

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SINH TỔNG HỢP PECTINASE CỦA CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus licheniformis* V114

Nguyễn Thị Hồng Liên, Nguyễn Văn Hiếu, Trần Thị Hương,
Đặng Thị Nhung, Lê Thị Trà, Phan Thị Hồng Thảo

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

TÓM TẮT

Pectinase, một trong những enzyme thương mại hàng đầu, chiếm 10% lượng enzyme được sản xuất ra, được sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp, nông nghiệp và y dược... Việc tìm kiếm các nguồn sinh tổng hợp pectinase mới với hoạt tính cao, mở rộng khả năng ứng dụng pectinase luôn được chú trọng. Trong nghiên cứu này, 82 chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu vỏ cây và mùn gỗ keo được sàng lọc khả năng sinh tổng hợp pectinase. Chủng V114 sinh pectinase cao được nghiên cứu định danh và lựa chọn môi trường cũng như điều kiện lên men thích hợp cho sản xuất pectinase. Trục khuẩn Gram dương V114 có khuẩn lạc tròn không đều, mép trơn và có khả năng sinh bào tử. Chủng V114 có thể sinh trưởng trên nhiều môi trường nhờ vào khả năng đồng hóa nhiều nguồn carbon, trong khoảng nhiệt độ và pH khá rộng (15-55°C, pH 3-10) và chịu được muối NaCl cao đến 7%. Vi khuẩn V114 có hệ enzyme ngoại bào phong phú, với pectinase đạt 980,6 U/L trong môi trường có vỏ cây làm cơ chất. Chủng V114 có đặc điểm tương đồng cao (99%) với loài *Bacillus licheniformis* và được định danh là *Bacillus licheniformis* V114. Trình tự vùng 16S rDNA của chủng V114 được đăng ký trên GenBank với mã số là PP479114. Môi trường và điều kiện lên men thích hợp được lựa chọn giúp tăng khả năng sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114. Hoạt độ pectinase của chủng *B. licheniformis* V114 đạt 1273,8 U/L trong môi trường M2 chứa 0,3% (w/v) pectin ở 37°C, pH ban đầu 7,0 sau 5 ngày lên men.

Từ khóa: *Bacillus licheniformis*, 16S rDNA, đặc điểm sinh học, lên men, pectinase.

MỞ ĐẦU

Pectinase là nhóm enzyme thủy phân pectin, sản phẩm tạo thành acid galacturonic, glucose, galactose, arabinose, methanol... Pectinase có nhiều loại nhưng có hai loại được nghiên cứu nhiều hơn cả là pectinesterase (3.1.1.11) và polygalacturonase (3.2.1.1.15). Pectinase là enzyme thương phẩm chiếm thị phần hàng đầu, khoảng 10% enzyme được sản xuất là pectinase. Pectinase được ứng dụng nhiều trong các ngành công nghiệp như làm trong và lọc nước ép trái cây, quy trình sản xuất rượu vang để tăng chất lượng rượu, lên men cà phê và trà, khử chất xơ thực vật, chiết xuất dầu, dệt, sản xuất giấy, phân lập nguyên sinh chất và tinh chế virus thực vật, tiền xử lý nước thải chứa pectin... (Kohli, Gupta, 2015). Dù được sinh tổng hợp từ nhiều nguồn nhưng pectinase được sản xuất ở quy mô công nghiệp chủ yếu là từ vi sinh vật (vi khuẩn và nấm). Pectinase là enzyme được phân bố rộng rãi ở vi khuẩn có mặt ở những vị trí giàu pectin, có tới 10% vi sinh vật trong đất là có khả năng phân giải pectin. Chúng bao gồm các vi khuẩn thuộc chi *Pantoea*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, nhiều loại nấm men, nấm mốc, động vật nguyên sinh và tuyến trùng. Hoạt tính pectolytic cũng được tìm thấy ở loài *Leuconostoc mesenteroides* (Alqahtani *et al.*, 2021). Là một trong những chi vi khuẩn lớn, trục khuẩn *Bacillus* mang bào tử, thuộc họ *Firmicutes*, bao gồm nhiều loài cả hiếu khí hoàn toàn và kỵ khí tùy tiện. *Bacillus* đặc biệt là *Bacillus subtilis* và *Bacillus licheniformis* là những loài có tiềm năng cho việc sản xuất quy mô lớn các enzyme thương mại quan trọng. Vi khuẩn hoại sinh *B. licheniformis* có khả năng phát triển trên nhiều nguồn dinh dưỡng đa dạng do tổng hợp và tiết ra các enzyme thủy phân khác nhau và đặc tính này làm cho *B. licheniformis* trở thành một vi sinh vật quan trọng trong công nghiệp (Shrestha *et al.*, 2021). Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn khác nhau được phân lập từ vỏ cây và mùn gỗ keo có hoạt tính pectinase và đã sàng lọc được chủng vi khuẩn V114 sinh tổng hợp pectinase cao nhất, định danh bằng cách kết hợp một số đặc điểm sinh học và phân tích trình tự vùng 16S rDNA, đồng thời đã lựa chọn được môi trường và điều kiện lên men thích hợp cho sinh pectinase của chủng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu: Các mẫu vỏ cây, mùn gỗ keo được thu từ nhà máy giấy Bãi Bằng-Phú Thọ và An Hòa-Tuyên Quang. Các hóa chất sử dụng từ hãng Sigma-Aldrich (Mỹ), Merck, Serva (Đức), Himedia (Ấn Độ) và Trung Quốc.

