

## SINH TỔNG HỢP AMILAZA VÀ PROTEINAZA NGOẠI BÀO CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN ƯA MẶN PHÂN LẬP TỪ CÁC ĐÀM NUÔI TÔM

**PHAN THỊ TUYẾT MINH**

*Viện Công nghệ sinh học*

**TÀNG THỊ CHÍNH**

*Viện Công nghệ môi trường*

Hiện nay, đại dịch cúm gia cầm, bệnh bò điên và bệnh lở mồm long móng ở gia súc đang hoành hành khắp các châu lục thì nhu cầu tiêu thụ các sản phẩm thủy sản trong đó có tôm xuất khẩu đang tăng lên nhanh chóng. Việt Nam là một nước trong những nước có điều kiện khí hậu thuận lợi cho việc phát triển nuôi trồng thủy sản phục vụ cho xuất khẩu. Diện tích nuôi tôm xuất khẩu ở nước ta đang tăng lên nhanh chóng, nhà nước không kiểm soát được. Do vậy, một vấn đề bức xúc đang đặt ra là trong quá trình nuôi tôm cao sản là nguồn nước và bùn ao ở đây thường bị ô nhiễm nặng, do thức ăn thừa và các chất thải ra của tôm làm cho các vi sinh vật gây bệnh làm cho tôm chết hàng loạt. Trước đây, người ta thường sử dụng các hoá chất để xử lý nước nuôi tôm và bùn đáy ao. Các hoá chất trên đã làm cho hàng loạt thực vật thủy sinh bị chết đã làm cho lớp bùn đáy ao dày hơn, tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật gây bệnh phát triển [3, 5]. Việc sử dụng các chế phẩm sinh học làm sạch ao đầm nuôi tôm là một trong những giải pháp có hiệu quả và an toàn cao đang được những nước nuôi tôm hàng đầu thế giới như Trung Quốc, Thái Lan sử dụng rộng rãi. Ở Việt Nam phần lớn các chế phẩm sinh học sử dụng trong xử lý nước

và bùn ao nuôi tôm đều nhập từ Thái Lan và Trung Quốc về. Trong thời gian gần đây, các nhà khoa học ở nước ta đã và đang tập trung vào hướng nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi sinh vật hữu ích và ứng dụng chúng vào quá trình làm sạch nước và bùn ở các ao đầm nuôi tôm [4, 6, 7]. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp amilaza và proteinaza ngoại bào của các chủng vi khuẩn ưa mặn phân lập được từ các ao đầm nuôi tôm để phục vụ cho việc nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý các chất hữu cơ dư thừa trong các ao đầm nuôi tôm cao sản ở các vùng ven biển.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên liệu

- Các mẫu bùn lấy từ các đầm nuôi tôm cao sản tại Đồ Sơn - Hải Phòng và các tỉnh phía Nam.

- Cao thịt, cao nấm, men pepton, glucoza, sacaroza, tinh bột tan, gelatin, casein của Hãng Merck.

Môi trường nghiên cứu [1]:

Môi trường nuôi vi khuẩn sinh tổng hợp proteinaza (CA) (g/l)		Môi trường nuôi vi khuẩn sinh tổng hợp amilaza (AA) (g/l)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	Tinh bột	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	Pepton	7
Cazein	2	Nước biển	1000 ml
Dextrin	0,05	Thạch	20
Cao thịt	2	NaCl	50
Thạch	20		
NaCl	50		
PH = 6,8		PH = 6,8	

## 2. Phương pháp

- *Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân giải các hợp chất hữu cơ [1, 2]*

Chúng tôi tiến hành lấy mẫu bùn ở ao nuôi tôm cao sản tại Đồ Sơn - Hải Phòng và các tỉnh phía nam để phân lập các nhóm vi khuẩn. Các mẫu bùn được pha loãng bằng nước muối sinh lý 0,9% NaCl trong điều kiện vô trùng. Nồng độ pha loãng theo cơ số mũ 10:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,...  $10^{-7}$ .

