

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI PECTIN TỪ VỎ MỘT SỐ LOẠI TRÁI CÂY

Phạm Thị Ngọc Lan¹, Ngô Thị Bảo Châu^{1*}, Ngô Thị Minh Thu²

¹ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

² Trường Đại học Duy Tân

* Email: baochau1601@gmail.com

Ngày nhận bài: 29/5/2020; ngày hoàn thành phản biện: 10/8/2020; ngày duyệt đăng: 9/10/2020

TÓM TẮT

Vi khuẩn phân giải pectin đã được nghiên cứu từ vỏ một số loại trái cây. Kết quả cho thấy số lượng vi khuẩn có hoạt tính pectinase dao động trong khoảng $0,12 \times 10^8$ đến $13,52 \times 10^8$ CFU/g. Trong 120 chủng vi khuẩn phân lập từ vỏ trái cây giàu pectin, chúng tôi đã tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn M70, M82 và M84 có khả năng phân giải pectin mạnh với đường kính vòng phân giải lần lượt là 21,67 mm, 21,83 mm và 22,67 mm. Kết quả bước đầu đã xác định được điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp pectinase và tích lũy sinh khối của ba chủng vi khuẩn M70, M82 và M84 với thời gian nuôi cấy là 72 giờ và pH môi trường là 6,5.

Từ khóa: Phân lập, pectinase, vi khuẩn, tuyển chọn.

1. MỞ ĐẦU

Pectinase là enzyme thủy phân cơ chất pectin, được ứng dụng nhiều trong sản xuất và đời sống chỉ sau amylase và protease. Pectinase được ứng dụng trong các quy trình sản xuất nhằm rút ngắn thời gian và tăng hiệu suất thu nhận sản phẩm như trong quy trình chiết xuất nước quả và sản xuất nước giải khát, trích ly dầu thực vật, trong chế biến thức ăn chăn nuôi, xử lý nước thải, công nghiệp bông sợi, sản xuất giấy [5],... Với vai trò ứng dụng ngày càng tăng trong sản xuất công nghiệp và tiềm năng phát triển trên thị trường thương mại, pectinase ngày càng được chú trọng nghiên cứu và phát triển trong lĩnh vực công nghệ sinh học.

Hiện nay, nhiều nghiên cứu về enzyme pectinase có nguồn gốc từ vi sinh vật đã được công bố, nhưng chủ yếu là pectinase của nấm mốc, còn các nghiên cứu về pectinase từ vi khuẩn vẫn rất hạn chế. Do đó, việc nghiên cứu các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải pectin là rất cần thiết và có ý nghĩa, nhằm đa dạng hóa nguồn cung cấp enzyme pectinase vi sinh vật, phát hiện nguồn gen vi khuẩn có khả năng phân giải

pectin mạnh vốn có sẵn trong tự nhiên làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng enzyme này trong sản xuất và đời sống. Vi khuẩn phân giải pectin có khả năng phát triển nhanh trên các loại vỏ trái cây. Mặt khác, phế liệu của ngành công nghệ thực phẩm là vỏ trái cây được thải ra hàng ngày là rất lớn. Lợi dụng nguồn phế liệu này để ứng dụng trong việc sản xuất pectinase quy mô lớn, đồng thời giảm thiểu lượng xác bã thực vật thải ra môi trường.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải pectin được phân lập từ vỏ một số loại trái cây như cam sành, cam Vinh, quýt, chuối, bưởi da xanh,... được thu tại các chợ trên địa bàn thành phố Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân lập và đếm số lượng tế bào: vi khuẩn được phân lập trên môi trường Vinogradski thạch đĩa có bổ sung cơ chất pectin (phương pháp Koch). Đếm số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa [1].

- Sơ tuyển trực tiếp các chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme phân giải pectin: tiến hành cấy vạch trên môi trường thạch đĩa với pectin là nguồn carbon duy nhất (5 g/L). Khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase được đánh giá dựa vào kính thước vạch phân giải pectin (bao gồm cả vạch cấy) sau khi nhuộm bằng thuốc nhuộm Lugol [1].

- Sơ tuyển gián tiếp vi khuẩn có khả năng sinh enzyme phân giải pectin: nuôi cấy lắc các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong môi trường dịch thể Vinogradski-pectin với lượng vi khuẩn cấy vào mỗi bình là 5 mL dịch huyền phù/30 mL môi trường với tốc độ lắc 120 rpm trong thời gian 3 ngày. Sau đó tiến hành lọc dịch nuôi cấy bằng máy hút chân không, thu dịch enzyme để xác định hoạt tính pectinase bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [1].