Môi trường nghiên cứu: Môi trường MPA (g/L): cao thịt 5,0; Peptone 10,0; NaCl 5,0, agar 20; Nước cất vừa đủ 1 lít; pH 7. Môi trường lên men pectinase cơ bản (M1) (g/L): K₂HPO₄ 2,27; KH₂PO₄ 0,95; (NH₄)₂SO₄ 0,67; rỉ đường 10; vỏ cây keo 10, nước cất vừa đủ 1 lít; pH 7 (Ghani *et al.*, 2013).

Phân lập vi khuẩn có hoạt tính pectinase

Các mẫu vỏ cây, mùn gỗ keo cắt nhỏ được hoà trong nước muối sinh lý 0,9% (w/v) đã khử trùng, lắc 150 vòng/phút trong 60 phút. Dịch pha loãng được trang lên các đĩa chứa môi trường MPA và ủ ở 37°C. Sau 2 - 3 ngày các khuẩn lạc vi khuẩn riêng rẽ có hình thái khác nhau được cấy rìa sang các đĩa có chứa môi trường MPA mới để làm thuần ở 30°C. Khả năng sinh pectinase của chủng vi khuẩn được kiểm tra trên môi trường có cơ chất pectin 0,5% (w/v), nuôi ở 30°C trong 2 - 3 ngày. Bổ sung thuốc thử Lugol (1 g I₂ và 5 g KI trong 330 mL H₂O). Các chủng vi khuẩn có vòng sáng trong to bao xung quanh khuẩn lạc được chọn và lên men trên môi trường M1, lắc 180 vòng/phút, ở 30°C trong 7 ngày (Alqahtani *et al.*, 2021). Dịch sau lên men được ly tâm 10000 vòng/phút, trong 10 phút, loại bỏ sinh khối thu dịch enzyme thô. Hoạt độ pectinase được xác định bằng phương pháp đo lượng đường khử sinh ra từ 0,5% (w/v) pectin phản ứng với acid 3,5-dinitrosalicylic (DNSA) hấp thụ cực đại ở 540 nm. Một đơn vị hoạt độ pectinase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μmol acid galacturonic trong điều kiện thí nghiệm (Alqahtani *et al.*, 2021).

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học

Khả năng sử dụng các nguồn carbon của các chủng vi khuẩn được kiểm tra bằng kit API 50CHB (BioMerieux). Khả năng sinh enzyme ngoại bào (xylanase, amylase, protease và laccase) của chủng được kiểm tra trên môi trường khoáng có bổ sung 1% (w/v) cơ chất (xylan, tinh bột tan, casein) và 400 μl/L guaiacol trong 72 - 120 giờ ở 30°C, vòng phân giải cơ chất được xác định bằng thuốc thử Congo đỏ 0,5% (w/v), dung dịch Lugol và dung dịch acid tricloacetic 50% (w/v) (Whitman *et al.*, 2011). Nhiệt độ, pH thích hợp cho sinh trưởng và khả năng chịu muối của chủng V114 được kiểm tra khi nuôi cấy chủng trên môi trường MPA trong 48 giờ ở nhiệt độ 15 - 55°C, pH 3 - 10 và nồng độ NaCl bổ sung là 0 - 7% (w/v).