Nhỏ 100  $\mu$ l dung dịch pha loãng ở trên vào các đĩa thạch chứa môi trường tinh bột tan + 5% NaCl và casein + 5% NaCl. Gạt đều cho khô mặt thạch, sau đó ủ ở 28 - 30°C trong 48 giờ. Lấy ra quan sát, tách các khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào các ống thạch nghiêng có chứa môi trường tương ứng (tinh bột tan, casein). Sau đó các chủng vi sinh vật đã phân lập được cấy trên môi trường thạch với môi trường chọn lọc có chứa tinh bột tan hoặc casein. Sau 48 giờ nuôi cấy,

dùng thuốc thử Lugol để tiến hành kiểm tra vòng phân giải tạo thành trên môi trường tinh bột và casein. Chủng vi khuẩn nào tạo vòng phân giải lớn sẽ được giữ giống để tiếp tục nghiên cứu.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

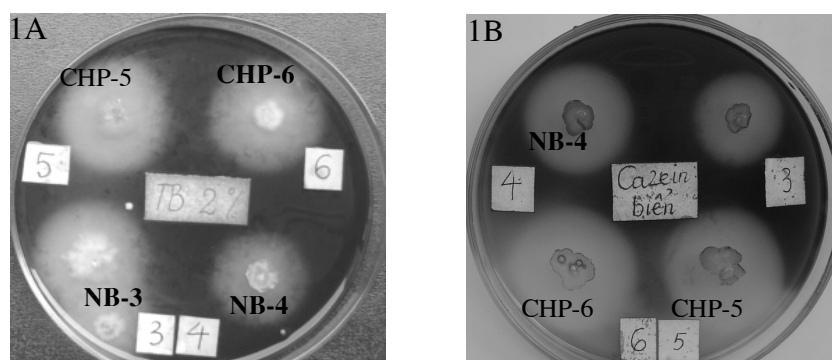
### 1. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn ưa mặn sinh amilaza và proteinaza ngoại bào từ các ao nuôi tôm

Chúng tôi tiến hành lấy các mẫu bùn ở 5 địa điểm của vùng nuôi tôm Đồ Sơn - Hải Phòng và 7 mẫu bùn của một số tỉnh phía Nam để phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột và casein. Từ các mẫu bùn trên chúng tôi đã phân lập được 20 chủng vi khuẩn có khả năng phân huỷ tinh bột và casein để nghiên cứu kết quả được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1

Hoạt độ enzym phân giải tinh bột và casein của các chủng vi khuẩn đã phân lập

Ký hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải (D-d), mm		Ký hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải (D-d), mm	
	Tinh bột	Casein		Tinh bột	Casein
HP-1	20	12	NB-11	22,5	16
HP-2	22	14	NB-12	18,5	10
NB-3	24	18	CHP-13	15	12,5
<b>NB-4</b>	<b>22</b>	<b>24</b>	CHP-14	17	14
CHP-5	25	18	CHP-15	12	13
<b>CHP-6</b>	<b>28</b>	<b>27</b>	CHP-16	20	14,5
NB-7	19	10	HP-17	11	21,5
NB-8	20	11,5	HP-18	19	12
NB-9	22	12	HP-19	17	14
NB-10	21	15	HP-20	14	12



Hình 1. Hoạt độ amilaza và proteinaza ngoại bào của các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn  
1A. Phân giải tinh bột; 1B. Phân giải casein

Từ kết quả ở bảng 1 và hình 1, chúng tôi chọn 2 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải mạnh tinh bột và casein, chúng được ký hiệu là: NB-4 và CHP-6 để nghiên cứu tiếp.

## 2. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến hoạt độ amilaza và proteinaza ngoại bào

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối lên sinh tổng hợp enzym, chúng tôi sử dụng môi trường tinh bột và casein lỏng có bổ sung NaCl với các nồng độ khác nhau, nuôi lắc 200

vòng/phút trong 48 giờ ở 30°C, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Kết quả xác định enzym sau 48 h nuôi cấy, ở 30°C trong bảng 2 cho thấy nồng độ NaCl có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh enzym ngoại bào của hai chủng vi khuẩn đã tuyển chọn. Hai chủng vi khuẩn đã tuyển chọn sinh proteinaza ngoại bào cao nhất trong môi trường có 2% NaCl và sinh amilaza ngoại bào cao nhất trong môi trường có 5% NaCl.

