Định. Kết quả sàng lọc sơ bộ ban đầu cho thấy chủng ND7 có khả năng tích lũy PHB và tiết pyruvate ngoại bào cao nhất so với 3 chủng còn lại tương ứng đạt 50,23% khối lượng khô và 6,87 g/L sau 60 giờ nuôi cấy. Khi nuôi cấy trong môi trường có độ kiềm cao (pH 9,4), hàm lượng pyruvate tiết vào môi trường tăng đáng kể (đạt 21,02 g/L sau 60 giờ nuôi cấy). Dựa vào các đặc điểm hình thái, hóa sinh và trình tự đoạn gen 16S rRNA, chủng ND7 được xác định thuộc về loài *Halomonas maura*. Kết quả thu được cho thấy chủng ND7 là đối tượng tiềm năng cho sản xuất pyruvate ở quy mô lớn hơn.

Từ khóa: *Halomonas*, axit hữu cơ, bioplastic, pyruvate, vi khuẩn ưa mặn.

MỞ ĐẦU

Pyruvate là một hợp chất trung gian quan trọng trong quá trình trao đổi carbon và năng lượng của tất cả các cơ thể sống. Đây là nguồn nguyên liệu ban đầu cho quá trình sinh tổng hợp các dược chất như alanin, L-tyrosine, phenylalanine và L-tryptophan (Li et al., 2001). Ngoài ra, chúng còn được sử dụng trong quá trình sản xuất các thuốc bảo vệ thực vật, polymer, mỹ phẩm và phụ gia thực phẩm (Wieschalka et al., 2012). Bằng con đường hóa học, pyruvate được tạo ra bởi quá trình loại H_2 và carboxyl của axit tartaric (Howard & Fraser, 1932). Quá trình này đơn giản nhưng không hiệu quả về mặt giá thành. Vì vậy, sản xuất pyruvate bằng con đường công nghệ sinh học đang thu hút sự quan tâm, được xem như là một phương pháp thay thế tiềm năng nhằm giảm giá thành sản xuất (Li et al., 2001).

Có 3 phương pháp để sản xuất pyruvate bằng con đường này đó là lên men trực tiếp, sử

dụng tế bào nghỉ và phương pháp enzyme. Trong đó lên men trực tiếp từ nguồn carbon như glucose có ưu thế hơn tính trên cả hiệu quả về giá thành và chất lượng của sản phẩm. Tuy nhiên, do pyruvate nằm ở vị trí giao nhau quan trọng của quá trình trao đổi chất của tế bào nên thường rất khó để có được các chủng giống có thể tích lũy lượng lớn pyruvate ngoại bào. Cho đến nay, việc sản xuất pyruvate theo phương pháp lên men trực tiếp chủ yếu phụ thuộc vào nhóm vi sinh vật nhân sơ và nhân chuẩn đã được gây đột biến hoặc tái tổ hợp như vi khuẩn *E. coli* (Causey et al., 2004; Zhu et al., 2008), *Corynebacteria glutamicum* (Wieschalka et al., 2012); hoặc nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (van Maris et al., 2004), *Torulopsis glabrata* (Liu et al., 2007; Miyata & Yonehara, 1999). Mặc dù các đối tượng này có thể cho hàm lượng pyruvate cao nhưng yêu cầu về điều kiện nuôi cấy khá nghiêm ngặt, phức tạp và chi phí đầu tư ban đầu cho hệ thống nuôi tồn kém. Vì vậy, việc tìm kiếm các chủng hoang dã có

khả năng tổng hợp pyruvate cao, nuôi cấy dễ dàng, đáp ứng được mục đích thương mại hóa đang ngày càng thu hút sự quan tâm chú ý của các nhà khoa học trên thế giới.

Halophile là thuật ngữ chỉ nhóm các vi sinh vật cần muối (NaCl) cho quá trình sinh trưởng. Chúng có thể được tìm thấy ở những nơi có nồng độ muối cao như các hồ muối, đầm muối (Setati, 2010). Tùy thuộc vào nồng độ muối tối ưu cho sự sinh trưởng mà có thể chia chúng thành 2 nhóm: nhóm cần muối ở mức trung bình (moderate halophile) và mức cao (extreme halophiles) (Oren, 2008; Ventosa et al., 1998). Các vi sinh vật ưa muối đặc biệt chi *Halomonas* đã được sử dụng phổ biến để sản xuất các chất hóa học ở quy mô công nghiệp bởi những đặc tính ưu việt của chúng như khả năng sinh trưởng ở pH và nồng độ muối NaCl cao, khoảng chịu đựng về nhiệt độ rộng, và khả năng chịu được nồng độ cơ chất cao (Quillaguamán et al., 2010; Wang et al., 2014; Kawata et al., 2016; Yin et al., 2015). Các sản phẩm có giá trị được sản xuất từ nhóm này bao gồm poly-hydroxyalkanoates (PHA), một họ chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học (Quillaguamán et al., 2010); ectoine và hydroxyectoine (Pastor et al., 2010), các enzyme chịu kiềm như amylase, protease, xylanase, cellulase (Setati, 2010). Trong đó, poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) là loại được nghiên cứu nhiều nhất trong số hơn 100 dạng khác nhau của họ chất dẻo sinh học PHA bởi chúng có nhiều đặc tính vật lý tương tự như các chất dẻo chịu nhiệt có nguồn gốc từ dầu mỏ (Tan et al., 2011).