Phân tích trình tự vùng 16S rDNA

Tách chiết DNA tổng số của chủng V114 theo phương pháp của Sambrook và Green (2012) và thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F:5'-TAACACATGCAAGTCTGAACG-3' và 1492R:5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGT A-3' khuếch đại vùng 16S rDNA. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra, tinh sạch và phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM 3100, xử lý bằng phần mềm BioEdit. Sử dụng chương trình BLAST đánh giá mức độ tương đồng vùng 16S rDNA của chủng V114 với các trình tự nucleotide tương ứng trong GenBank (NCBI). Cây phả hệ được thiết lập trên cơ sở khoảng cách di truyền theo Kimura (1980) bằng việc sử dụng phương pháp Neighbor-joining.

Nghiên cứu môi trường và điều kiện nuôi cấy cho sinh tổng hợp pectinase

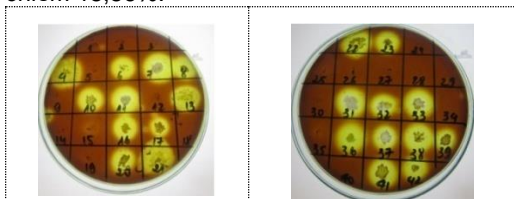
Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong các môi trường cơ bản M1 (Alqahtani *et al.*, 2021), M2 (Ghani *et al.*, 2013), M3 (Aslam *et al.*, 2020), M4 (Akinoyemi *et al.*, 2017), M5 (Bibi *et al.*, 2018), M6 (Ikani *et al.*, 2021). Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ và pH được nghiên cứu trong dải nhiệt độ 25 - 55°C và pH 4 - 9. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác 250 mL chứa 50 mL dịch môi trường, bổ sung 0,5 mL dịch nhân giống 24 giờ (mật độ 10⁸ CFU/mL) nuôi cấy trên máy lắc tròn với tốc độ 150 vòng/phút. Sau 7 ngày, xác định hoạt độ pectinase theo phương pháp của Alqahtani và đồng tác giả (2021).

Các kết quả thu được là các giá trị trung bình, được xử lý theo phương pháp thống kê trong chương trình Excel 2010.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

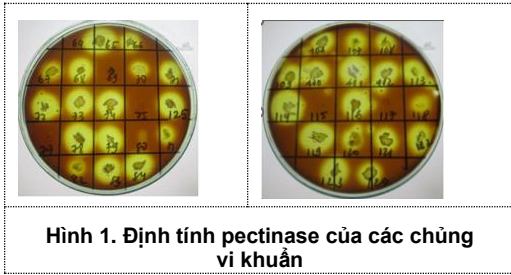
Tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính pectinase

Từ 11 mẫu vỏ gỗ trực cây keo 3 năm tuổi và 3 mẫu mùn gỗ đã phân lập và thuần khiết được 82 chủng vi khuẩn, định tính pectinase bằng cách cấy chấm điểm trên môi trường có chứa pectin 0,5% (w/v) (Hình 1). Thu được 53 chủng có hoạt tính pectinase trong đó có 22 chủng có vòng phân hủy pectin 5 ≤ D_{VPH} ≤ 10 mm chiếm 41,52%, 21 chủng có vòng phân hủy pectin 10 ≤ D_{VPH} ≤ 15 mm chiếm 39,62% và 10 chủng có vòng phân hủy pectin >15 mm chiếm 18,86%.



Bảng 1. Hoạt độ pectinase của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Hoạt độ pectinase (U/L)	Chủng vi khuẩn	Hoạt độ pectinase (U/L)
V7	838,2 ± 40,1	V111	799,3 ± 39,1
V10	561,1 ± 26,5	V114	980,6 ± 48,3



V11	613,1 ± 29,7	V132	788,3 ± 39,5
V31	783,4 ± 38,8	V142	900,5 ± 44,7
V129	761,4 ± 37,2	V139	723,7 ± 36,6

Kiểm tra khả năng sinh tổng hợp pectinase của 10 chủng vi khuẩn có vòng phân hủy pectin >15 mm. Trên môi trường có bổ sung vỏ cây gỗ keo, sau 7 ngày, hoạt độ pectinase của chủng V114 đạt cao nhất 980,6 U/L. Các chủng còn lại đều có hoạt độ pectinase dao động từ 500 - 900 U/L. Từ đó lựa chọn chủng V114 cho các nghiên cứu tiếp theo.