Bảng 2

Ảnh hưởng của nồng độ NaCl lên sinh enzym ngoại bào của 2 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Loại Enzym	Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d, mm)				
		0% NaCl	2% NaCl	5% NaCl	7% NaCl	10% NaCl
Amylaza	NB-4	8,0	16,5	<b>18</b>	14	12
	CHP-6	7,0	18	<b>22</b>	17	14
Proteinaza	NB-4	6,0	<b>15,0</b>	13,0	9,5	8,0
	CHP-6	7,0	<b>20</b>	14,5	13,5	8,5

## 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt độ amilaza và proteinaza ngoại bào của hai chủng vi khuẩn đã tuyển chọn

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp amilaza và proteinaza của chủng vi khuẩn NB-4 và CHP-6 chúng tôi

tiến hành nuôi lắc hai chủng này trong các bình tam giác 250 ml có chứa 50 ml môi trường tinh bột + 5% NaCl hoặc môi trường casein + 2% NaCl, trên máy lắc tròn 200 vòng/phút trong 48 giờ, ở các thang nhiệt độ khác nhau, kết quả được trình bày ở bảng 3 và bảng 4.

Bảng 3

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt độ phân giải tinh bột của 2 chủng vi khuẩn đã tuyển chọn

Chủng nghiên cứu	Đường kính vòng phân giải tinh bột (D-d, mm), sau 48 giờ nuôi cấy					
	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
NB4	10	18	23	22	13	4
CHP-6	11	20	28	25	14	5

Bảng 4

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt độ phân giải casein của 2 chủng vi khuẩn đã tuyển chọn

Chủng nghiên cứu	Đường kính vòng phân giải casein (D-d, mm), sau 48 giờ nuôi cấy					
	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
NB4	8	17,5	25	22	11	0
CHP-6	9,5	19,5	27	24	12,5	0

Từ kết quả ở bảng 3 và bảng 4 cho thấy, hai chủng vi khuẩn có thể sinh amilaza và proteinaza ngoại bào trong dải nhiệt độ từ 20°C đến 40°C, nhưng nhiệt độ thích hợp nhất cho

sinh tổng hợp amilaza là từ 30 - 35°C. Còn khi nhiệt độ thấp hơn 20°C hoặc cao hơn 40°C thì chúng sinh các enzym này rất yếu.

**4. Ảnh hưởng của nguồn cacbon trong môi trường nuôi hai chủng vi khuẩn đã tuyển chọn đến hoạt độ enzym ngoại bào chúng**

Dinh dưỡng vi sinh vật là quá trình chuyển hoá các nguồn cacbon thành những phân hữu cơ của tế bào vi sinh vật. Giá trị dinh dưỡng và khả năng hấp thụ các nguồn cacbon phụ thuộc vào thành phần hoá học, cấu trúc phân tử của cacbon và đặc điểm sinh lý của các chủng vi sinh vật. Nhiều chất hữu cơ hoặc không tan trong nước

hoặc do trọng lượng phân tử lớn nên không thể thâm nhập được vào tế bào vi sinh vật (xenluloza, tinh bột, pectin, protein, □). Muốn hấp thụ được các chất này vi sinh vật phải tiết ra các enzym để thuỷ phân chúng thành những phân nhỏ hơn. Mỗi loại vi sinh vật thường phát triển tốt trên một số nguồn cacbon nhất định. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt độ amilaza và proteinaza được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5

**Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt độ amilaza và proteinaza của 2 chủng vi khuẩn đã tuyển chọn**

Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng phân giải tinh bột (D-d, mm)				Đường kính vòng phân giải casein (D-d, mm)			
	Glucoza	Sacaroza	Lactoza	Tinh bột	Glucoza	Sacaroza	Lactoza	Tinh bột
NB-4	9,0	13,0	7,5	16,0	15,5	13,5	7,5	11,0
CHP-6	12,0	16,5	7,9	17,0	17,0	15,0	8,2	12,5

Kết quả ở bảng 5 cho thấy các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn sinh amilaza ngoại bào mạnh nhất trong môi trường nuôi cấy có nguồn cacbon là tinh bột. Còn trong môi trường có nguồn cacbon là glucoza thì chúng lại sinh proteinaza ngoại bào mạnh nhất.

