

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ĐƯỜNG TREHALOSE CAO PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ NỐT SẦN CỦA RỄ CÂY LẠC

Nguyễn Thị Thu¹, Nguyễn Mạnh Đạt², Trần Liên Hà³

Với mục đích tìm kiếm nguồn vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp trehalose phục vụ hướng sản xuất đường trehalose bằng phương pháp sinh học, các chủng vi khuẩn từ nốt sần của rễ cây lạc tại Việt Nam được nghiên cứu phân lập và tuyển chọn. Các chủng vi khuẩn được phân lập trên môi trường YEMA có bổ sung Congo red, sau đó được đánh giá khả năng sinh tổng hợp trehalose bằng Kit trehalose K-TREH 07/17 (Megazyme). Nghiên cứu đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn từ nốt sần của rễ cây lạc. Kết quả tuyển chọn cho thấy 8/30 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp đường trehalose, trong đó chủng vi khuẩn L4.2 cho hàm lượng cao nhất, đạt 5,474 mg/100ml dịch lên men. Khảo sát đặc điểm sinh lý sinh hóa của chủng vi khuẩn L4.2 cho thấy: khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, kích thước 2-4 mm; tế bào vi khuẩn có dạng hình que, vi khuẩn Gram dương, hiếu khí. Tiến hành định danh chủng vi khuẩn L4.2 bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA và so sánh tương đồng cơ sở dữ liệu gene NCBI cho thấy, L4.2 được xác định là chủng *Mycolicibacterium neoaurum* với độ tương đồng 99,72 %. Mã số GenBank là MT379556.1. Chủng L4.2 có thể đặt tên đầy đủ là *Mycolicibacterium neoaurum* FIRI L4.2. Việc phát hiện chủng *Mycolicibacterium neoaurum* FIRI L4.2 có khả năng sinh tổng hợp trehalose trong số các chủng vi khuẩn được phân lập từ nốt sần của rễ cây lạc tại Việt Nam góp phần đa dạng thêm nguồn vi sinh vật có thể ứng dụng vào hướng nghiên cứu sản xuất đường trehalose bằng phương pháp sinh học.

Từ khóa: Định danh, *Mycolicibacterium neoaurum*, nốt sần của rễ cây lạc, phân lập, tuyển chọn, trehalose.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đường trehalose là đường đôi không khử, cấu tạo từ hai phân tử glucose gắn với nhau bởi liên kết α, α -1,1-glycosid. Trehalose có độ ngọt bằng 45% so với sucrose và có năng lượng khoảng 4 Kcal/g. Nhờ tính không khử, không tham gia phản ứng Maillard, trehalose rất ổn định dưới tác dụng của nhiệt độ

cao. Trehalose có ứng dụng rộng rãi trong ngành y học, mỹ phẩm và đặc biệt trong công nghệ thực phẩm. Trehalose có vai trò bảo vệ tế bào, ổn định protein, bảo quản, ổn định sản phẩm trong các sản phẩm bánh kẹo, sữa và thực phẩm chức năng dành cho người bệnh tiểu đường, béo phì. Trong tự nhiên,

¹KS.Viện Công nghiệp thực phẩm

E-mail: thunt@firi.vn

²TS. Viện Công nghiệp Thực phẩm

³PGS.TS. Đại Học Bách Khoa Hà Nội

Ngày gửi bài: 1/8/2020

Ngày phản biện đánh giá: 15/8/2020

Ngày đăng bài: 25/9/2020

trehalose đóng vai trò quyết định đặc tính sinh học trong một số các sinh vật nhân sơ, sinh vật nhân chuẩn và động vật không xương sống [2]. Trehalose cũng được tìm thấy ở rất nhiều vi khuẩn khác nhau như *Corynebacterium glutamicum* [3], *Streptomyces hygroscopicus* và các loài khác của *Mycobacterium smegmatis* [10], *Rhizobium* sp. [11], *Sulfolobus acidocaldarius* [7]. Đã có nghiên cứu chỉ ra rằng một số vi khuẩn có khả năng tự sinh tổng hợp trehalose nhằm bảo vệ protein và màng tế bào dưới tác động của điều kiện môi trường sống khắc nghiệt (nhiệt độ cao, chất dinh dưỡng thấp, nồng độ muối cao) như một chất chống thấm thấu [1]. Do đó, NaCl thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn để tạo áp suất thẩm thấu cao trong quá trình thí nghiệm đánh giá khả năng sinh tổng hợp trehalose của vi khuẩn.