Đặc biệt gần đây nhất, Kawata et al. (2016) đã phát hiện chủng vi khuẩn hoang dại *Halomonas* sp. KM-1 có khả năng tiết ra môi trường nuôi một lượng lớn pyruvate tương đương với các chủng vi khuẩn/nấm men đột biến hoặc tái tổ hợp. Ở Việt Nam, Ngô Thị Hoài Thu và nnk. (2018) đã tiến hành phân lập và sàng lọc một số chủng *Halomonas* có khả năng sinh pyruvate từ rừng ngập mặn Nha Trang, Khánh Hòa. Tuy nhiên, hàm lượng pyruvate của các chủng phân lập được rất thấp, tối đa chỉ đạt 0,11 g/L sau 48 giờ nuôi cấy.

Trong nghiên cứu này, một số chủng vi khuẩn ưa mặn thuộc chi *Halomonas* phân lập từ rừng ngập mặn thuộc huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định đã được lựa chọn cho thấy tiềm năng của chúng trong việc sản xuất pyruvate và chất dẻo sinh học PHB.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phân lập các chủng vi khuẩn ưa mặn và điều kiện nuôi cấy

Các mẫu đất sử dụng để phân lập các chủng vi khuẩn ưa mặn thuộc chi *Halomonas* được thu thập tại rừng ngập mặn thuộc xã Bạch Long, huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định năm 2017. Mẫu được phân lập theo phương pháp của Kawata et al. (2010) có một số cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của Việt Nam. Cân 0,1 g mẫu đất được hòa trong 0,9 mL nước muối sinh lý, đảo đều sau đó pha loãng theo dãy mũ thập phân bằng môi trường GTY lỏng (glucose: 1 g/L, tryptone: 0,5 g/L, cao nấm men: 2 g/L, CaCl₂: 1 g/L, NaCl: 100 g/L). Dung dịch sau khi pha loãng được nuôi tĩnh ở 37°C trong 5 ngày. Tiến hành cấy trải 50 µL dịch nuôi cấy trên môi trường thạch GTY chứa 10% NaCl và ủ ở 37°C trong 1 tuần. Khi các khuẩn lạc xuất hiện, tiến hành cấy riêng rẽ từng khuẩn lạc trên đĩa thạch và lặp đi lặp lại cho đến khi thu được khuẩn lạc sạch (Tang et al., 2010). Các chủng vi khuẩn sau khi đã được làm sạch được lưu giữ trên đĩa thạch có chứa môi trường GTY 5% NaCl ở 4°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Ngoài GTY, môi trường SOT cải tiến có bổ sung 20% glucose cũng được sử dụng để thử khả năng sinh tổng hợp pyruvate của các chủng đã phân lập (Kawata et al., 2016). Môi trường này có chứa các thành phần như sau (g/L): NaHCO₃-16,8, Na₂CO₃-21,2, K₂HPO₄. 3H₂O-0,66, NaNO₃-30, K₂SO₄-1, NaCl-1, MgSO₄. 7H₂O-0,2, CaCl₂-0,03, FeSO₄.7H₂O-0,01, Na₂EDTA.2H₂O-0,09 và hỗn hợp vi lượng 1 ml/L với các thành phần (mg/L): H₃BO₃-2,86, MnSO₄.7H₂O-2,5, ZnSO₄-0,022, CuSO₄.5H₂O-0,079, Na₂MoO₄.2H₂O-0,021, Co(NO₃)₂.6H₂O-4,9.

Xác định một số đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn đã phân lập

Quan sát hình thái khuẩn lạc: Tế bào của chủng vi khuẩn được tiến hành pha loãng và cấy trải trên môi trường thạch GTY 5% NaCl. Sau 6, 12, 24, 48 và 72 giờ, kiểm tra khả năng hình thành khuẩn lạc, quan sát hình thái và màu sắc của khuẩn lạc.

Nhuộm Gram và quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi quang học: Mẫu được nuôi cấy trên môi trường thạch GTY 5% qua đêm ở 37°C. Khuẩn lạc được hòa thành dịch huyền

phủ bằng nước muối sinh lý 0,9% để tạo tiêu bản nhuộm Gram theo hướng dẫn sử dụng đi kèm của kit nhuộm Gram (công ty Nam Khoa, Việt Nam). Tiêu bản nhuộm Gram được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1.000 lần.

Quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM): Khuẩn lạc được nuôi cấy trong môi trường GTY lỏng chứa 5% NaCl ở 37°C trong 48 giờ. Quá trình xử lý tế bào và quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét Hitachi S-4800 (Nhật Bản) được thực hiện tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Xác định một số đặc điểm sinh lý-sinh hóa của các chủng vi khuẩn đã phân lập

Hoạt tính oxidase của các chủng vi khuẩn được xác định dựa trên khả năng sinh enzyme cytochrome oxidase của vi khuẩn nhờ sử dụng kit Bactident® Oxidase (Merck, USA). Hoạt tính catalase được xác định bằng sự hình thành bọt khí sau khi nhỏ 1–2 giọt 3% H₂O₂ lên khuẩn lạc.

Xác định khả năng sinh polysaccharide ngoại bào của các chủng vi khuẩn được tiến hành theo phương pháp của Azeredo & Oliveira (1996). Dịch nuôi cấy vi khuẩn sau 48 giờ được ly tâm, loại cặn tế bào và bổ sung isopropanol theo tỷ lệ 1 thể tích dịch nuôi: 3 thể tích dung môi. Hỗn hợp được giữ ở -20°C qua đêm và quan sát sự hình thành tủa sau khi ly tâm.

Tích lũy PHB của các chủng vi khuẩn khi nuôi trong môi trường GTY có nồng độ glucose và NaCl tương ứng là 15% và 5% được xác định bằng phương pháp sắc ký khí sử dụng chất chuẩn thương mại PHB (Fluka, Buchs, Thụy Sĩ) theo mô tả của Kawata et al. (2012a). Tế bào vi khuẩn được thu tại các thời điểm xác định bằng cách ly tâm 1,5 ml dịch nuôi cấy ở 12.000 rpm trong 3 phút. Cặn tế bào được rửa 2 lần với nước cất và sấy khô trong 2 giờ để xác định khối lượng khô. Cân khoảng 10 mg mẫu sinh khối đưa vào ống phá mẫu, bổ sung 1 ml dung dịch methanol đã được axit hóa bằng 10% axit sulfuric có chứa chất chuẩn benzoic (0,1%). Tiến hành thủy phân mẫu ở 100°C trong 3 giờ. Hỗn hợp được để nguội ở nhiệt độ phòng bổ sung 0,5 ml nước khử ion và tiến hành trộn đều bằng máy vortex trong 30 giây. Sau khi để tĩnh, hỗn hợp sẽ được phân tách thành hai pha, trong đó pha dưới có chứa các methylester. Dùng

pipet Pasteur hút lấy pha dưới đưa qua Na₂SO₄ khan để loại bỏ hết phần nước còn lại, sau đó chuyển vào các ống mẫu để tiến hành phân tích trên máy GC.

Xác định khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn ở các dải nồng độ muối, nhiệt độ và pH khác nhau: Sinh trưởng của các chủng được kiểm tra ở các nhiệt độ khác nhau (4, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 37, 40 và 45°C) trong môi trường thạch GTY có chứa 5% NaCl, pH 7,5 trong 2–5 ngày. Tương tự, vùng pH cho sinh trưởng được kiểm tra từ pH 5–12, nồng độ muối NaCl được kiểm tra trong vùng 0–30%.

Các đặc điểm sinh hóa khác như khả năng đồng hóa D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-manitol; khử nitrate, nitrite được xác định bằng kit API 20NE (bioMérieux, Pháp). Sự thủy phân casein, gelatin, và Tween 80 được xác định theo mô tả của Cowan & Steel (1965). Thành phần axit béo của vi khuẩn phân lập được phân tích theo mô tả của Đặng Diễm Hồng và nnk. (2007).

Định tên sinh học phân tử của chủng tiềm năng

DNA tổng số của chủng vi khuẩn tiềm năng được tách chiết và tinh sạch theo kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI). Gen 16S rRNA của chủng lựa chọn được khuếch đại bằng PCR sử dụng DNA tổng số làm khuôn với cặp mồi 27 F: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (20 nu) và 1525 R: 5'- AAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (18 nu) (Kawata & Aiba, 2010). Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng Centrifuge Kit, Promega (USA) và đọc trình tự trực tiếp trên máy ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer (USA). Đoạn trình tự gen 16S rRNA đọc được sẽ được so sánh với các trình tự đoạn gen 16S rRNA trên NCBI sử dụng chương trình BLAST. Sau đó, các chương trình phần mềm chuyên dụng như DNA Club, ClustalX 1.83, DNASTAR và MEGA 4 được sử dụng để phân tích, so sánh và xây dựng cây phát sinh chủng loại của mẫu nghiên cứu. Trình tự gen 16S rRNA của các loài thuộc chi *Halomonas* và chi *Oceanospirillum* (nhóm ngoại) đăng ký trên GenBank đã được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại.