**5. Ảnh hưởng của nguồn nitơ trong môi trường nuôi đến hoạt độ enzym ngoại bào của các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn**

Các nguồn nitơ cung cấp cho vi sinh vật nguyên liệu để hình thành nhóm amin (-NH<sub>2</sub>) và imin (-NH-) trong phân tử các aminoaxit, nucleotit, các bazơ dị vòng và các hợp chất hoá học khác có mặt trong nguyên sinh chất. Nguồn nitơ vi sinh vật dễ hấp thụ nhất là NH<sub>4</sub><sup>+</sup> và NH<sub>3</sub>. Chúng dễ dàng thâm nhập vào tế bào vi sinh vật và tạo nên một cách khá dễ dàng các nhóm amin

và imin. Có quan niệm cho rằng, một số vi khuẩn không có khả năng đồng hoá muối amon. Quan niệm này không đúng, vì tất cả các vi sinh vật đều có thể sử dụng muối amon. Nếu vi sinh vật không phát triển được trong môi trường chứa muối amon thì nguyên nhân là do độ chua sinh lí của các muối này: bởi vì, sau khi đồng hoá nhóm NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, trong môi trường sẽ còn lại các anion vô cơ (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, Cl<sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) vì thế mà pH của môi trường hạ xuống rất mạnh, làm ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Ngoài ra, nếu vi sinh vật không thể phát triển được trong môi trường có muối amon vô cơ là nguồn nitơ duy nhất, thường còn do các vi sinh vật này đòi hỏi một số axit amin có sẵn trong môi trường. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt độ amilaza và proteinaza của 2 chủng vi khuẩn tuyển chọn được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6

**Ảnh hưởng của nguồn nitơ trong môi trường nuôi đến hoạt độ amilaza và proteinaza ngoại bào của các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn**

Loại Enzym	Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng phân giải (D-d, mm), sau 48 giờ nuôi cấy, ở 30°C					
		Pepton	Cao thịt	Cao nấm men	Bột đậu tương	KNO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Amilaza	NB-4	17,5	<b>18,0</b>	17,0	18,0	13	0
	CHP-6	15,5	<b>17,5</b>	16,5	17,5	12	0
Proteinaza	NB-4	14,5	11,0	13,0	<b>19,5</b>	14	0
	CHP-6	16,0	10,0	12,5	<b>21,5</b>	14,5	0

Kết quả ở bảng 6 cho thấy các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn sinh amilaza ngoại bào cao trong môi trường có nguồn nitơ hữu cơ, chúng sinh amilaza ngoại bào yếu trong môi trường có bổ sung muối vô cơ KNO<sub>3</sub>. Chúng hầu như không phát triển và không sinh amilaza và proteinaza ngoại bào trong môi trường có muối (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Chúng sinh proteinaza ngoại bào tốt nhất trong môi trường có bột đậu tương hoặc pepton, điều này cho thấy proteinaza của 2 chủng vi khuẩn trên là enzym cảm ứng vì các phân tử protein trong bột đậu tương chưa được thủy phân, còn trong pepton protein cũng chưa bị thủy phân hoàn toàn thành các axit amin. Do vậy, đã kích thích quá trình sinh tổng hợp proteinaza của chúng.

### III. KẾT LUẬN

1. Hai chủng vi khuẩn NB-4 và CHP-6 được phân lập từ các mẫu bùn nuôi tôm có khả năng sinh enzym amilaza và proteinaza ngoại bào trong các môi trường có nồng độ NaCl từ 0%-10%. Nồng độ NaCl có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh enzym ngoại bào của hai chủng vi khuẩn đã tuyển chọn, chúng sinh tổng hợp proteinaza ngoại bào cao nhất trong môi trường có 2% NaCl, nhưng lại sinh tổng hợp amilaza ngoại bào cao nhất trong môi trường có 5% NaCl.