Một số đặc điểm sinh học chủng vi khuẩn V114

Đặc điểm hình thái

Trên môi trường MPA, chủng vi khuẩn V114 có khuẩn lạc tròn không đều, kích thước 1 - 1,5 mm, có màu trắng sữa sau 2 ngày, bề mặt hơi bóng, mép trơn. Tế bào hình que dài (0,49 - 0,51 × 3,20 - 3,58 μm), Gram (+), có khả năng di động và sinh bào tử.

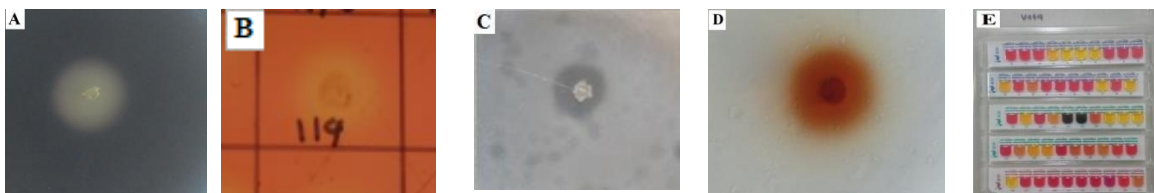


Hình 2. Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào (B,C) của chủng vi khuẩn V114

(A-Khuẩn lạc trên môi trường MPA; B-tế bào nhuộm Gram; C-Tế bào dưới kính hiển vi điện tử (x 5000 lần).

Đặc điểm sinh lý-sinh hóa của chủng V114

Chủng V114 có khả năng đồng hóa nhiều loại đường, phát triển tốt trên các môi trường có bổ sung D-glucose, D-fructose, Methyl-β-D-xylopyranoside, D-galactose, D- maltose, D-lactose, D-Inositol, D-manitol, D-sorbitol, Methyl-β-D-glucopyranside, D-saccharose, D-trehalose, D-raffinose, L-arabinose nhưng không phát triển trên môi trường có glycerol, erythritol, L-xylose, D-manose, L-sorbose, L-rhamnose, D-melibiose, Methyl-β-D-manopyranoside, D,L-fucose, D,L-arabitol (Hình 3E). Chủng V114 sinh trưởng trong dải nhiệt độ 15-55°C nhưng tốt nhất ở 30-37°C. Có thể kết luận chủng này thuộc nhóm ưa ấm (mesophilic). Chủng phát triển được trên môi trường có dải pH 3-10, phát triển tốt nhất ở pH 6-7. Chủng có thể chịu được nồng độ NaCl tới 7% (w/v) và có khả năng sinh tổng hợp một số enzyme ngoại bào như protease, xylanase, amylase và laccase.

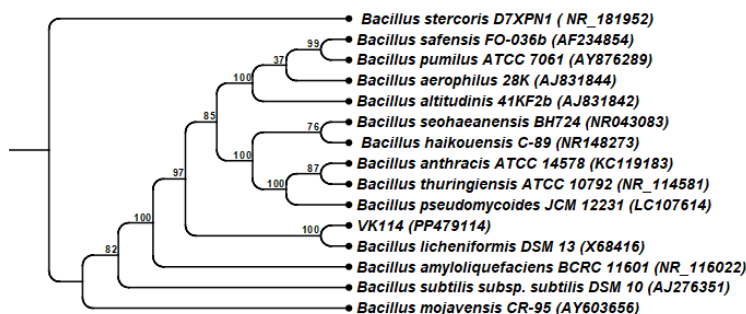


Hình 3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào và đồng hoá nguồn C của chủng vi khuẩn V114

(A - amylase; B - xylanase; C - protease; D - laccase; E: kit API 50 CHB, Biomeriux)

Phân loại chủng vi khuẩn V11

Vùng 16S rDNA của chủng V114 có độ tương đồng (99%) so với vùng tương ứng của chủng *B. licheniformis* DSM13 (X68416). Đối chiếu các đặc điểm phân loại của chủng V114 và kết hợp so sánh trình tự vùng 16S rDNA, chúng tôi cho rằng, chủng vi khuẩn V114 có các đặc điểm rất gần gũi và có độ tương đồng cao với loài *B. licheniformis*. Vậy nên chủng V114 được đặt tên là *B. licheniformis* V114. Trình tự vùng 16S rDNA của chủng *B. licheniformis* V114 đã được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) với mã số truy cập là PP479114. *B. licheniformis* đã được nhiều nhóm nghiên cứu báo cáo là có khả năng sinh tổng hợp pectinase được phân lập từ các nguồn như rau thối, đất bãi thải sắn, phụ phẩm quả chà là, đất trồng rau (Alqahtani *et al.*, 2021; Aslam *et al.*, 2020; Ghani *et al.*, 2013).