- Thăm dò ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính của pectinase và sự tích lũy sinh khối của các chủng vi khuẩn: nuôi cấy các chủng vi khuẩn đã chọn trong môi trường Vinogradski dịch thể với nguồn carbon được thay bằng pectin trong các điều kiện thời gian (12 giờ, 24 giờ, 96 giờ), pH môi trường được thay đổi (pH = 4,0; 4,5;...7,0) . Sau khi nuôi cấy, xác định sinh khối tích lũy và hoạt tính pectinase của chủng vi khuẩn [1] [3].

- Xử lý số liệu: thí nghiệm được lặp lại ba lần, số liệu được xử lý bằng thống kê mô tả (Microsoft Excel 2010) và phân tích ANOVA (Duncan's test $p < 0,05$) bằng chương trình SPSS 20.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và xác định số lượng tế bào vi khuẩn phân giải pectin

Bảng 1. Số lượng vi khuẩn phân giải pectin trong các mẫu phân lập

STT	Loại mẫu	Ký hiệu mẫu	pH mẫu	CFU/gam mẫu ($\times 10^8$)
1	Vỏ cam sành	MS1	5,43	2,50
2	Vỏ quýt Nam Đông	MS2	3,70	4,51
3	Vỏ chuối	MS3	5,97	0,58
4	Vỏ cam sành	MS4	5,35	0,85
5	Vỏ cam sành	MS5	4,27	1,17
6	Vỏ cam sành	MS6	4,46	0,12
7	Vỏ bưởi da xanh	MS7	6,86	13,52
8	Vỏ cam Vinh	MS8	4,23	0,87
9	Vỏ quýt Nam Bộ	MS9	5,11	5,19
10	Vỏ bưởi Năm Roi	MS10	6,42	0,38
11	Vỏ quýt vàng	MS11	4,64	1,35
12	Vỏ quả sung	MS12	6,87	0,16
13	Vỏ quýt đường	MS13	4,54	2,02
14	Vỏ cam sành	MS14	5,86	1,90
15	Vỏ bưởi da xanh	MS15	6,87	11,26
16	Vỏ cam sành	MS16	6,29	2,29

Từ 16 mẫu vỏ trái cây khác nhau với phương pháp phân lập trên môi trường Vinogradski thạch đĩa có bổ sung cơ chất pectin, kết quả về số lượng vi khuẩn có khả năng phân giải pectin được trình bày ở bảng 1.

Số liệu bảng 1 cho thấy, số lượng vi khuẩn phân bố ở các loại vỏ trái cây khác nhau là không giống nhau. Nguyên nhân có thể là do loại mẫu, vị trí thu mẫu, mức độ hư hỏng ở các loại vỏ trái cây là khác nhau. Số lượng vi khuẩn trong 16 mẫu phân lập có sự chênh lệch rõ rệt, dao động trong khoảng $0,12 \times 10^8$ đến $13,52 \times 10^8$ CFU/g. Trong đó, mẫu MS7 phân lập từ vỏ bưởi da xanh có số lượng vi khuẩn cao nhất, đạt $13,52 \times 10^8$ CFU/g, số lượng vi khuẩn thấp nhất phân lập được từ mẫu vỏ cam sành MS6 ($0,12 \times 10^8$ CFU/g).

3.2. Sơ tuyển trực tiếp và sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng phân giải pectin mạnh

Để đánh giá khả năng phân giải pectin của các chủng vi khuẩn phân lập được, tiến hành cấy trực tiếp vi khuẩn trên môi trường Vinogradski thạch đĩa với nguồn carbon là pectin. Vùng phân giải được phát hiện bằng thuốc nhuộm Lugol và khả năng

phân giải pectin được xác định bằng kích thước của vạch phân giải (bao gồm cả vạch cấy). Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng phân giải pectin của các chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường thạch đĩa bổ sung pectin