Xác định hàm lượng pyruvate trong môi trường nuôi cấy

Hàm lượng pyruvate trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng phương pháp

salicylaldehyde với một số thay đổi để phù hợp với điều kiện Việt Nam (Berntsson, 1995). Dịch nuôi cấy vi khuẩn được ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 5 phút. Ống nghiệm chứa 1 mL dịch nuôi sau ly tâm loại bỏ tế bào được bổ sung thêm 1 mL dung dịch NaOH 25% và 1 mL dung dịch 2% salicylaldehyde pha trong ethanol, trộn đều và đặt trong bể ổn nhiệt ở 37°C trong 10 phút. Sau phản ứng, hỗn hợp được để nguội ở

nhệt độ phòng và được xác định mật độ quang ở bước sóng 470 nm bằng máy quang phổ (Hitachi U-1100 Spectrophotometer, Nhật Bản). Hàm lượng pyruvate trong mẫu được xác định dựa trên giá trị OD₄₇₀ (giá trị mật độ quang đo tại bước sóng 470 nm) thu được và đường chuẩn về mối tương quan giữa hàm lượng sodium pyruvate chuẩn (C₃H₃NaO₃, Sigma) với giá trị OD₄₇₀ tương ứng.

Bảng 1. Một số đặc điểm của các chủng vi khuẩn ưa mặn đã phân lập

Đặc điểm	ND1	ND2	ND3	ND7
Màu sắc khuẩn lạc	tròn, kem	tròn, kem	tròn, vàng	tròn, kem
Kích thước tế bào (µm)	2,01–2,67 × 0,50–0,67	1,04–1,63 × 0,63–0,75	1,67–1,91 × 2,92–5,83	4,16–6,77 × 0,61–0,83
Hình dạng tế bào	que	que ngắn	que ngắn	que dài
Tích lũy PHB	+	+	–	+
Sinh polysaccharide ngoại bào	+	+	+	–
Hoạt tính oxidase	+	+	–	+
Hoạt tính catalase	+	+	+	+
Dải nồng độ muối (% w/v)	0,5–20	0,5–20	0,5–20	0,5–20
Dải pH	6–12	5–12	5–12	6–12
Dải nhiệt độ (°C)	20–40	20–45	20–40	20–40
Khử nitrate	+	+	+	+
Khử nitrite	+	+	+	+
Thủy phân				
Casein	–	–	–	–
Gelatin	–	–	–	–
Tween 80	–	–	–	–
Khả năng đồng hóa				
D-glucose	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	–	+
D-mannose	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+
Thành phần axit béo chính				
C18:1ω–7c	35,3	30,5	36,3	38,7
C16:0	19,6	22,9	17,2	15,3
C19:0 cyclo ω8c	0,6	1,8	0,3	0,1

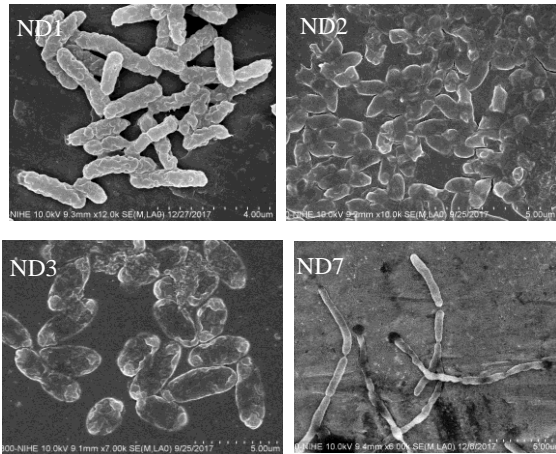
+ dương tính; – âm tính

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Một số đặc điểm hình thái, hóa sinh của các chủng vi khuẩn ưa mặn đã phân lập

Các kết quả quan sát về mặt hình thái đã cho thấy cả 4 chủng được phân lập đều là vi khuẩn Gram âm, hình que. Trên môi trường thạch GTY 5%, chủng ND1, ND2 và ND7, khuẩn lạc có màu kem, hình tròn và đục. Trong khi đó, chủng ND3, khuẩn lạc lại có màu vàng. Các chủng đều có khả năng sinh trưởng với

khoảng nồng độ muối là 0,5–20%, pH 5 hoặc 6–12, nhiệt độ 20–40°C hoặc ngưỡng nhiệt cao nhất là 45°C trong trường hợp của chủng ND2. Ngoài ra, chúng còn có một số đặc điểm khác được trình bày ở bảng 1. Dựa theo khóa phân loại của Vreeland et al. (1980), 4 chủng vi khuẩn ưa mặn phân lập từ rừng ngập mặn huyện Giao Thủy, Nam Định được kí hiệu là ND1, ND2, ND3 và ND7 có thể thuộc chi *Halomonas*. Hình 1 là hình thái tế bào của 4 chủng được chụp bằng kính hiển vi điện tử quét.