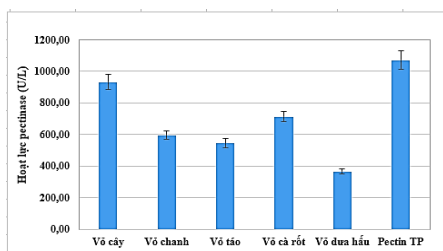
Hình 4. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng V114 với các loài vi khuẩn có họ hàng gần

Lựa chọn môi trường và điều kiện lên men sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114

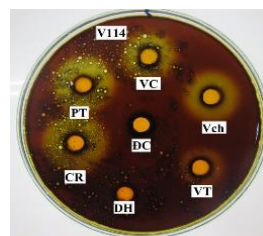
Sự thay đổi thành phần môi trường nuôi cấy có vai trò rất quan trọng, ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào vi sinh vật và sản xuất enzyme. Do đó, hoạt độ enzyme của một chủng vi sinh vật phụ thuộc trực tiếp vào các chất dinh dưỡng có sẵn trong môi trường nuôi cấy (Aslam *et al.*, 2020). Chủng *B. licheniformis* V114 sinh trưởng và sinh pectinase kém trên các môi trường M1, M5 và M6. Trên môi trường M3 giàu dinh dưỡng sau 7 ngày, chủng sinh trưởng tốt và đạt cao nhất trên LB ($OD_{600nm} \cong 6,3$). Tuy nhiên, hoạt độ pectinase thu được cao nhất (986,2 U/L) trên môi trường M2 có thành phần muối $(NH_4)_2SO_4$ vốn có lợi cho sinh tổng hợp pectinase (Aslam *et al.*, 2020). Do vậy, môi trường M2 được lựa chọn làm môi trường lên men chính cho sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114. Trong sinh tổng hợp pectinase, cơ chất cảm ứng là pectin, acid pectic, D-galacturonate và một số nguồn carbohydrate khác. Tuy nhiên, việc sử dụng cơ chất pectin từ nguồn phụ phẩm nông nghiệp như cám mì, bã mía, bã củ cải đường, bã đậu cove, vỏ trái cây (cam, chanh, bưởi, cà rốt, khoai tây...) và bã táo cũng được quan tâm do không chỉ có hàm lượng pectin cao (0,5 - 5%) mà còn cung cấp một số thành phần nitrogen, chất xơ và khoáng cần thiết cho quá trình lên men sản xuất pectinase từ vi sinh vật (Haile, Ayele, 2022). Các cơ chất bổ sung vào môi trường lên men đã có tác động đáng kể đến khả năng sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114. Pectin thực phẩm (0,3%, w/v) là chất cảm ứng tốt nhất cho chủng *B. licheniformis* V114 sinh pectinase. Các chất còn lại cũng đều có tác dụng kích thích sinh pectinase (Hình 5 và Hình 6).

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường đến sinh trưởng và hoạt độ pectinase của chủng *B. licheniformis* V114

Môi trường	Pectinase (U/L)	OD_{600nm}
M1	914,5 ± 44,6	4,7 ± 0,2
M2	986,2 ± 49,3	5,9 ± 0,3
M3	931,8 ± 46,8	6,3 ± 0,4
M4	869,7 ± 45,6	5,7 ± 0,3
M5	823,4 ± 41,1	3,6 ± 0,2
M6	909,6 ± 45,5	4,4 ± 0,2



Hình 5. Ảnh hưởng của cơ chất bổ sung đến hoạt tính pectinase của chủng *B. licheniformis* V114

