

PHÂN LẬP CHỦNG VI KHUẨN *HALOMONAS* SP. CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP PYRUVATE TỪ RỪNG NGẬP MẶN TỈNH KHÁNH HÒA

Ngô Thị Hoài Thu¹ ✉, Hoàng Thị Lan Anh¹, Hoàng Thị Minh Hiền¹, Lưu Thị Tâm¹, Lê Thị Thom¹, Nguyễn Cẩm Hà¹, Yoshikazu Kawata², Đặng Diễm Hồng¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nhthu@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 13.12.2017

Ngày nhận đăng: 02.7.2018

TÓM TẮT

Acid pyruvic (pyruvate) là một chất trung gian quan trọng của sinh vật. Chúng được sử dụng rộng rãi trong sinh tổng hợp các hợp chất có giá trị và phụ gia thực phẩm. Sản xuất pyruvate bằng con đường công nghệ sinh học đang là một lựa chọn tiềm năng nhằm thay thế phương pháp hóa học. Từ 27 mẫu đất, bùn của rừng ngập mặn thuộc vịnh Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa, chúng tôi đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn ưa mặn thuộc chi *Halomonas*. Trong số đó, 9 chủng có khả năng tổng hợp và tiết pyruvate ra môi trường nuôi cấy. Chủng MC8 có hàm lượng pyruvate đạt cao nhất là $0,110 \pm 0,015$ g/L. MC8 là tế bào Gram âm, có dạng hình que ngắn, chiều rộng $1,56 \pm 0,07$ μm và chiều dài $5,09 \pm 0,38$ μm , không có roi và không chuyển động. Chủng MC8 có hoạt tính oxidase, catalase, có khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite và nitrogen, có thể sinh trưởng trên môi trường có nồng độ muối dao động từ 0,5 - 20% (w/v), với dải nhiệt độ từ 20 - 45°C, pH = 5 - 12 và thành phần acid béo chủ yếu là C16:0; C18:1 ω 7c và C12:0 3 OH. Phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng MC8 có độ tương đồng cao nhất với loài *H. flava* (98,5%). Dựa trên các đặc điểm về hình thái, sinh lý, sinh hóa và so sánh trình tự gen 16S rRNA, chủng MC8 được định tên là *Halomonas flava*. Đây là nghiên cứu đầu tiên của Việt Nam về các chủng vi khuẩn ưa mặn có khả năng tổng hợp pyruvate và cung cấp những thông tin quan trọng cho định hướng sản xuất pyruvate bằng các chủng vi khuẩn *Halomonas* có nguồn gốc từ Việt Nam.

Từ khóa: *Halomonas*, pyruvate, rừng ngập mặn, vi khuẩn ưa mặn

MỞ ĐẦU

Acid pyruvic (pyruvate) là một acid α - oxocarboxylic, đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa năng lượng của cơ thể sống. Trong ngành công nghiệp dược phẩm, pyruvate được sử dụng như là nguồn nguyên liệu ban đầu cho sinh tổng hợp L - tryptophan, L - tyrosine và alanine (Uchio *et al.*, 1976). Pyruvate cũng được dùng để sản xuất thuốc bảo vệ thực vật, polymers, mỹ phẩm và phụ gia thực phẩm. Bên cạnh đó, pyruvate còn có tác dụng chống oxy hóa, giảm cân, tăng cường sức bền của cơ thể, giảm cholesterol, giảm tổn thương do thiếu oxy và sự hình thành gốc tự do (DeBoer *et al.*, 1993; Stanko *et al.*, 1994; Borle and Stanko, 1996). Chính vì vậy, nhu cầu thương mại hóa đối với pyruvate đang ngày càng được mở rộng.