Trehalose được phát hiện có mặt trong các nốt sần của cây họ đậu với hàm lượng khác nhau [9], tồn tại sự tương tác cộng sinh nhất định giữa vi khuẩn cố định đạm *Rhizobium* trong các nốt sần cây họ đậu. Đặc biệt ở môi trường sống khắc nghiệt, hàm lượng trehalose được tìm thấy cao hơn, điều này có thể giải thích trehalose được sinh ra bởi các vi khuẩn có trong nốt sần để bảo vệ tế bào, protein. Do đó, để tìm kiếm nguồn vi khuẩn sinh tổng hợp trehalose phục vụ hướng sản xuất đường trehalose bằng phương pháp sinh học, nghiên cứu này sẽ tiến hành phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp trehalose cao trong nốt sần của rễ cây lạc tại Việt Nam.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.2.1. Mẫu nốt sần

Mẫu các nốt sần từ giống lạc (được lấy tại thời điểm cây ra hoa nở rộ) LDH 01 tại xã Phú Hòa, huyện Lương Tài, tỉnh Bắc Ninh và giống lạc giống lạc MD9 tại xã Cúc Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình. Mỗi ruộng được lấy 5 hóc ngẫu nhiên. Các nốt sần được tách khỏi rễ và đất sau đó được bảo quản ở 2 – 4°C để sử dụng cho phân lập vi khuẩn.

2.1.2. Hóa chất và môi trường

Môi trường sử dụng để phân lập là YE-MA-CR (Mannitol 10 g/l; K₂HPO₄ 0,5 g/l; MgSO₄ 0,2 g/l; NaCl 0,1 g/l; yeast extract 0,5 g/l; agar 20 g/l; congo red 2,5 ml/l). Môi trường nuôi cấy sử dụng cho kiểm tra khả năng sinh tổng hợp trehalose là MTA (môi trường YEM, có bổ sung Maltose 10 g/l và NaCl 2%), MTB (Chứa môi trường YEM, có bổ sung Maltodextrin 10 g/l và NaCl 2%). Các môi trường được thanh trùng ở 121°C trong 15 phút. Trehalose được định lượng bằng Bộ Kit trehalose K-TREH 07/17 (Megazyme, Ireland).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu vi sinh vật

Quá trình phân lập.

Các mẫu nốt sần của rễ cây lạc sau khi thu thập được phân lập theo phương pháp của Hoben & Somasegaran [6]. Cụ thể như sau, tiến hành khử trùng bề mặt các nốt sần bằng cách ngâm vào dung dịch rửa Ethanol 70% trong 1 phút và NaClO

trong 30 giây. Sau đó rửa lại bằng nước sạch vô trùng 3-5 lần. Các nốt sần được nghiền trong 10ml nước cất vô trùng sau đó pha loãng ở nồng độ: 105 - 1010 và trang trên môi trường YEMA bổ sung congo red (YEMA-CR). Giữ ở nhiệt độ 28-30 0C, trong khoảng thời gian 2-5 ngày sau đó kiểm tra và tách các chủng vi khuẩn. Các khuẩn lạc đơn được chọn ra và tiếp tục được cấy trên các đĩa thạch chứa môi trường YEMA-CR đến khi các khuẩn lạc thu được đồng nhất, không bị lẫn các khuẩn lạc khác.

Tuyển chọn vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp trehalose cao

a. Khảo sát môi trường nuôi cấy

Các chủng vi khuẩn sau khi được phân lập, tiến hành khảo sát khả năng sinh tổng hợp trehalose bằng cách nuôi môi trường lỏng ở thể tích 100 ml, nhiệt độ 28-30⁰C trong thời gian 5 ngày với tốc độ lắc 150-250 vòng/phút ở cả hai môi trường MTA, MTB.

b. Phương pháp thu nhận dịch chứa trehalose nội bào

Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 4500 vòng/phút trong 15 phút ở 4⁰C để thu sinh khối ướt. Lấy 1 g sinh khối ướt thu được hòa vào 5 ml dung dịch đệm phosphate pH 7, rồi tiến hành phá vỡ tế bào bằng phương pháp sóng siêu âm trong 5 chu kì × 30 giây. Sau đó, ly tâm 4500 vòng/phút, 4⁰C trong 15 phút để loại bỏ xác tế bào, ta thu được dịch nội bào có thể chứa trehalose.

Nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa định danh vi khuẩn chủng được chọn

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng được chọn

Quan sát hình thái khuẩn lạc, quan sát hình thái vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm Gram: lấy 1 vòng que cấy sinh khối chủng vi khuẩn bổ sung vào ống nghiệm chứa 5 ml môi trường YEM lỏng, nuôi ở nhiệt độ 30⁰C sau 24 giờ, lấy dịch soi và nhuộm Gram.

Xác định khả năng hiếu khí hay kỵ khí của chủng vi khuẩn, tiến hành nuôi cấy chủng vi khuẩn ở thể tích 50ml môi trường YEM lỏng trong 48 giờ. Kết thúc quá trình lên men, ly tâm thu sinh khối. Sinh khối được đặt trên lam kính và nhỏ H₂O₂ 3%. Quan sát hiện tượng sủi bọt chứng tỏ dương tính (hiếu khí), không có hiện tượng chứng tỏ âm tính (kỵ khí).

1.2.2. Phương pháp hóa lý để định lượng trehalose

Hàm lượng trehalose trong mẫu được xác định bằng bộ Kit trehalose K-TREH 07/17 (Megazyme, Ireland) dựa trên nguyên tắc và quy trình của hãng khuyến cáo [8].

1.2.3. Phương pháp sinh học phân tử để định danh chủng vi khuẩn chọn được

Vi khuẩn được định tên đến cấp độ loài theo phương pháp giải trình tự gen rADN 16S. Sau khi khuếch đại và giải trình tự, các chuỗi ADN được so sánh với GeneBank thông qua giao diện tìm kiếm BLAST nucleotide-nucleotide [4].

2.2.4. Phương pháp toán học

Các số liệu là kết quả trung bình của 3 lần thí nghiệm lặp lại. Các giá trị trung bình của các mẫu được so sánh ở độ tin cậy 95% theo phép kiểm định Tukey thực hiện bằng Phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA, SPSS version 16.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

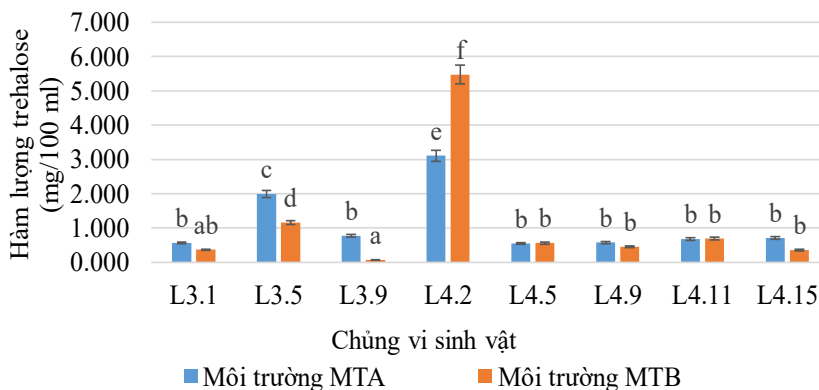
3.1. Phân lập chọn chủng vi khuẩn từ rễ của cây lạc

Sau khi chọn được nốt sần khỏe có màu hồng từ rễ của cây lạc chúng tôi đã tiến hành phân lập và làm thuần được 30 chủng vi khuẩn. Trong đó 14 chủng vi khuẩn từ nốt sần của giống lạc LDH 01 và ký hiệu L3.1 đến L3.14 và 16 chủng vi khuẩn từ nốt sần của giống lạc MD9 ký hiệu L4.1 đến L4.16. Qua kết quả cho thấy 30 chủng đều có khả năng sinh trưởng, khuẩn lạc mọc sau 2-5 ngày nuôi cấy, và kích thước khuẩn lạc đạt được 0,2-6 mm sau 5 ngày nuôi cấy.

Quan sát nhận thấy các khuẩn lạc có màu sắc đa dạng: đỏ, hồng, hồng nhạt, trắng đục. Hình dạng vi khuẩn: tròn hoặc vô định hình.