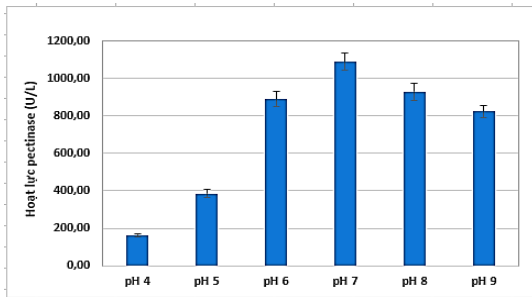


Hình 6. Định tính pectinase khi lên men với các cơ chất khác nhau

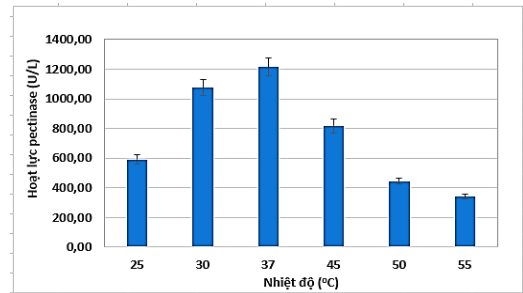
VC: Vỏ cây; Vch: Vỏ chanh; VT: Vỏ táo; DH: Vỏ dưa hấu; CR: Vỏ cà rốt; PT: Pectin thực phẩm.

Độ pH của môi trường có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của vi sinh vật, tính thấm của màng, cũng như quá trình sinh tổng hợp và tính ổn định của enzyme. Hàm lượng ion H^+ hay OH^- có thể tác động trực tiếp vào tế bào hay tác động gián tiếp bằng cách thay đổi mức độ phân ly của các chất trong môi trường. Nhiều loại nấm mốc sinh tổng hợp pectinase tối ưu trong phạm vi pH acid, với vi khuẩn là trong điều kiện hơi trung tính đến kiềm. Tuy nhiên, cơ chế tác động của độ pH lên quá trình sản xuất pectinase vẫn chưa được biết rõ (Widowati *et al.*, 2017). Chủng *B. licheniformis* V114 sinh tổng hợp pectinase trong môi trường trung tính đến môi trường kiềm tính. Hoạt

độ pectinase của chủng vi khuẩn này rất thấp khi được sinh trưởng và sinh enzyme trong môi trường acid (pH 4,0 - 5,0). Môi trường trung tính pH 7,0 thích hợp nhất cho chủng *B. licheniformis* V114 sinh tổng hợp pectinase, hoạt độ enzyme đạt cao nhất (1089 U/L) (Hình 7). Một số chủng *B. licheniformis* khác như *B. licheniformis* GD2a, *B. licheniformis* KIBGE-IB3 cũng sinh tổng hợp pectinase cao nhất ở pH 7,0 mặc dù nhiệt độ lên men của các chủng này khác nhau (Widowati *et al.*, 2017; Aslam *et al.*, 2020).

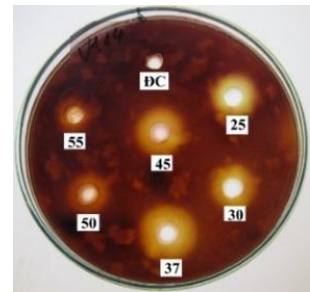


Hình 7. Ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh pectinase của chủng *B. licheniformis* V114



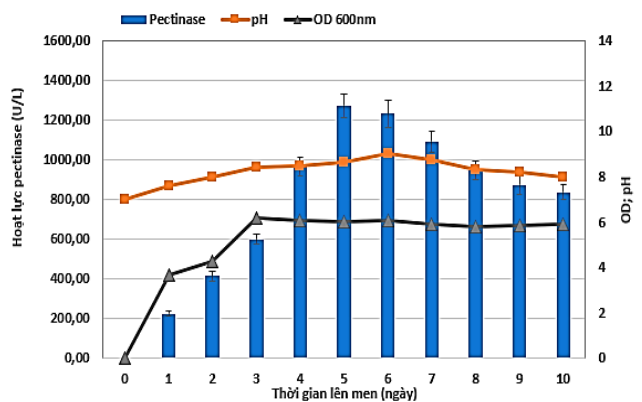
Hình 8. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh pectinase của chủng *B. licheniformis* V114