Các chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Van maris *et al.*, 2004), *Torulopsis glabrata* (Liu *et al.*, 2007), vi khuẩn *Escherichia coli* (Causey *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2008) và *Corynebacterium glutamicum* (Wieschalka *et al.*, 2012) được thông báo là có khả năng sản xuất pyruvate theo con đường công nghệ sinh học. Tuy nhiên, hàm lượng pyruvate ở các chủng tự nhiên này khá thấp, dao động trong khoảng 0,41 đến 23 g/L. Gần đây, một số chủng nấm men, *E. coli* đột biến và tái tổ hợp đã được ứng dụng để nâng cao hiệu suất tổng hợp pyruvate. Theo công bố của Liu *et al.*, (2004), chủng *T. glabrata* RS23 đột biến có khả năng sản xuất pyruvate với hàm lượng và năng suất đạt tương ứng 94,3 g/L và 1,18 g/L/h (Liu *et al.*, 2004). Chủng *E. coli* ALS1059 và *S. cerevisiae* TAM đột biến với hình thức nuôi theo kiểu fed - batch đã nâng được hàm lượng pyruvate lên 90 và 135,0 g/L, tương ứng (van Maris *et al.*,

2004, Zhu *et al.*, 2008). Mặc dù, các chủng vi sinh vật đột biến hoặc tái tổ hợp có thể cho hàm lượng pyruvate cao nhưng nhu cầu dinh dưỡng trong từng giai đoạn và yêu cầu về điều kiện nuôi cấy khá nghiêm ngặt, chi phí đầu tư ban đầu cho hệ thống nuôi tốn kém. Chính vì vậy, việc tìm kiếm nguồn vi sinh vật tự nhiên 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.

Gần đây, *Halomonas* - một trong các chi vi khuẩn lớn nhất của họ Halomonadaceae, được phát hiện là nguồn tiềm năng lớn cho khai thác và sản xuất pyruvate. Công bố của Kawata *et al.*, (2016) đã cho thấy chủng *Halomonas* sp. KM1 tự nhiên có khả năng tiết pyruvate ra môi trường lên đến 63,3 g/L với năng suất là 1,23 g/L/h khi nuôi cấy hiếu khí 48 h trong môi trường giàu NaNO_3 và glucose mà không cần khử trùng. Hàm lượng pyruvate trong chủng tự nhiên này cao tương đương với các chủng vi khuẩn tái tổ hợp hoặc nấm men bị đột biến dùng trong sản xuất công nghiệp. Ngoài ra, chúng còn có những ưu thế là không bị tạp nhiễm trong quá trình nuôi cấy và có khả năng sử dụng nồng độ cơ chất cao.

Việt Nam có nhiều diện tích ngập mặn dọc theo chiều dài đất nước với nguồn sinh vật rất phong phú và đa dạng trong đó có nhóm vi sinh vật ưa mặn. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả liên quan đến việc phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn thuộc chi *Halomonas* để sản xuất pyruvate từ vùng rừng ngập mặn của tỉnh Khánh Hòa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các mẫu bùn và đất được thu ở rừng ngập mặn thuộc đầm Thủy Triều, Mỹ Ca thuộc vịnh Cam Ranh và xã Ninh Ích, huyện Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa. Thời gian thu mẫu là tháng 3/2016 với nhiệt độ khoảng 23 - 26°C, pH = 7 - 8 và nồng độ muối dao động từ 20 - 30‰.

Môi trường phân lập: Môi trường GTY có bổ sung 5% NaCl theo mô tả của Tang *et al.*, (2010) đã được sử dụng. Các chủng vi khuẩn sau khi được làm sạch sẽ được giữ giống và tiến hành thí nghiệm trên môi trường GTY có 5% NaCl, ở 37 °C và pH = 7.

Môi trường Marine Broth 2216 (Disco, Nhật Bản) có bổ sung thêm 3% glucose được sử dụng để

sàng lọc nhanh các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp pyruvate.

