

P-HP08: PHÂN LẬP VI KHUẨN *BACILLUS* SP. TB1 TỪ NƯỚC THẢI THỦY SẢN VÀ TẠO DÒNG GEN MÃ HÓA CHITINASE

Vũ Đức Hoàng¹, Nguyễn Đức Huy², Trịnh Thị Phương Thảo^{2*},
Lê Thị Kim Thoa², Lê Vũ Khánh Trang¹, Trương Thị Phương Lan³

¹ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

² Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

³ Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

TÓM TẮT

Chitinase là enzyme thuộc nhóm glycosyl hydrolase xúc tác thủy phân liên kết β -(1,4)-glycosyl của chitin. Chitinase được thu nhận chủ yếu từ vi khuẩn, đặc biệt *Bacillus* sp. được quan tâm nghiên cứu nhiều nhất vì chitinase từ *Bacillus* sp. có hoạt tính cao. Chitinase được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp, công nghiệp, y học và xử lý nước thải... Tuy nhiên, các chủng tự nhiên thường tạo ra chitinase với hàm lượng thấp. Công nghệ protein tái tổ hợp giúp nâng cao hiệu quả của quá trình sinh tổng hợp, tinh sạch chitinase hơn enzyme tự nhiên. Trong nghiên cứu này, từ mẫu nước thải thủy sản đã phân lập được 7 chủng *Bacillus*. Trong đó, có 4 chủng sản xuất chitinase là TB1, TB3, HV1 và HV2 với đường kính vòng phân giải theo tuần tự là 13 mm, 4 mm, 3 mm và 4 mm. Kết quả phân tích trình tự 16S rRNA chứng minh chủng TB1 thuộc chi *Bacillus* và được đặt tên là *Bacillus* sp. TB1, trình tự 16S rRNA của chủng *Bacillus* sp. TB1 được đăng ký trên ngân hàng GenBank với mã số MT750324. Gen mã hóa chitinase được khuếch đại, gắn vào vector pGEM®-T Easy và biến nạp vào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Kết quả giải trình tự gen mã hóa chitinase cho thấy gen có chiều dài 2025 bp và được đăng ký trên ngân hàng GenBank với các mã số MT633090. Gen mã hóa cho một protein gồm 674 amino acid với trọng lượng phân tử khoảng 74 kDa trong đó 32 amino acid đầu N là peptide tín hiệu. Phân tích cấu trúc dự đoán protein gồm 3 vùng: vùng hoạt động ở đầu N thuộc họ glycosyl hydrolase 18, tiếp theo là vùng fibronectin và vùng gắn kết chitin ở đầu C. Cấu trúc bậc 2 dựa đoán của chitinase có 15 vị trí gập cuộn xoắn α và 23 vị trí gập cuộn phiến β .

Từ khóa: *Bacillus* sp., chitinase, nước thải thủy sản, tạo dòng.

ISOLATION NEWLY CHITINOLYTIC PRODUCER *BACILLUS* SP. TB1 IN AQUACULTURE WASTE WATER AND CLONING THE CHITINASE ENCODING GENE

Vu Duc Hoang¹, Nguyen Duc Huy², Trinh Thi Phuong Thao^{2*},
Le Thi Kim Thoa², Le Vu Khanh Trang¹, Truong Thi Phuong Lan³

¹ University of Science and Education, The University of Danang

² Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10

³ University of Medicine and Pharmacy, Hue University

SUMMARY

Chitinase belongs to glycosyl hydrolase group which catalyse the hydrolysis of β -(1,4)-glycosyl linkage of chitin. Chitinase is mainly collected from bacteria, particularly *Bacillus* sp. has been the most interested in research because of chitinase from *Bacillus* sp. has high activity. Chitinase have been applied in agriculture, industry, medicine, waste water treatment... However, natural strains usually produce a very low content of chitinase. Recombinant protein technology enhances the efficiency of enzyme biosynthesis and the recombinant enzyme than easier purify more natural enzyme. In this study, seven *Bacillus* strains were isolated from aquaculture waste waters. Among them, four strains exhibited chitinase production, were TB1, TB3, HV1, and HV2 with hydrolysis halo zone of 13 mm, 4 mm, 3 mm, and 4 mm, respectively. Molecular identification by 16S rRNA sequence indicated the isolate belonged to *Bacillus* genus, hence, named as *Bacillus* sp. TB1. The nucleotide sequence has been deposited in the GenBank database with accession numbers MT750324. Chitinase encoding gene was amplified, was ligated into pGEM®-T Easy and transferred to *E. coli* TOP10. The results indicated that the gene consisted of 2025 bp. The gene has been deposited in GenBank database with accession number of MT633090. Nucleotide sequence analysis of the gene encoded for a 674 amino acids residue protein with a molecular mass of about 74 kDa, of which 32 amino acids in N-terminal are signal peptide. Bioinformatics analysis predicts that it is composed of 3 domains: a catalytic domain in the N-terminal region belonging to the family 18 of glycosyl hydrolases, followed by a fibronectin domain and a chitin-binding domain in the C-terminal region. The secondary structure predicts that chitinase has 15 α -helix and 23 β -strands.

Keywords: Aquaculture waste water, *Bacillus* sp., chitinase, cloning.

* Author for corresponding: Tel: 0916066357; Email: ndhuy@hueuni.edu.vn