Nhiệt độ phát triển thích hợp nhất của vi khuẩn *B. licheniformis* V114 là 30°C, OD₆₀₀ đạt 6,3 sau 3 ngày. Nhiều khảo sát cho thấy, nhiệt độ dao động trong khoảng 28 - 30°C là giá trị tối thích cho việc sản sinh pectinesterase (Haile, Ayele, 2022). Nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng và nhiệt độ tối ưu cho sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114 là hoàn toàn khác nhau. 37°C là nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn *B. licheniformis* V114 sinh enzyme, hoạt độ pectinase đạt 1214 U/L (Hình 8 và hình 9). Ngoài ra, chủng *B. licheniformis* V114 vẫn có thể sinh tổng hợp pectinase ở các nhiệt độ cao hơn. Kết quả này cũng tương ứng với công bố của một số tác giả khi nghiên cứu nhiệt độ thích hợp cho lên men sinh tổng hợp pectinase của vi khuẩn *B. licheniformis* (Aslam *et al.*, 2020; Ghani *et al.*, 2013), thậm chí có những chủng sinh enzyme tối ưu ở nhiệt độ 50 - 65°C như chủng *B. licheniformis* GD2a (Widowati *et al.*, 2017), *B. stearothersophilus*, *B. cereus*, *B. furmus*, *B. monjavensis* (Haele, Ayele, 2022).



Hình 9. Định tính pectinase khi lên men ở nhiệt độ khác nhau của chủng *B. licheniformis* V114

Dịch lên men có pH tăng dần trong 5 ngày đầu sau đó cũng giảm nhẹ, nhưng duy trì khoảng pH hơn 8. Tốc độ sinh trưởng và sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114 khác nhau. Do môi trường lên men có rỉ đường, thành phần mà vi khuẩn có thể sử dụng cho sinh trưởng nên vi khuẩn sinh tổng hợp pectinase với một lượng nhỏ, hoạt độ pectinase sau 1 ngày chỉ đạt khoảng 200 U/L. Sau khi sinh trưởng tối đa tại ngày lên men thứ 3, vi khuẩn tiếp tục sinh tổng hợp pectinase để phân cắt cơ chất là pectin thực phẩm, hoạt độ pectinase cao nhất, đạt 1273,8 U/L tại ngày thứ 5. Thời gian thích hợp cho lên men sinh pectinase của chủng *B. licheniformis* V114 là 5 ngày (Hình 10), dài hơn so với thời gian cần thiết để một số chủng như *B. licheniformis* FMB9 trong công bố của Alqahtani và đồng tác giả (2021) và *B. licheniformis* KIBGE-IB3 trong công bố của Aslam và đồng tác giả (2020) sinh tổng hợp pectinase tối đa 3 ngày. Trong các nghiên cứu tiếp theo, thành phần môi trường (nguồn carbon, nitrogen, hàm lượng chất cảm ứng...) và điều kiện lên men (tỷ lệ tiếp giống, độ thông khí...) sẽ tiếp tục được khảo sát nhằm nâng cao hoạt độ pectinase thu nhận và rút ngắn thời gian lên men sinh tổng hợp enzyme của chủng *B. licheniformis* V114 từ quy mô phòng thí nghiệm đến quy mô lên men trên thiết bị 50 và 500 lít.



Hình 10. Động thái quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114

KẾT LUẬN

Trong số các chủng vi khuẩn phân lập được, chủng vi khuẩn V114 thể hiện khả năng sinh tổng hợp pectinase tốt nhất. Đây là trực khuẩn Gram dương, sinh bào tử và sinh enzyme ngoại bào cao. Chủng V114 có khả năng đồng hóa nhiều loại đường như D-glucose, D-fructose, D-galactose, D- maltose, D-lactose, D-inositol, D-manitol, D-sorbitol, D-saccharose, D-trehalose, D-raffinose, L-arabinose, sinh trưởng tốt trong khoảng 15 - 55°C, pH 3 - 10 và

nồng độ muối là 0 - 7%. Đối chiếu với khóa phân loại của Bergey và trình tự 16S rDNA, chủng V114 có đặc điểm rất gần với loài *Bacillus licheniformis* nên được định tên là *Bacillus licheniformis* V114 và trình tự vùng 16S rDNA của chủng được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu Genbank với mã số truy cập [PP479114](#). Chủng *B. licheniformis* V114 sinh tổng hợp pectinase cao nhất trên môi trường M2 bổ sung cơ chất pectin thực phẩm với điều kiện pH ban đầu 7,0 ở 37°C, sau 5 ngày, hoạt độ pectinase đạt cao nhất là 1273,8 U/L.