Phương pháp

Phương pháp phân lập

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. 0,1 g mẫu bùn hoặc đất được hòa trong 0,9 mL nước muối sinh lý, trộn đều sau đó pha loãng ở các nồng độ 10^1 , 10^2 ... 10^{10} bằng môi trường GTY lỏng có chứa 5% NaCl. 3 mL dịch nuôi có các nồng độ pha loãng khác nhau được bổ sung vào trong đĩa nuôi cấy 24 giếng và nuôi tĩnh ở 37°C trong 5 - 7 ngày. Khi quan sát thấy dịch nuôi cấy chuyển sang màu trắng hoặc màu vàng, cấy trải 50 μL dịch nuôi cấy trên đĩa petri chứa môi trường thạch GTY có 5 % NaCl. Sau đó, các khuẩn lạc được cấy riêng rẽ trên đĩa thạch theo phương pháp cấy rìa và làm tiêu bản quan sát để kiểm tra sự đồng nhất của khuẩn lạc đã phân lập.

Xác định một số đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của các chủng lựa chọn

Hình thái của chủng đã phân lập được xác định dựa theo công bố của Vreeland *et al.*, (1980). Từng khuẩn lạc riêng rẽ được nuôi cấy trên môi trường GTY có 5% NaCl ở 37°C, pH = 7 và được lấy mẫu ở các thời điểm sau 6, 12, 24, 48 và 72 h. Hình thái tế bào và khả năng di chuyển của chủng này được quan sát dưới kính hiển vi quang học (Olympus CX21, Nhật Bản) với độ phóng đại 1.000 X và dưới kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope - SEM) Hitachi S - 4800 (Nhật Bản) tại Viện Vệ sinh dịch tễ (sau 48 h nuôi cấy).

Nhuộm Gram âm, Gram dương: Từng khuẩn lạc riêng rẽ được nuôi cấy qua đêm trên môi trường GTY có 5% NaCl. Sau 24 h nuôi cấy, ly tâm thu sinh khối tế bào và nhuộm Gram theo kit nhuộm Gram (Công ty Nam Khoa, Việt Nam), sau đó quan sát trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1.000 lần.

Hoạt tính oxidase được xác định dựa trên khả năng sinh enzyme cytochrome oxidase của vi khuẩn nhờ sử dụng kit Bactident ® Oxidase (Merck, Mỹ). Hoạt tính catalase được xác định bằng cách nhỏ 1 - 2 giọt 3% H_2O_2 lên dịch nuôi cấy vi khuẩn qua đêm, quan sát thấy có hiện tượng sủi bọt chứng tỏ chủng vi khuẩn đó có hoạt tính catalase.

Xác định dải nồng độ muối, nhiệt độ và pH thích hợp cho sinh trưởng của các chủng đã phân lập: Thí nghiệm được tiến hành với dải nồng độ muối từ 0 -

30% (w/v), pH = 5 - 13, nhiệt độ từ 20 - 45°C trên môi trường GTY, ở 37°C trong 2 ngày và quan sát khả năng mọc của các khuẩn lạc ở trên các điều kiện nuôi cấy khác nhau.

Xác định khả năng kháng kháng sinh: các kháng sinh như penicillin G (6 µg), ampicillin (15 µg), neomycin (30 µg) và cecephalexin (30 µg) được sử dụng để kiểm tra khả năng kháng kháng sinh của mẫu được lựa chọn.

Các đặc điểm sinh hóa được xác định bằng kit chuẩn API 20NE (bioMerieux, Pháp) và phân tích bằng phần mềm Apiweb hoặc bảng đối chiếu (API 20NE profile index) để xác định tên chi/loài của mẫu được chọn.

Phân tích thành phần acid béo bão hòa và không bão hòa đa nối đôi của mẫu lựa chọn được phân tích theo mô tả của của Đặng Diễm Hồng *et al.*, (2007).

Định tên sinh học phân tử của chủng tiềm năng

DNA tổng số của chủng vi khuẩn tiềm năng được tách chiết như đã mô tả (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2002). Đoạn 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'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3' và 1525 R: 5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'. Sản phẩm PCR có kích thước dự kiến là 1,6 kb.