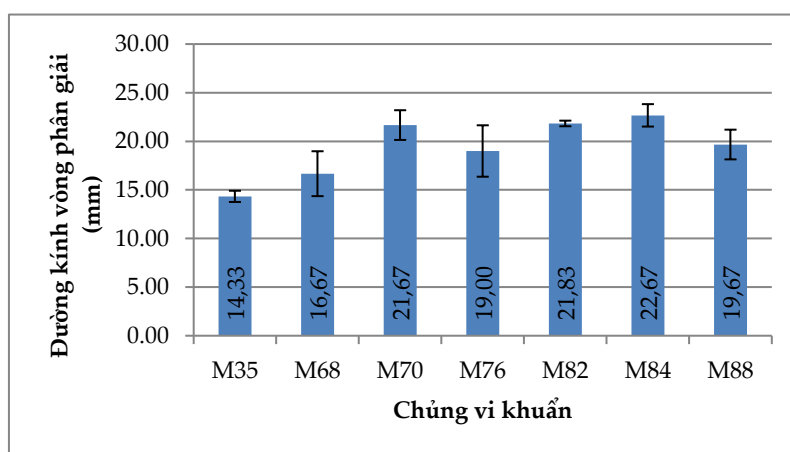
Khả năng phân giải	Kích thước vạch phân giải (mm)	Số chủng vi khuẩn	Tỷ lệ (%)
Yếu	< 10	76	63,33
Trung bình	10 - < 15	24	20,00
Mạnh	15 - 20	13	10,84
Rất mạnh	> 20	7	5,83

Tất cả 120 chủng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng phân giải pectin nhưng ở các mức độ khác nhau. Trong đó, các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải pectin mạnh và rất mạnh chiếm tỷ lệ khá thấp (10,83% và 5,83%), trong khi đó các chủng phân giải pectin yếu chiếm tỷ lệ cao nhất (63,33%).

3.3. Tuyển chọn gián tiếp

Từ kết quả sơ tuyển, trong số 120 chủng vi khuẩn phân lập, chúng tôi chọn ra 7 chủng là M35, M68, M70, M76, M82, M84, M88 có kích thước vạch phân giải pectin lớn (14,33 mm đến 22,67 mm) để sử dụng cho tuyển chọn gián tiếp.

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy lắc trong môi trường Vinogradski dịch thể với nguồn cơ chất là pectin. Sau 3 ngày, thu dịch chiết enzyme và xác định vòng phân giải pectin bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Hoạt tính pectinase được xác định bằng hiệu số giữa đường kính vòng phân giải (D) và đường kính của lỗ thạch (d). Kết quả được trình bày ở hình 1.

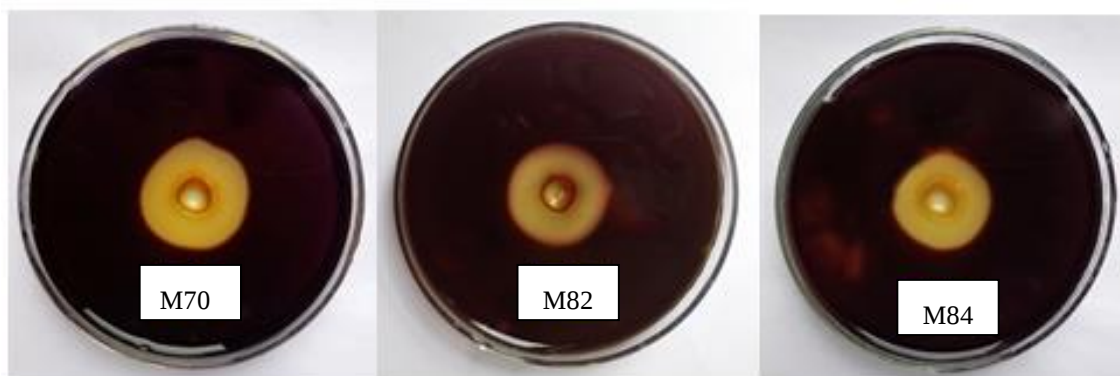


Hình 1. Đường kính vòng phân giải pectin của các chủng vi khuẩn

Như vậy, với 7 chủng vi khuẩn sàng lọc có 3 chủng được đánh giá là có khả năng phân giải pectin mạnh. Chủng M70 có đường kính vòng phân giải là 21,67 mm, chủng M82 là 21,83 mm và chủng M84 là 22,67 mm. Kết quả này tương tự với một số công trình nghiên cứu cùng lĩnh vực. Anam Tariq và Zakia Latif (2012) đã phân lập

được 61 chủng vi khuẩn, trong đó có 16 chủng cho đường kính vòng phân giải từ 8 mm đến 22 mm [4].

Ba chủng M70, M82, M84 được chọn để tiến hành thăm dò một số điều kiện nuôi cấy tối ưu.