Lời cảm ơn: Công trình được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu quy trình công nghệ và mô hình thiết bị sản xuất chế phẩm enzyme pectinase và hemicellulase ứng dụng bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng” mã số ĐTKHCN.017/22 cấp Bộ Công Thương và trang thiết bị của Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akinyemi BT, Buraimoh OM, Ogunrinde OO, Amund OO (2017). Pectinase production by *Bacillus megaterium*, *Bacillus bataviensis*, and *Paenibacillus* sp. isolated from decomposing wood residues in the Lagos Lagoon. *J Trop Life Sci*, 7(3): 204-207.
- Alqahtani F, Aly M, Bokhari F, et al. (2021). Isolation and characterization of exopectinase from *Bacillus licheniformis* FMB9 isolated from agricultural soil. *J Contemp Med Sci*, 7(5): 308-314.
- Aslam F, Ansari A, Aman A, et al. (2020). Production of commercially important enzymes from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB3 using date fruit wastes as substrate. *J Gen Eng Biotechnol*, 18: 46.
- Bibi N, Ali S, Tabassum R (2018). Isolation and identification of novel indigenous bacterial strain as a low cost pectinase source. *Braz Arch Biol Technol*, 61: e18160653.
- Ghani M, Ansari A, Aman A, et al. (2013). Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pak J Pharm Sci*, 26(4): 691-697.
- Haile S and Ayele A (2022). Pectinase from microorganisms and its industrial applications. *Sci World J*, 2022: 1881305.
- Ikani E, Ado SA and Abdullahi IO (2021). Screening of moulds from soil for pectinase production. *Niger J Microbiol*, 35(1): 5550-5555.
- Kohli P, Gupta R (2015). Alkaline pectinases: a review. *Biocatal Agric Biotechnol*, 4(3): 279-85.
- Sambrook J and Green MR (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY*.
- Shrestha S, Khatiwada JR, Zhang X, Chio C, Kognou ALM, Chen F, Han S, Chen X, Qin W (2021). Screening and molecular identification of novel pectinolytic bacteria from forest soil. *Ferment*, 7(1): 40.
- Whitman WB, Vos P, Garrity GM, et al. (2011). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition). Vol. 3, *Springer-Verlag, NY*.
- Widowati E, Utami R, Mahadjoeno E and Saputro GP (2017). Effect of temperature and pH on polygalacturonase production by pectinolytic bacteria *Bacillus licheniformis* strain GD2a in submerged medium from Raja Nangka (*Musa paradisiaca* var. *formatypica*) banana peel waste. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*, 193: 012018.

BIOLOGICAL CHARACTERISTIC AND FERMENTATION CONDITION FOR PECTINASE BIOSYNTHESIS OF *Bacillus licheniformis* V114

Nguyen Thi Hong Lien, Nguyen Van Hieu, Tran Thị Huang, Dang Thi Nhung, Le Thi Tra, Phan Thi Hong Thao

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Pectinase, one of the leading commercial enzymes, accounts for 10% of enzyme production, is used in many industries, agriculture, medicine... The search for new sources of biosynthesis pectinase with high activity, expanding the possibilities application of pectinase is always emphasized. In this paper, 82 bacterial strains isolated from bark and *Acacia* wood humus samples were screened for pectinase biosynthesis. The high pectinase-producing strain V114 was studied to identify and selected the medium and fermentation conditions for pectinase production. Gram-positive *Bacillus* V114 has irregular round colonies, smooth edges, and is capable of producing spores. Strain V114 can grow in many environments thanks to its ability to assimilate many carbon sources, in a fairly wide temperature and pH range (15-55°C, pH 3-10) and tolerate NaCl salt up to 7%. Strain V114 has a rich extracellular enzyme system, the pectinase activity reached 980.6 U/L in a medium with tree bark as a substrate. Strain V114 has high similarity (99%) to *Bacillus licheniformis* and is named *Bacillus licheniformis* V114. The 16S rDNA gene sequence of strain *B. licheniformis* V114 was registered on GenBank with code PP479114. The medium and conditions fermentation suitable were selected to help increase the pectinase biosynthesis ability of strain *B. licheniformis* V114. This strain exhibited the maximum pectinase activity of 1273.8 U/L in M2 medium with 0.3% (w/v) pectin was used as a substrate at 37°C, initial pH 7.0 after 5 days of fermentation.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, 16S rDNA, biological characteristics, classification, fermentation, pectinase.

* Author for correspondence: Tel: 02437916882; Email: pthongthao@ibt.ac.vn