Phản ứng PCR được thực hiện với 20 µL hỗn hợp phản ứng chứa 2 µL DNA khuôn, 2 µL Green Taq, 1,5 µL dNTP, 0,25 µL MgCl₂ và 1 µL mồi mỗi loại, 0,5 µL Taq polymerase, 11,75 µL H₂O. Chu trình nhiệt: 94°C - 3', 40 X (94°C - 30'', 58°C - 1', 72°C - 1') và 72°C - 5'. Sau khi chạy điện di để kiểm tra trên gel 0,8% agarose, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Centrifuge Kit (Promega, Mỹ) được đọc trình tự bằng máy ABI

PRISM^(R) 3100 (Avant Genetic Analyzer, Mỹ).

Các chương trình phần mềm chuyên dụng như DNA Club, ClustalX 1.83, DNASTAR, MEGA7 và BLAST được sử dụng cho 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

Các chủng vi khuẩn đã được phân lập và làm sạch được nuôi cấy trong ống nghiệm có chứa 5 mL môi trường Marine Broth lỏng có bổ sung 3% glucose, lắc ở 200 rpm trong 48 h. Ly tâm thu dịch ở 12.000 rpm trong 5 min. Hàm lượng pyruvate trong môi trường nuôi cấy được xác định theo phương pháp sắc kí lỏng cao áp (Aminex HPX-87H; Bio-Rad, Nhật Bản) với chất chuẩn pyruvate (Wako, Nhật Bản).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập các chủng vi khuẩn ưa muối

Dựa theo khóa phân loại của Vreeland *et al.*, (1980), chúng tôi đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn thuộc chi *Halomonas* từ các mẫu bùn và đất được thu ở rừng ngập mặn ở Vịnh Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa với những đặc điểm như: Gram âm, tế bào hình que, có khả năng chuyển động hoặc không chuyển động, khuẩn lạc màu vàng hoặc màu trắng đục... Mười chủng này, sau đó, được nuôi trên môi trường Marine Broth có bổ sung thêm 3% glucose và phân tích hàm lượng pyruvate sau 48 h nuôi cấy. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Khả năng tổng hợp pyruvate của 10 chủng vi khuẩn phân lập được.

STT	Ký hiệu mẫu	Hàm lượng pyruvate (g/L)	STT	Ký hiệu mẫu	Hàm lượng pyruvate (g/L)
1	NI2	0,050 ± 0,002	6	MC5	0,070 ± 0,008
2	NI3	0,080 ± 0,030	7	MC6	0,010 ± 0,009
3	NI4	0,020 ± 0,050	8	MC7	0,090 ± 0,009
4	NI5	0,000 ± 0,000	9	MC8	0,110 ± 0,015
5	NI6	0,030 ± 0,008	10	MC10	0,070 ± 0,012

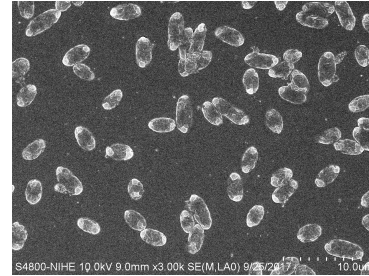
Ghi chú: NI: Ninh Ích; MC: Mỹ Ca.

Glucose là cơ chất phổ biến được hầu hết các vi sinh vật sử dụng trong quá trình sinh trưởng để tích lũy pyruvate (Liu *et al.*, 2001). Yokota *et al.*, (1994)

đã chỉ ra rằng có mối liên hệ giữa hàm lượng pyruvate tích lũy và nồng độ cơ chất được bổ sung. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn thuộc chi *Halomonas*

có khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite và nitrogen (Vreeland *et al.*, 1980). Do vậy, hàm lượng pyruvate tích lũy sẽ liên quan rất chặt chẽ đến nồng độ của glucose và nitrogen được bổ sung trong môi trường. Kawata *et al.*, (2016) cho thấy chủng KM - 1 tăng khả năng tích lũy pyruvate từ 17,6 g/L lên tới 63,3 g/L sau 48 h nuôi với hàm lượng glucose và NaNO₃ được bổ sung tương ứng là 20% (w/v) và 30 g/L. Kết quả trình bày trong Bảng 1 cho thấy sau 48 h lên men trong môi trường Marine Broth có bổ sung 3% glucose, có 9/10 chủng vi khuẩn phân lập được có khả năng tổng hợp pyruvate với hàm lượng dao động từ 0,010 ± 0,009 đến 0,110 ± 0,015 g/L, trong đó cao nhất là chủng MC8 (0,11 g/L), kết quả này thấp hơn so với công bố của Kawata *et al.*, (2016). Vì vậy, để nâng cao hàm lượng pyruvate tổng hợp trong các cơ thể vi sinh vật cần phải tối ưu một số điều kiện nuôi cấy như thay đổi nồng độ glucose, NaNO₃, pH của môi trường nuôi, hình thức nuôi. Kết quả của chúng tôi thu được trong nghiên cứu này mới chỉ là bước đầu để sàng lọc sơ bộ các chủng vi khuẩn phân lập được có khả năng sinh tổng hợp