Hình 1. Hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn ưa mặn đã phân lập từ rừng ngập mặn huyện Giao Thủy, Nam Định được chụp bằng kính hiển vi điện tử quét

Khả năng sinh trưởng, tổng hợp pyruvate và PHB của các chủng vi khuẩn ưa mặn phân lập được

Bốn chủng vi khuẩn ưa mặn sau khi phân lập, làm sạch, được nuôi cấy trong môi trường GTY 5% NaCl có bổ sung 15% glucose nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp pyruvate và PHB. Kết quả chỉ ra ở bảng 2 cho thấy, khi sinh trưởng của các chủng đi vào pha cân bằng (sau 60 giờ nuôi cấy), hàm lượng pyruvate và PHB của chủng ND7 đạt cao nhất so với 3 chủng còn lại tương ứng là 6,78 g/L và 50,23% khối lượng khô. Chủng ND3 không có khả năng tổng hợp PHB. Đã có rất nhiều các công bố liên quan đến việc sản

xuất PHB từ các loài thuộc chi *Halomonas*. Theo nghiên cứu của Quillaguamán et al. (2006) và Tan et al. (2011), khối lượng khô và hàm lượng PHB của *Halomonas boliviensis* và *Halomonas* TD01 tương ứng đạt 4 và 6 g/L; 60 và 69% khối lượng khô. Nghiên cứu của Kawata et al. (2012b) cho thấy một số loài thuộc chi *Halomonas* có khả năng tích lũy PHB 5–25,1% khối lượng khô khi nuôi cấy ở ống nghiệm chứa môi trường marine broth (MB) với 3% glucose trong 72 giờ ở 33°C. Hàm lượng PHB của chủng *Halomonas* sp. KM1 tăng lên đáng kể (63,6%) khi nuôi trong môi trường SOT có bổ sung 10% glucose sau 48 giờ nuôi cấy. Đoàn Văn Thuộc và Nguyễn Thị Vóc (2016) đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn ưa mặn từ đất rừng ngập mặn Quảng Ninh có khả năng sinh trưởng đạt 3,3–4,3 g/L sinh khối khô và tích lũy lượng PHB dao động 50–67% sinh khối khô. Như vậy, so với các công bố khác có thể thấy chủng vi khuẩn ưa mặn ND7 cũng là chủng tiềm năng cho việc sản xuất PHB.

Mặc dù hàm lượng pyruvate của chủng ND7 cao hơn rất nhiều so với công bố trước đó của Ngô Thị Hoài Thu và nnk. (2018) (0,11 g/L) nhưng vẫn còn thấp để có thể sử dụng để sản xuất pyruvate ở quy mô lớn hơn. Nghiên cứu của Kawata et al. (2016) cho thấy, chủng *Halomonas* sp. KM1 khi nuôi trong môi trường SOT cải tiến có bổ sung 20% glucose, có thể tiết pyruvate lên tới 63,3 g/L sau 48 giờ nuôi cấy. Do vậy, việc tìm được điều kiện nuôi cấy để có thể tăng khả năng sản xuất pyruvate của chủng này là công việc cần tiến hành nghiên cứu.

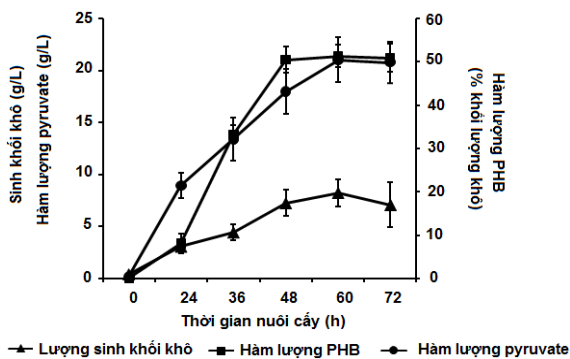
Bảng 2. Khả năng sinh trưởng, tổng hợp pyruvate và PHB của các chủng vi khuẩn ưa mặn đã phân lập khi nuôi trên môi trường GTY 5% NaCl có bổ sung 15% glucose

Ký hiệu mẫu	Khối lượng khô (g/L)	Hàm lượng pyruvate (g/L)	Hàm lượng PHB (% khối lượng khô)
ND1	3,20 ± 0,02	3,01 ± 0,21	40,25 ± 1,25
ND2	3,07 ± 0,01	1,01 ± 0,01	35,76 ± 0,96
ND3	3,25 ± 0,03	2,23 ± 0,03	0,00 ± 0,00
ND7	4,56 ± 0,02	6,87 ± 0,06	50,23 ± 1,45