3.2. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp đường trehalose cao

30 chủng vi khuẩn nuôi cấy ở hai môi trường MTA, MTB. Tiến hành thu nhận trehalose nội bào, sau đó xác định hàm lượng trehalose bằng kit trehalose K-TREH 07/17 (Megazyme). Kết quả 8/30 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp trehalose được trình bày trên Hình 1.



Hình 1. Hàm lượng trehalose của các chủng vi khuẩn trong hai môi trường nuôi cấy

Ghi chú: Các giá trị trung bình của các mẫu được đánh dấu bằng các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% theo phép kiểm định Tukey

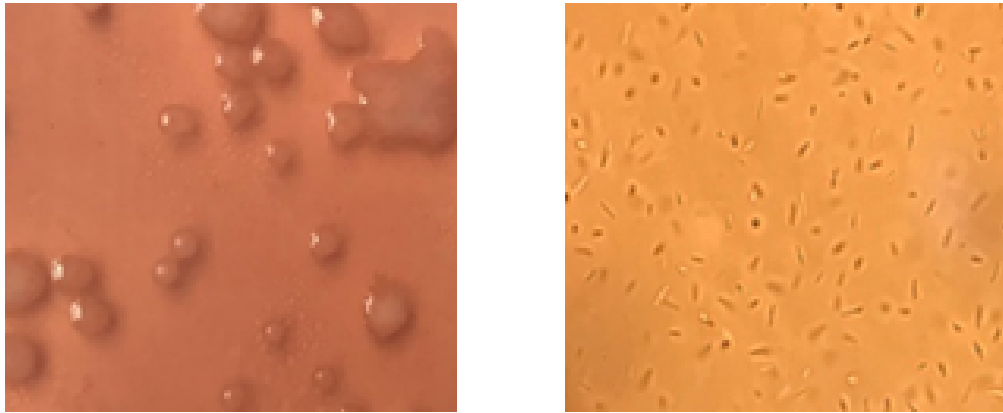
Chủng vi khuẩn L4.2 có hàm lượng

trehalose cao hơn so với các chủng còn lại (với mức ý nghĩa $p < 0,05$) là 5,474 mg/100ml dịch lên men ở môi trường lên men MTB. Từ kết quả trên chúng tôi chọn chủng vi khuẩn L4.2 để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa và định tên vi khuẩn bằng giải trình tự gen

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng được chọn

Sau khi quan sát hình thái khuẩn lạc của L4.2 bằng mắt thường nhận thấy: khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, kích thước 2-4 mm; và quan sát hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi: Tế bào vi khuẩn có dạng hình que ngắn. Vi khuẩn Gram dương, hiếu khí.



Hình 2. Hình ảnh khuẩn lạc và hình ảnh vi khuẩn của chủng L4.2

Định tên vi khuẩn bằng giải trình tự gen

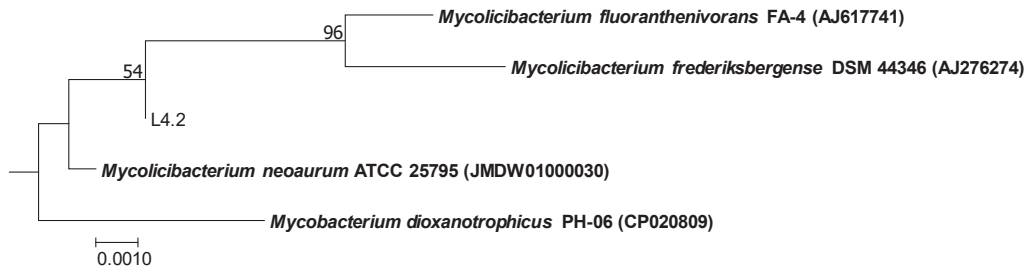
Chủng L4.2 được đi phân loại bằng phương pháp giải trình tự gen ADN ribosome 16s, thu được kết quả như dưới đây:

AAGCCTGATGCAGCGACGC-
CGCNGAGGGATGACGGCCTTC-
GGTGTAAACCTCTTTCAG-
CACAGACGAAGCGCAAGT-
GACGGTATGTGCAGAAGAAG-
GACCGGCCAACTACGTGC-
CAGCAGCCGCGGTAATAC-
GTAGGGTCCGAGCGTTGTC-
CGGAATTACTGGGCGTAAA-
GAGCTCGTAGGTGGTTTGTG-
GCGTTGTTTCGTGAAAACCTCA-
CAGCTTAACTGTGGGCGTGC-
GGGCGATACGGGCAGACTG-
GAGTACTGCAGGGGAGACTG-
GAATTCCTGGTGTAGCGGTG-
GAATGCGCAGATATCAGGAG-
GAACACCGGTGGCGAAGGC-
GGGTCTCTGGGCAGTAACT-
GACGCTGAGGAGCGAAAGC-
GTGGGGAGCGAACAGGATT-
AGATAACCTGGTAGTCCACGC-
CGTAAACGGTGGGTACTAGGT-
GTGGGTTTCCTTCCTTGGGAT-

CCGTGCCGTAGCTAACGCAT-
TAAGTACCCCGCCTGGGGAG-
TACGGCCGCAAGGCTAAACT-
CAAAGGAATTGACGGGGGC-
CCGCACAAGCGGCGGAGCAT-
GTGGATTAATTTCGATGCAACG-
CGAAGAACCTTACCTGGGTTT-
GACATGCACAGGACGCTGG-
TAGAGATATCAGTTCCTTGT-
GGCCTGTGTGCAGGTGGTG-
CATGGCTGTTCGTCAGCTCGT-
GTCGTGAGATGTTGGGTTA-
AGTCCCGCAACGAGCGCAAC-
CCTTGTCCTATGTTGCCAGCG-
GGTTATGCCGGGGACTCGTAG-
GAGACTGCCGGGGTCAACTC-
GGAGGAAGGTGGGGATGAC-
GTCAAGTCATCATGCCCTTAT-
GTCCAGGGCTTCACACATGC-
TACAATGGCCGGTACAAAG-
GGCTGCGATGCCGTGAGGT-
GGAGCGAATCCTTGTAAG-
CCGGTCTCAGTTCGGATCGG-

GGTCTGCAACTCGACCCCGT-
GAAGTCGGAGTCGCTAGTA-
ATCGCAGATCAGCAACGCT-
GCGGTGAATACGTTCCCGG-

GCCTTGTACACACCGCCCGT-
CACGTCATGAAAGTCGGTAA-
CACCCGAAGCCGGTGGCCTA-
ACCCCTTGTGGA



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn L4.2 thuộc chi Mycolicibacterium

Bảng 1. Kết quả đọc trình tự gen so sánh với ngân hàng Genbank

STT	Chủng	Tên latin	Trình tự đối chiếu (Genbank)	Độ tương đồng	Mã số GenBank
1	L4.2	<i>Mycolicibacterium neoaurum</i>	JMDW01000030	1055/1058 (99,72%)	MT379556.1

Như vậy, chủng L4.2 được xác định và đặt tên là *Mycolicibacterium neoaurum* FIRI L4.2. *Mycolicibacterium neoaurum* là một loại vi khuẩn hầu như không gây bệnh. Kết quả định danh này khá phù hợp với một số chủng *Mycolicibacteria*. Trehalose đã được chứng minh có mặt trong tế bào chất của *Mycolicibacteria* và là một thành phần của glycolipids thành tế bào [5]. Từ những phát hiện trên giúp mở ra những nghiên cứu cơ chế sinh tổng hợp đường trehalose mới từ chủng *Mycolicibacteria* cũng như đối với *Mycolicibacterium neoaurum*.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn từ nốt sần của rễ cây lạc. Kết quả tuyển chọn cho thấy 8/30 chủng vi khuẩn

có khả năng sinh tổng hợp đường trehalose, trong đó chủng vi khuẩn L4.2 cho hàm lượng cao nhất, đạt 5,474 mg/100ml dịch lên men. Khảo sát đặc điểm sinh lý sinh hóa của chủng vi khuẩn L4.2 cho thấy: khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, kích thước 2-4 mm; tế bào vi khuẩn có dạng hình que, vi khuẩn Gram dương, hiếu khí. Tiến hành định danh chủng vi khuẩn L4.2 bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA và so sánh tương đồng cơ sở dữ liệu gene NCBI cho thấy, L4.2 được xác định là chủng *Mycolicibacterium neoaurum* với độ tương đồng 99,72 %. Mã số GenBank là MT379556.1. Chủng L4.2 có thể đặt tên đầy đủ là *Mycolicibacterium neoaurum* FIRI L4.2. *Mycolicibacterium neoaurum* FIRI L4.2 có khả năng sinh tổng hợp trehalose trong số các chủng vi khuẩn được phân lập từ