2. Hai chủng vi khuẩn đã tuyển chọn có thể sinh tổng hợp amilaza và proteinaza ngoại bào trong dải nhiệt độ phát triển từ 20°C đến 40°C, nhưng nhiệt độ thích hợp nhất là từ 30 - 35°C.

3. Hai chủng vi khuẩn tuyển chọn sinh tổng hợp amilaza ngoại bào mạnh nhất trong môi trường nuôi cấy có nguồn cacbon là tinh bột và sinh tổng hợp proteinaza ngoại bào mạnh nhất trong môi trường có nguồn cacbon là glucoza.

4. Các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn sinh tổng hợp amilaza ngoại bào cao trong môi

trường có các nguồn nitơ hữu cơ. Trong môi trường có các muối nitơ vô cơ chúng sinh tổng hợp các enzym này yếu, nhất là trong môi trường có nguồn nitơ là muối (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> thì hầu như chúng không sinh tổng hợp được các enzym trên. Hai chủng vi khuẩn tuyển chọn sinh tổng hợp proteinaza ngoại bào tốt nhất trong môi trường có bổ sung bột đậu tương hoặc pepton.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Lân Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Phùng Đức Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty**, 1976: Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học tập II, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật.
2. **Egorov N. X.**, 1983: Thực tập vi sinh vật học. Nxb. "MIR" Maxcova, Nxb. Đại học và Trung học chuyên nghiệp, Hà Nội.
3. **Trần Xuân Du**, 2003: Giải pháp môi trường nước nuôi trong chu trình nuôi tôm sạch, Báo cáo Hội thảo môi trường nuôi trồng thủy sản biển Việt nam, Nha Trang.
4. **Võ Thị Thứ, La Thị Nga, Trương Bá Hùng**, 2003: Nghiên cứu tạo chế phẩm Bioche và đánh giá tác dụng của chế phẩm đến môi trường nước nuôi tôm, cá: 119-121. Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật.
5. **Phan Viết Tùng**, 2003: Sử dụng chế phẩm vi sinh (probiotic) trong nuôi tôm sú thương phẩm, Báo cáo Hội thảo Môi trường nuôi trồng thủy sản ven biển Việt Nam, Nha Trang.
6. **Kalkani**, 2003: Probiotic: Their role in aquaculture, American standard products, Inc, Jan 10.
7. **Sambasivam S., Chandran R., Khan S. A.**, 2003.: Journal Environment Biology, 15.

# **BIOSYNTHESIS AMYLASE AND PROTEINASE OF SOME HALOPHILIC BACTERIAL STRAIN FROM SHRIMP CULTURE PONDS**

**PHAN THI TUYET MINH, TANG THI CHINH**

## **SUMMARY**

By the screening sediments of shrimp culture pond, we selected two bacterial strains NB4 and CHP6, these bacterial strains could biosynthesize enzymes amylase and proteinase. They could grow and produced amylase and proteinase in the media with NaCl concentration ranged from 0% to 10%. The optimum sodium concentration of the media for their production of amylase was 5% NaCl and for their production of proteinase was 2% NaCl. These bacterial strains were halophilic microorganisms. These bacterial could grow and biosynthesize amylase and proteinase in the media with a range of incubation temperature from 20°C to 40°C, but most suitable temperature for their production of these enzymes were 30°C - 35°C. The optimum pH for biosyntheses amylase and proteinase were 6.5 - 8.5.

The highest biosynthesis of amylase occurred in media used starch as carbon source and beef extract as nitrogen source. The highest biosynthesis of proteinase in media contained glucose and soybean powder. The media containing organic nitrogen sources were suitable for the biosyntheses of mentioned above enzymes. The media containing inorganic nitrogen likes nitrogen source were very fragile for their production of amylase and proteinase. These strains could not grown and produced amylase and proteinase in the media containing ammonium sulfate as nitrogen source.

*Ngày nhận bài: 13-4-2006*