Theo công bố của Calabria et al., (2011), Yokaryo & Tokiwa (2014) các chủng vi khuẩn có khả năng chịu kiềm là những chủng tiềm năng để sản xuất các axit hữu cơ trong đó có pyruvate. Kawata et al. (2016) đã phát hiện khả năng pyruvate được tiết ra môi trường nuôi cấy lên tới 63,3 g/L sau 48 giờ nuôi chủng vi khuẩn *Halomonas* sp. KM1 trong môi trường khoáng có độ kiềm cao (môi trường SOT cải tiến) và bổ

sung 20% glucose. Do vậy, chúng tôi đã thử nuôi cấy các chủng vi khuẩn ưa mặn đã phân lập trong môi trường này. Việc sử dụng môi trường SOT để nuôi cấy vi khuẩn cho sản xuất pyruvate hoặc PHB không chỉ giúp giảm giá thành nuôi cấy vì đây là môi trường khoáng, rẻ tiền mà còn hạn chế được sự tạp nhiễm các loại vi khuẩn khác bởi pH của môi trường này khá cao (pH 9,4).

Kết quả cho thấy, trong số 4 chủng đã phân lập chỉ có chủng ND7 có khả năng sinh trưởng tốt. Hàm lượng pyruvate được tiết ra môi trường tăng theo thời gian nuôi cấy và đạt 21,02 g/L sau 60 giờ nuôi cấy. Hàm lượng PHB tăng nhanh trong thời gian đầu và sau 48 giờ sự tích lũy chúng không có sự khác biệt đáng kể, cao nhất tại thời điểm 60 giờ với hàm lượng khoảng 51,26% khối lượng khô (hình 2). Trong quá trình đường phân, pyruvate được tạo thành nhờ sự chuyển hóa glucose thành phosphoenolpyruvate (PEP), sau đó PEP sẽ được chuyển hóa thành pyruvate nhờ enzym pyruvate kinase (PK). Ở bước tiếp theo pyruvate sẽ bị loại gốc carboxyl để tạo thành acetyl-CoA nhờ pyruvate dehydrogenase complex (PDC), và acetyl-CoA sẽ bước vào hàng loạt các bước tiếp theo để tạo ra PHB. Nếu như hoạt tính của PK cao hơn PDC, pyruvate sẽ được tích lũy nhiều hơn. Như vậy, với nồng độ glucose rất cao ban đầu (20%) ở giai đoạn đầu tiên, quá trình tích lũy PHB và tiết pyruvate đồng thời cùng tăng. Sau đó sự tích lũy PHB chậm dần sau 48 giờ trong khi quá trình tiết pyruvate vẫn tiếp tục tăng có thể là do hoạt tính của enzym PK lúc này cao hơn PDC.



Hình 2. Khả năng sinh trưởng, tổng hợp pyruvate, PHB của chủng ND7 khi nuôi trên môi trường SOT có bổ sung 20% glucose

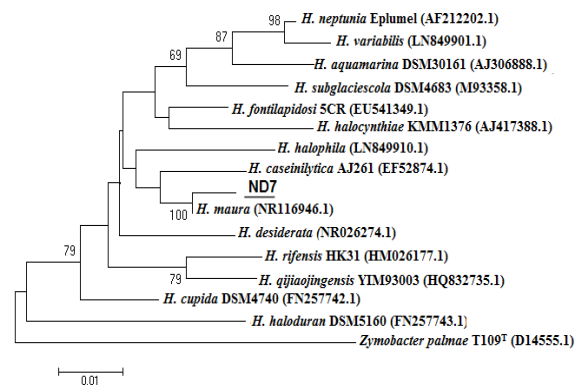
Kết quả thu được cho thấy, đây là chủng tiềm năng để sản xuất pyruvate và PHB. Tuy nhiên, trong thời gian tới cần tiếp tục nghiên cứu nhằm nâng cao hàm lượng pyruvate sản sinh từ chủng vi khuẩn này.

Định tên khoa học chủng ND7 dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA

Bên cạnh các đặc điểm hình thái, sinh hóa, việc đọc và so sánh trình tự gen 16S rRNA sẽ

cho phép định tên khoa học một cách chính xác hơn chủng vi khuẩn nghiên cứu. Do đó, đoạn trình tự gen 16S rRNA của mẫu ND7 đã được khuếch đại bằng cặp mồi 27 F-1525 R với kích thước khoảng 1500 bp. So sánh đoạn trình tự gen 16S rRNA thu được với một số loài thuộc chi *Halomonas* đã công bố trên ngân hàng gen, chúng tôi nhận thấy tỉ lệ phần trăm tương đồng giữa các loài thuộc chi này dao động từ 90,1% đến 99,5%. Trong đó, chủng ND7 có độ tương đồng cao nhất đối với loài *H. maura* (mã số đăng ký YIM 94343) là 99,5%, tiếp theo là loài *H. pantelleriensis* AAP (X93493) là 95,4%. Trên cây phát sinh chủng loại (hình 3) cho thấy chủng ND7 có mối quan hệ rất gần gũi với các loài thuộc chi *Halomonas*.