Hình 2. Vòng phân giải pectin của 3 chủng vi khuẩn M70, M82 và M84

3.4. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến sinh tổng hợp enzyme pectinase của vi khuẩn

3.4.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường dịch thể với các khoảng thời gian khác nhau từ 12, 24,... đến 96 giờ, sau đó xác định hoạt tính pectinase và sinh khối tích lũy. Kết quả thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự tích lũy sinh khối và hoạt tính pectinase của vi khuẩn

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Chủng M70		Chủng M82		Chủng M84	
	Sinh khối khô (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải (mm)
12	1,04 ^g	0,00 ^f	0,81 ^h	12,17 ^e	0,25 ^h	0,00 ^f
24	1,09 ^f	8,00 ^e	0,95 ^g	15,67 ^d	0,33 ^g	0,00 ^f
36	1,40 ^e	11,33 ^d	1,06 ^f	16,50 ^d	0,54 ^f	12,50 ^d
48	1,40 ^e	18,67 ^c	1,10 ^e	20,50 ^c	0,84 ^d	13,83 ^c
60	1,46 ^d	20,17 ^b	1,25 ^d	21,67 ^b	1,88 ^b	23,33 ^b
72	2,40 ^a	21,67 ^a	2,68 ^a	23,67 ^a	2,39 ^a	25,67 ^a
84	1,63 ^b	12,17 ^d	1,83 ^b	15,83 ^d	1,44 ^c	14,00 ^c
96	1,55 ^c	8,50 ^e	1,42 ^c	11,50 ^e	0,75 ^e	8,17 ^e

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng hoạt tính pectinase và sinh khối khô của cả 3 chủng vi khuẩn tăng dần trong thời gian nuôi cấy từ 12 giờ đến 96 giờ. Cả 3 chủng M70, M82 và M84 đều đạt hoạt tính pectinase cực đại ở thời điểm 72 giờ. Đối với chủng M70 đường kính vòng phân giải đạt cực đại là 21,67 mm, chủng M82 là 23,67 mm, và chủng M84 là 25,67 mm. Sau 84 giờ nuôi cấy, hoạt tính pectinase bắt đầu giảm mạnh.

Theo Đặng Thị Mai Phương (2010), thời gian nuôi cấy tối ưu đối với *Bacillus licheniformis* là sau 96 giờ, còn đối với *Bacillus subtilis* là 120 giờ [2].

3.4.2. Ảnh hưởng của pH môi trường

Ba chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trong môi trường dịch thể với các pH môi trường khác nhau từ 4,0; 4,5;... 7,0. Hoạt tính pectinase và sinh khối tích lũy được thể hiện ở bảng 4.

Từ kết quả thí nghiệm chúng tôi nhận thấy, 2 chủng vi khuẩn M70 và M82 có khả năng sinh pectinase trong khoảng pH 5,5 - 7, chủng M84 trong khoảng 5 - 7. pH tối ưu đối với 3 chủng vi khuẩn là 6,5; ở khoảng pH này đường kính vòng phân giải pectin và sinh khối của các chủng vi khuẩn đều đạt cực đại. Thể hiện mạnh nhất là chủng M84 với hoạt tính pectinase đạt 28,50 mm và sinh khối tích lũy là 5,05 mg/mL.

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự tích lũy sinh khối và hoạt tính pectinase của vi khuẩn

pH môi trường	Chủng M70		Chủng M82		Chủng M84	
	Sinh khối khô (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải (mm)
4,0	1,19 ^g	0,00 ^e	1,83 ^g	0,00 ^e	0,44 ^g	0,00 ^f
4,5	1,31 ^f	0,00 ^e	2,14 ^f	0,00 ^e	0,49 ^f	0,00 ^f
5,0	1,52 ^e	0,00 ^e	2,19 ^e	0,00 ^e	0,57 ^e	4,67 ^e
5,5	2,44 ^d	3,67 ^d	2,55 ^d	14,33 ^d	1,28 ^d	13,67 ^c
6,0	3,511 ^c	23,50 ^b	3,59 ^c	21,17 ^b	3,64 ^c	16,17 ^c
6,5	4,25 ^a	26,50 ^a	3,85 ^a	25,00 ^a	5,05 ^a	28,50 ^a
7,0	4,04 ^b	22,67 ^c	3,72 ^b	16,33 ^c	4,52 ^b	20,00 ^b

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Đặng Thị Mai Phương (2010), hoạt độ pectinase tăng nhanh khi pH môi trường nuôi cấy tăng từ 3,0 đến 6,0. Ở *Bacillus licheniformis*, hoạt tính pectinase đạt cực đại tại pH môi trường nuôi cấy là 6,0. Trong khi đó, *Bacillus subtilis* có hoạt tính pectinase cao nhất ở pH môi trường 7,0 [2].