pyruvate. Do vậy chúng tôi đã lựa chọn chủng MC8 để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của chủng MC8 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Đặc điểm sinh học của chủng MC8

Tế bào của chủng MC8 được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) với độ phóng đại 3.000 lần (Hình 1). Kết quả thu được trong Hình 1 cho thấy tế bào có dạng hình que ngắn, chiều rộng 1,56 ± 0,07 μm và chiều dài 5,09 ± 0,38 μm, không có roi và không chuyển động.

Bảng 2. So sánh các đặc điểm của chủng MC8 với loài *H. flava* (Chen *et al.*, 2011).

Đặc điểm	Chủng MC8	<i>H. flava</i>
Hình thái	Que ngắn	Que ngắn
Kích thước (μm)	1,49 - 1,63 x 4,69 - 5,47	0,4 - 0,5 x 1,7 - 2,4
Chuyển động	Không chuyển động	Không chuyển động
Màu sắc khuẩn lạc	vàng	vàng
Hoạt tính oxidase	+	+
Hoạt tính catalase	+	+
Nồng độ muối (0 - 23 % w/v)	0,5 - 20	0,5 - 23
Dải pH	5 - 12	6 - 9
Dải nhiệt độ (°C)	20 - 40	4 - 45
Khử nitrate	+	+
Khử nitrite thành nitrogen	+	+
Lên men D - glucose	+	+
Thủy phân gelatin	+	+
Hoạt tính urea	+	+
Khả năng đồng hóa		
D - glucose	+	+
L - arabinose	-	-
D - mannose	-	-
D - manitol	-	-
Khả năng kháng thuốc kháng sinh		
Penicillin G (6 μg)	+	+
Ampicilin (15 μg)	+	-
Neomycin (30 μg)	-	-
Cephalexin (30 μg)	-	-

Ghi chú: + dương tính; - âm tính.

Các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng MC8 được trình bày trong bảng 2. Kết quả cho thấy chủng MC8 có hoạt tính oxidase, catalase, có khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite và nitrogen, có thể sinh trưởng trên môi trường có nồng độ muối dao động từ 0,5 - 20% (w/v), với dải nhiệt độ từ 20 - 45°C và pH = 5 - 12. Chủng MC8 có khả năng sử dụng glucose là nguồn carbon, có hoạt tính urea và thủy phân gelatin. Chúng có khả năng đồng hóa D - glucose nhưng lại không có khả năng đồng hóa L - arabinose, D - mannose và D - manitol. Ngoài ra, chủng MC8 có khả năng kháng kháng sinh penicillin G (6 µg) và ampicilin (15 µg).

Khi so sánh các đặc điểm của chủng MC8 với loài *H. flava*, kết quả cho thấy rằng chúng có nhiều đặc điểm tương đồng về hình thái và kích thước của tế bào, màu sắc của khuẩn lạc, điều kiện nuôi cấy... (Chen *et al.*, 2011). Tuy nhiên, chủng MC8 cũng lại có một số điểm khác biệt như khoảng nhiệt độ có thể sinh trưởng được (20 - 40°C) thấp hơn so với loài *H. flava* (4°C - 45°C) (Chen *et al.*, 2011). Ngoài ra, chủng MC8 có khả năng thích nghi với dải pH = 5 - 12, rộng hơn so với *H. flava* (6 - 9). Điều này có thể sẽ giúp cho chủng MC8 có ưu thế nổi trội hơn khi được triển khai nuôi ở quy mô lớn, hạn chế giảm thiểu được lây nhiễm trong quá trình nuôi cấy.