Như vậy, dựa vào các đặc điểm hình thái, hóa sinh và kết quả đọc, so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA, chúng tôi cho rằng chủng ND7 có thể thuộc về loài *H. maura*.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại của chủng ND7 so sánh với các loài thuộc chi *Halomonas* đã được công bố trên ngân hàng gen

KẾT LUẬN

Đã phân lập được 4 chủng vi khuẩn ưa mặn từ mẫu đất thu ở rừng ngập mặn Giao Thủy, Nam Định có khả năng tiết tổng hợp chất dẻo sinh học PHB và pyruvate. Trong đó, chủng ND7 có khả năng tiết ra 21,02 g/L pyruvate và tích lũy PHB lên tới 51,26% khối lượng khô sau 60 giờ nuôi cấy trong môi trường SOT cải tiến có bổ sung 20% glucose.

Dựa trên các đặc điểm hình thái, hóa sinh và trình tự đoạn gen 16S rRNA, chủng ND7 được xác định thuộc về loài *Halomonas maura*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc Gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.04-2016.06.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Azeredo J., Oliveira R., 1996. A new method for precipitating bacterial exopolysaccharide. *Biotechnol. Tech.*, 10(5): 341–344.
- Berntsson S., 1955. Spectrophotometric determination of pyruvic acid by salicylaldehyde method. *Anal. Chem.*, 27(10): 1659–1660.
- Calabia B. P., Tokiwa Y., Aiba S., 2011. Fermentative production of l-(+)-lactic acid by an alkaliphilic marine microorganism. *Biotechnol. Lett.*, 33: 1429–1433.
- Causey T. B., Shanmugam K. T., Yomano L. P., Ingram L. O., 2004. Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101: 2235–2240.
- Cowan S. T., Steel K. J., 1965. Manual for identification of medical bacteria. Cambridge University Press, London.
- Đặng Diễm Hồng, Hoàng Minh Hiền, Nguyễn Đình Hưng, Hoàng Sỹ Nam, Hoàng Lan Anh, Ngô Hoài Thu, Đinh Khánh Chi, 2007. Nghiên cứu về quá trình sinh tổng hợp DHA từ các loài vi tảo biển dị dưỡng mới *Labyrinthula*, *Schizochytrium* và ứng dụng. *Tạp chí Khoa học và công nghệ*, 45(1B): 144–153.
- Howard J. W., Fraser W. A., 1932. Preparation of pyruvic acid. *Org. Synth. Coll.*, 1: 475–480.
- Kawata Y., Aiba S., 2010. Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(1): 175–177.
- Kawata Y., Kawasaki K., Shigeri Y., 2012a. Efficient secreted production of (R)-3-hydroxybutyric acid from living *Halomonas* sp. KM-1 under successive aerobic and microaerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96: 913–920.
- Kawata Y., Nishimura T., Matsushita T., Tsubota J., 2016. Efficient production and secretion of pyruvate from *Halomonas* sp. KM-1 under aerobic conditions. *AMB Express*, 6: 22.
- Kawata Y., Shi L. H., Kawasaki K., Shigeri Y., 2012b. Taxonomic characterization and metabolic analysis of the *Halomonas* sp. KM-1, a highly bioplastic poly(3-hydroxybutyrate)-producing bacterium. *J. Biosci. Bioeng.*, 113(4): 456–460.
- Li Y., Chen J., Lun S. Y., 2001. Biotechnological production of pyruvic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 451–459.
- Liu L., Xu Q., Li Y., Shi Z., Zhu Y., Du G., Chen J., 2007. Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant mutant of *Torulopsis glabrata*. *Biotechnol. Bioeng.*, 97: 825–832.
- Miyata R., Yonehara T., 1999. Breeding of high-pyruvate producing *Torulopsis glabrata* with acquired reduced pyruvate decarboxylase. *J. Biosci. Bioeng.*, 88: 173–178.
- Oren A., 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst.*, 4: 2.
- Pastor J., Salvador M., Argandoña M., Bernal V., Reina-Bueno M., Csonka L. N., Iborra J. L., Vargas C., Nieto J. J., Canovas M., 2010. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol. Adv.*, 28: 782–801.
- Quillaguamán J., Delgado O., Mattiasson B., Hatti-Kaul R., 2006. Poly(β-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme Microb. Technol.*, 38: 148–154.
- Quillaguamán J., Guzmán H., Van-Thuoc D., Hatti-Kaul R., 2010. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85: 1687–1696.
- Setati M. E., 2010. Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 1555–1560.
- Tan D., Xue Y.S., Aibaidula G., Chen G.Q., 2011. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour. Technol.*, 102: 8130–8136.