4. KẾT LUẬN

- Số lượng vi khuẩn có khả năng phân giải pectin phân lập được trong các mẫu vỏ trái cây dao động trong khoảng $0,12 \times 10^8$ đến $13,52 \times 10^8$ CFU/g.

- Từ 16 mẫu vỏ trái cây khác nhau đã phân lập được 120 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải pectin. Trong đó, chủng có khả năng phân giải pectin yếu chiếm tỷ lệ cao nhất 63,33%, chủng có khả năng phân giải pectin rất mạnh chiếm tỷ lệ thấp nhất 5,83%, chủng có khả năng phân giải trung bình chiếm 20,00% và chủng có khả năng phân giải mạnh chiếm 10,84%.

- Tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn M70, M82 và M84 có khả năng phân giải pectin mạnh với đường kính vòng phân giải lần lượt là 21,67 mm, 21,83 mm và 22,67 mm.

- Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp pectinase và tích lũy sinh khối của ba chủng vi khuẩn M70, M82 và M84 là 72 giờ nuôi cấy và pH môi trường là 6,5.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phạm Thị Ngọc Lan (2012). *Thực tập Vi sinh vật học*. NXB Đại học Huế.
- [2]. Đặng Thị Mai Phương (2010). *Nghiên cứu sự tổng hợp cảm ứng pectinase ở một số chủng Bacillus*. Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Đại học Sư phạm, thành phố Hồ Chí Minh.
- [3]. Mrudula S., Anitharaj R. (2011). Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate, *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 6 (2): 64 - 71.
- [4]. Anam Tariq and Zakia Latif (2012), "Isolation and biochemical characterization of bacterial isolates producing different levels of polygalacturonases from various sources", *African Journal of Microbiology Research*, 6(45), pp. 7259-7264.
- [5]. Kashyap D.R., Vohra S.P.K., Chopra, Tewari R. (2001), "Applications of pectinases in the commercial sector", *Bioresource Technology*, 77, pp. 215-227.

ISOLATION AND SELECTION OF PECTINOLYTIC BACTERIAL STRAINS FROM FRUIT PEELS

Pham Thi Ngoc Lan¹, Ngo Thi Bao Chau^{1*}, Ngo Thi Minh Thu²

¹University of Sciences, Hue University

²Duy Tan University

* Email: baochau1601@gmail.com

ABSTRACT

Bacterial strains capable of pectinase activity from several fruit peels have been studied. The results showed that the number of pectinolytic bacteria ranged from 0.12×10^8 to 13.52×10^8 CFU/g. Among 120 bacterial strains isolated from pectin – rich fruits, 3 strains with high pectinase activity, namely M70, M82 and M84, were selected; their ring diameter of clear zones were 21.67 mm, 21.83 mm and 22.67 mm, respectively. The preliminary studies revealed that the optimal culture conditions for pectinase biosynthesis and biomass accumulation of those 3 isolates were 72 hours of culture and medium pH 6.5.

Keywords: Bacterial, isolation, pectinase, selection.



Phạm Thị Ngọc Lan sinh ngày 01/01/1963 tại Hà Tĩnh. Năm 1984, bà tốt nghiệp cử nhân Sinh học tại trường Đại học Tổng hợp Huế. Năm 1995, bà tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành Hóa sinh – Sinh lý thực vật tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Năm 2004, bà tốt nghiệp tiến sĩ chuyên ngành Sinh lý thực vật tại Đại học Huế. Từ năm 1984 đến nay, bà là giảng viên tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Vi sinh vật học, Vi sinh môi trường, Ứng dụng vi sinh vật trong sản xuất, Phân bón Vi sinh, Enzyme vi sinh vật.



Ngô Thị Bảo Châu sinh ngày 16/01/1987 tại Thừa Thiên Huế. Năm 2009, bà tốt nghiệp cử nhân ngành Sinh học tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Năm 2017, bà tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Hiện nay, bà làm nghiên cứu viên tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa sinh, vi sinh.



Ngô Thị Minh Thu sinh ngày 08/06/1983 tại thành phố Huế. Bà tốt nghiệp cử nhân ngành Sinh học năm 2005 tại Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Năm 2011, bà nhận bằng thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ Sinh học tại Học viện Công nghệ Sinh học, trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hoa Đông, Trung Quốc. Hiện nay, bà là giảng viên tại Đại học Duy Tân, Đà Nẵng.

Lĩnh vực nghiên cứu: Sinh lý thực vật và Công nghệ sinh học.