Phân tích thành phần acid béo bão hòa và không bão hòa đa nối đôi

Thành phần acid béo là một trong những đặc điểm chìa khóa góp phần định loại vi khuẩn thuộc chi *Halomonas* (Franzmann, Tindall, 1990; Okamoto *et al.*, 1993; Dobson, Franzmann, 1996). Kết quả phân tích trong bảng 3 cho thấy các acid béo chiếm ưu thế ở chủng MC8 là C16:0; C18:1ω7c và C12:0 3 OH. Hàm lượng C16:0, C18:1ω7c và C12:0 3 OH của chủng MC8 lần lượt là 22,5, 46,8 và 5,7 % so với acid béo tổng số (TFA-Total fatty acids). Kết quả này tương đồng với thành phần acid béo của loài *H. flava* đã được công bố (Chen *et al.*, 2011). Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái và thành phần acid béo, chủng MC8 có thể thuộc loài *H. flava*.

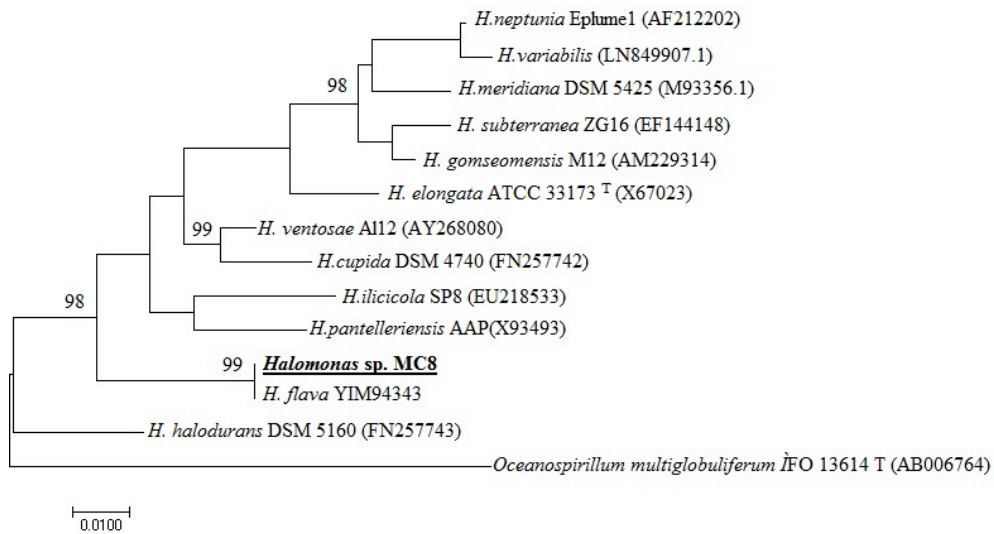
Bảng 3. Thành phần acid béo của chủng MC8 (% so với TFA).

Thành phần acid béo	Hàm lượng (% so với TFA)
C10:0	2,80
C12:0	3,90
C13:0	0,10
C14:0	0,15
C16:0	22,50
C17:0	0,10
C17:0 cyclo	-
C18:0	0,10
C19:0 cyclo ω8c	-
C16:1ω5c	0,10
C17:1ω6c	0,10
C17:1ω8c	0,10
C18:1ω5c	-
C18:1ω7c	46,80
C10:0 3OH	0,10
C12:0 2OH	-
C12:0 3OH	5,70
C12:1 3OH	-

Ghi chú: - : không phát hiện.