nốt sần của rễ cây lạc tại Việt Nam góp phần đa dạng thêm nguồn vi khuẩn có thể ứng dụng vào hướng nghiên cứu sản xuất đường trehalose bằng phương pháp sinh học.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi đề tài mã số ĐTĐLCN.11/18 và ĐT.03.17/CNSHCB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Boos, W., U. Ehmann, H. Forkl, W. Klein, M. Rimmele and P. Postma (1990). *Trehalose transport and metabolism in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 172(6): 3450-3461.
2. Cai, X., I. Seitzl, W. Mu, T. Zhang, T. Stressler, L. Fischer and B. Jiang (2018). *Biotechnical production of trehalose through the trehalose synthase pathway: current status and future prospects*. Application of Microbiol Biotechnol 102(7): 2965-2976.
3. Carpinelli, J., R. Kramer and E. Agosin (2006). *Metabolic engineering of Corynebacterium glutamicum for trehalose overproduction: role of the TreYZ trehalose biosynthetic pathway*. Appl Environ Microb 72.
4. Cloud, J. L., H. Neal, R. Rosenberry, C. Y. Turenne, M. Jama, D. R. Hillyard and K. C. Carroll (2002). *Identification of Mycobacterium spp. by Using a Commercial 16S Ribosomal DNA Sequencing Kit and Additional Sequencing Libraries*. Journal of Clinical Microbiology 40(2): 400-406.
5. De Smet, K. A. L., A. Weston, I. N. Brown, D. B. Young and B. D. Robertson (2000). *Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria*. Microbiology 146(1): 199-208.
6. Hoben, H. J. and P. Somasegaran (1982). *Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of Rhizobium spp. in Inoculants Made from Presterilized Peat*. Appl Environ Microbiol 44(5): 1246-1247.
7. Maruta, K., H. Mitsuzumi, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto and M. Kurimoto (1996). *Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from Thermophilic archaeobacterium Sulfolobus acidocaldarius*. Biochim Biophys Acta 1291(3): 177-181.
8. Megazyme (2017). *Trehalose assay procedure, K - TREH 07/17*.
9. Müller, J., Z.-P. Xie, C. Staehelin, R. B. Mellor, T. Boller and A. Wiemken (1994). *Trehalose and trehalase in root nodules from various legumes*. Physiologia Plantarum 90(1): 86-92.
10. Shimakata, T. and Y. Minatogawa (2000). *Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in Corynebacterium matruchotii*. 380.
11. Streeter, J. G. (1985). *Accumulation of alpha, alpha-trehalose by Rhizobium bacteria and bacteroids*. Journal of Bacteriology 164(1): 78-84.

Summary**RESEARCH ON THE SELECTION OF THE BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM PEANUT ROOT NODULES FOR HIGH TREHALOSE-BIOSYNTHESIS ABILITY**

In order to find out a bacteria source which has a high ability to produce trehalose for the application in the production of trehalose by biological method, bacteria in peanut nodules in Vietnam were isolated and selected. Bacteria were isolated on YEMA with Congo red added, and assessed for the ability to synthesize trehalose using trehalose Kit K-TREH 07/17 (Megazyme). 30 bacterial strains were obtained from peanut nodules. Results of the selection showed that 8/30 strains have ability to biosynthesize trehalose. Among them, the strain L4.2 had the highest ability in trehalose production, achieving 5.474 mg/100ml of culture medium. Study on physiological characteristics of the strain L4.2 showed that: their colonies were round, white and turbid, with the size of 2-4 mm; their cells were rod, Gram positive, and aerobic. Identification of this strain by 16S rRNA gene sequencing followed by comparison of the obtained sequence with known sequences stored in NCBI database showed that L4.2 could be recognized as *Mycolicibacterium neoaurum* with 99.72 % similarity. GenBank code is MT379556. Therefore, L4.2 could be named as *Mycolicibacterium neoaurum* FIRI L4.2. The detection of *Mycolicibacterium neoaurum* FIRI L4.2 which has the ability to synthesize trehalose among isolated bacteria from peanut nodules in Vietnam contributed to the diversity of microbial resources to be applicable for the production of trehalose by biotechnological method.

Keywords: *Identification, Mycolicibacterium neoaurum, peanut root nodules, isolation, selection, trehalose.*