- Tang S. K., Wang Y., Lee J. C., Lou K., Park D. J., Kim C. J., Li W. J., 2010. *Georgenia halophila* sp. nov., a novel halophilic actinobacterium isolated from a salt lake in China. *Int. Syst. Evol. Microbiol.*, 60: 1317–1321.
- Ngô Thị Hoài Thu, Hoàng Thị Lan Anh, Hoàng Thị Minh Hiền, Lưu Thị Tâm, Lê Thị Thom, Nguyễn Cẩm Hà, Yoshikazu Kawata, Đặng Diễm Hồng, 2018. Phân lập chủng vi khuẩn *Halomonas* sp. có khả năng tổng hợp pyruvate từ rừng ngập mặn tỉnh Khánh Hòa. Tạp chí Công nghệ sinh học (chấp nhận đăng).
- Đoàn Văn Thuộc, Nguyễn Thị Vóc, 2016. Isolation of halophilic bacterial strains from mangrove soil samples for polyhydroxyalkanoate production. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 32(1): 79–85.
- Van Maris A. J., Geertman J. M., Vermeulen A., Groothuizen M. K., Winkler A. A., Piper M. D., van Dijken J. P., Pronk J. T., 2004. Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent, glucose-tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 159–166.
- Ventosa A., Nieto J. J., Oren A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 504–544.
- Vreeland R. H., Litchfield C. D., Martin's E. L., Elliot E., 1980. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30(2): 485–495.
- Wang Y., Yin J., Chen G. Q., 2014. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 30: 59–65.
- Wieschalka S., Blombach B., Eikmanns B. J., 2012. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94: 449–459.
- Yin J., Chen J. C., Wu Q., Chen G. Q., 2015. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, 33: 1433–1442.
- Yokaryo H., Tokiwa Y., 2014. Isolation of alkaliphilic bacteria for production of high optically pure L - (+) - lactic acid. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 60: 270–275.
- Zhu Y., Eiteman M. A., Altman R., Altman E., 2008. High glycolytic flux improves pyruvate production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74: 6649–6655.

POTENTIAL PYRUVATE AND POLY (3- HYDROXYBUTYRATE) PRODUCTION OF HALOPHILES BACTERIA ISOLATED FROM GIAO THUY, NAM DINH'S MANGROVE FOREST

Hoang Thi Lan Anh¹, Luu Thi Tam¹, Hoang Thi Minh Hien¹,
 Nguyen Cam Ha^{1,2}, Ngo Thi Hoa Diep⁴, Ngo Thi Hoai Thu¹,
 Yoshikazu Kawata³, Nguyen Thanh Thuy⁵, Dang Diem Hong^{1,2*}

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

³Biomedical Research Institute,

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan

⁴Thien An Trading Production Joint Stock Company

⁵National Institute of Hygiene and Epidemiology

SUMMARY

Pyruvic acid (pyruvate) the most important α -oxocarboxylic acid, plays a central role in energy metabolism in living organisms. It is used mainly as a starting material in the biosynthesis of pharmaceuticals as well as employed in the production of crop protection agents, polymers, cosmetics and food additives. Four Gram-

negative, moderately halophilic, pyruvate and poly (3-hydroxybutyrate)- producing strains were isolated from soil samples collected from mangrove forest at Giao Thuy, Nam Dinh province. Preliminary screening results showed that among four strain, the ND7 strain was able to produce the highest bioplastic-poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) and extracellular secretion of pyruvate, respectively, reaching 50.23% dry weight and 6.87 g/L after 60 hours of cultivation. When cultured in high alkaliphilic medium (pH 9.4), the pyruvate secretion increased significantly (21.02 g/L after 60 hours of cultivation). Based on the morphological, biochemical characteristics and nucleotide sequence analysis of partial 16S rRNA gene, the ND7 strain was identified as *Halomonas maura*. The results allow us to conclude that ND7 strain is a potential target for the exploitation of pyruvate in a larger scale.

Keywords: *Holomonas*, bioplastic halophilic bacteria, organic acid, pyruvate.

Citation: Hoang Thi Lan Anh, Luu Thi Tam, Hoang Thi Minh Hien, Nguyen Cam Ha, Ngo Thi Hoa Diep, Ngo Thi Hoai Thu, Kawata Y., Nguyen Thanh Thuy, Dang Diem Hong, 2018. Tap chi Sinh hoc, 40(2): 184–192. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.12648>.

**Corresponding author email:* ddhong60vn@yahoo.com

Received 7 June 2018, accepted 30 June 2018