Định tên khoa học chủng MC8 dựa trên trình tự gen 16S rRNA

Dựa trên các đặc điểm hình thái tế bào được quan sát dưới kính SEM, đặc điểm sinh lý, sinh hóa và thành phần acid béo bão hòa và không bão hòa đa nối đôi, chúng tôi đã sơ bộ kết luận chủng MC8 thuộc loài *Halomonas flava*. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác chủng MC8 thuộc chi *Halomonas* hay không chúng tôi đã tiến hành đọc và so sánh trình tự của gen 16S rRNA của chủng MC8 với các loài thuộc chi *Halomonas*. Đoạn trình tự gen 16S rRNA của mẫu MC8 được khuếch đại bằng cặp mồi 27 F - 1525 R có kích thước 1.430 bp. So sánh trình tự gen 16S rRNA giữa các loài thuộc chi *Halomonas*, chúng tôi nhận thấy tỉ lệ phần trăm tương đồng giữa các loài thuộc chi này dao động từ 96,6% đến 98,5%,. Trong đó, chủng MC8 có độ tương đồng cao nhất đối với loài *H. flava* (mã số đăng ký YIM 94343) là 98,5%, tiếp theo là loài *H. pantelleriensis* AAP (X93493) là 97,8%. Trên cây phát sinh chủng loại (Hình 2) cho thấy chủng MC8 có mối quan hệ rất gần gũi với các loài thuộc chi *Halomonas*. Dựa vào các đặc điểm hình thái, thành phần acid béo và so sánh trình tự của gen 16S rRNA, chúng tôi kết luận chủng MC8 thuộc về loài *H. flava*.



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại của chủng MC8 so sánh với các loài thuộc chi *Halomonas*.

KẾT LUẬN

Mười chủng *Halomonas* đã được phân lập từ các mẫu bùn và đất ở rừng ngập mặn thuộc vịnh Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa. Trong đó, 9/10 chủng vi khuẩn đã được xác định có khả năng sinh tổng hợp và tiết ra môi trường acid pyruvic. Chủng MC8 là chủng tiềm năng cho sinh tổng hợp acid pyruvic với hàm lượng đạt $0,110 \pm 0,015$ g/L. Kết hợp các đặc điểm sinh học và so sánh trình tự gen 16S rRNA, chủng MC8 phân lập ở vùng rừng ngập mặn Mỹ Ca, Khánh Hòa được xác định thuộc loài *Halomonas flava*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài khởi nghiệp “Phân lập và sàng lọc một số chủng vi khuẩn *Halomonas* spp. có tiềm năng sinh tổng hợp axit pyruvic” 2016 - 2017, mã số CSK16-01 do TS. Ngô Thị Hoài Thu làm chủ nhiệm. Chúng tôi xin cảm ơn Phòng thí nghiệm Trọng Điểm Công nghệ gen của Viện Công nghệ sinh học đã cho phép sử dụng một số máy móc phục vụ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Borle A, Stanko RT (1996) Pyruvate reduces anoxic injury and free radical formation in perfused rat hepatocytes. *J Appl Physiol* 270: 535–540.

Casey TB, Shanmugam KT, Yomano LP, Ingram LO (2004) Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *PNAS* 101 (8): 2235–2240.

Chen C, Shi R, Liu BB, Zhang YJ, Sun HZ, Li CT, Tang SK, Zhang LL, Li WJ (2011) *Halomonas qijiaojingensis* sp. nov. and *Halomonas flava* sp. nov., two moderately halophilic bacteria isolated from a salt lake. *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 365–373.

Dobson SJ, Franzmann PD (1996) Unification of the genera *Deleya* (Baumann *et al.*, 1983), *Halomonas* (Vreeland *et al.*, 1980) and *Halovibrio* (Fendrich, 1988) and the species *Paracoccus denitrificans* (Robinson and Gibbons, 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacterin* the family Halomonadaceae. *Int J Syst Bacteriol* 46: 550–558.

DeBoer LWV, Bekx PA, Han L, Steinke L (1993) Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation. *J Appl Physiol* 265: 1571–1576.

Franzmann PD, Tindall BJ (1990) A chemotaxonomic study of members of the family Halomonadaceae. *Appl Microbiol* 13: 142–147.

Đặng Diễm Hồng, Hoàng Thị Minh Hiền, Phạm Ngọc Sơn, Nguyễn Đức Bách, Nguyễn Văn Đồng (2002) So sánh trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 của một số loài tảo Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 40: 161–167.

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.

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, 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.

Liu LM, Li Y, Li HZ, Chen J (2004) Manipulating the pyruvate dehydrogenase by pass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production. *Lett Appl Microbiol* 39(2): 199–206.

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.

Okamoto T, Taguchi H, Nakamura K, Ikenaga H, Kuraishi H, Yamasato K (1993) *Zymobacterpalmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Arch Microbiol* 160: 333–337.

Stanko RT, Reynolds HR, Hoyson R, Janosky JE, Wolf R (1994) Pyruvate supplementation of a low-cholesterol, low-fat diet: effects on plasma lipid concentrations and body composition in hyperlipidemic patients. *Am J Clin Nutr* 59: 423–427.

Tang SK, Wang Y, Lee JC, Lou K, Park DJ, Kim CJ, Li WJ (2010) *Georgenia halophila* sp. nov., a novel halophilic actinobacterium isolated from a salt lake in China. *Int J*

Syst Evol Microbiol 60: 1317–1321.

Uchio R, Kikuchi K, Enei H, Hirose Y (1976) Process for producing pyruvic acid by fermentation. *US Patent* 3993543.

Van Maris AJ, Geertman JM, Vermeulen A, Groothuizen MK, Winkler AA, Piper MD, van Dijken JP, Pronk JT (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.

Vreeland RH, Litchfield CD, Martin's EL, Elliot E (1980) *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30 (2): 485–495.

Wieschalka S, Blombach B, Eikmanns BJ (2012) Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. *Appl Microbiol Biotechnol* 94: 449–459.

Yokota A, Shimizu H, Terasawa Y, Takaoka N (1994) Pyruvic acid production by a lipoic acid auxotroph of *Escherichia coli* W1485. *Appl Microbiol Biotechnol* 41: 638–643

Zhu Y, Eiteman MA, Altman R, Altman E (2008) High glycolytic flux improves pyruvate production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 6649–6655.

ISOLATION OF PYRUVIC ACID PRODUCING *HALOMOMAS* SP. BACTERIAL STRAIN FROM MANGROVE FOREST OF KHANH HOA PROVINCE

Ngo Thi Hoai Thu¹, Hoang Thi Lan Anh¹, Hoang Thi Minh Hien¹, Luu Thi Tam¹, Le Thi Thom¹, Nguyen Cam Ha¹, Yoshikazu Kawata², Dang Diem Hong¹

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan

SUMMARY

Pyruvic acid (pyruvate) is a central intermediate in carbon and energy metabolism in all organisms. It is widely used in the industrial biosynthesis of high - value compounds and food additives. Biotechnological pyruvate production has attracted attention as a potential alternative method of pyruvate synthesis. From 27 soil and mud samples collected from mangrove forests of Cam Ranh, Khanh Hoa province, we isolated 10 bacterial strains belonging to *Halomonas* genus. Among them, 9 strains were able to synthesis and secreted pyruvate in the culture medium. The maximal pyruvate production was in MC8 strain with value of 0.110 ± 0.015 g/L. MC8 strain was Gram-negative, short rod-shaped, $1,56 \pm 0,07$ in width, $5,09 \pm 0,38$ μm in length, non-flagella and nonmotile. MC8 strain was positive for oxidase and catalase activities and reduction of nitrate to nitrite and nitrogen. Cells were able to growth at salt concentrations of from 0.5 to 20%, temperature ranging from 20 to 45°C and pH ranging from 5 to 12. The major fatty acids of MC8 biomass were C16:0; C18:1 ω 7c và C12:0 3OH. Phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequencing showed that MC8 strain possessed the highest similarity of 98.5% to the strain *Halomonas flava*. Based on morphological, biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequencing, MC8 strain was identified as *H. flava*. This is the first study of Halophilic bacteria which is capable of pyruvate synthesis in Vietnam. Thus, these obtained results provided important insights into the production of pyruvate using *Halomonas* strains.

Keywords: *Halomonas*, halophiles, mangrove forest, pyruvate