

## Bước đầu nghiên cứu một số tính chất của CMC-ase ngoại bào được sinh tổng hợp từ chủng xạ khuẩn A-2026

Nguyễn Quỳnh Uyên<sup>1,\*</sup>, Vũ Thị Phương<sup>1</sup>, Phan Thị Hà<sup>1</sup>,  
Nguyễn Huỳnh Minh Quyên<sup>1</sup>, Trần Quốc Việt<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Phòng Công nghệ Protein-Enzyme, Viện Vi Sinh vật và Công nghệ Sinh học, ĐHQGHN,  
144 Xuân Thủy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Bộ môn Dinh dưỡng thức ăn chăn nuôi và đồng cỏ, Viện chăn nuôi

Nhận ngày 29 tháng 7 năm 2009

**Tóm tắt.** Từ 130 chủng xạ khuẩn hiện đang được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, chúng tôi đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn A-2026 có hoạt tính sinh tổng hợp CMC-ase ngoại bào tốt nhất. Chủng xạ khuẩn này bước đầu được quan sát hình thái trên kính hiển vi quang học Olympus X41. Một số tính chất của enzyme do chủng xạ khuẩn này sinh tổng hợp đã được xác định: pH 6 là pH thích hợp, bị ức chế bởi  $\text{Ni}^{2+}$  và EDTA (với cả hai nồng độ 5 và 10 mM) và đó là một enzyme khá bền nhiệt. Bước đầu tinh sạch enzyme qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G-50, chúng tôi đã thu được ba đỉnh có hoạt tính CMC-ase với độ sạch tương ứng là 1,2; 2,9 và 5,1 lần.

**Từ khóa:** CMC-ase, độ bền nhiệt, sắc ký

### 1. Mở đầu

CMC là một trong những dẫn xuất quan trọng nhất của cellulose, được hình thành từ phản ứng este hoá và có thể tan trong nước nhờ vào các nhóm thế hoá học. CMC-ase cắt liên kết  $\beta$ -1,4-glucoside một cách ngẫu nhiên, làm giảm mức độ polymer hoá, dẫn đến giảm độ nhớt của CMC, nên CMC thường được sử dụng với vai trò cơ chất để xác định hoạt độ của enzyme này [1]. Nói chung, CMC-ase được sinh tổng hợp bởi nấm, vi khuẩn và động vật nguyên sinh. Trong đó, nấm và xạ khuẩn (đặc biệt là xạ khuẩn) là hai nhóm có khả năng sinh

tổng hợp CMC-ase tốt nhất. Phần lớn CMC-ase sản xuất trên quy mô thương mại phục vụ cho một số lĩnh vực công nghiệp thu được từ các loài xạ khuẩn ưa nhiệt như *Thermomyces lanuginosus*. Những loài xạ khuẩn thuộc nhóm này sinh tổng hợp CMC-ase bền nhiệt và có khả năng xúc tác cho phản ứng ở nhiệt độ cao nên có nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực công nghiệp hiện nay [2].

Việc ứng dụng cellulase nói chung và CMC-ase nói riêng trong nông nghiệp, chủ yếu trong chăn nuôi để tăng hiệu quả sử dụng thức ăn, sản xuất thức ăn dễ tiêu hoá cho động vật (đặc biệt là động vật còn non) là một trong những vấn đề đang được quan tâm hiện nay. Chính vì lý do trên và để góp phần vào việc

\* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-4-37547694.  
E-mail: [uyennq@vnu.edu.vn](mailto:uyennq@vnu.edu.vn)

khai thác nguồn tài nguyên vi sinh vật phong phú đa dạng của Việt nam, trong bài báo này chúng tôi đã bước đầu nghiên cứu CMC-ase ngoại bào được sinh tổng hợp bởi các chủng xạ khuẩn hiện được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Cụ thể là, sau quá trình tuyển chọn chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh tổng hợp CMC-ase ngoại bào, chúng tôi đã sơ bộ xác định hình thái của chủng này trên kính hiển vi quang học Olympus X41. Sau đó, enzyme CMC-ase ngoại bào thu được từ quá trình lên men của xạ khuẩn được sơ bộ xác định một số tính chất và bước đầu tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G-50.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp

### 2.1. Nguyên liệu

Các chủng vi sinh vật hiện được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Hoá chất: của hãng VWR và hãng Sigma, đạt độ tinh sạch cần thiết dùng cho nghiên cứu phân tích.

### 2.2. Phương pháp

- Xác định hoạt độ phân giải CMC-ase theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (có CMC 0,1%) và hoạt tính enzyme được thể hiện qua vòng sáng quanh giếng [3].

- Xác định hoạt độ phân giải CMC-ase theo phương pháp DNS [3]: Cho vào ống thí nghiệm 150 µl mẫu enzyme giữ 5 phút tại 50°C, sau đó bổ sung 150 µl cơ chất CMC 1% đã đạt nhiệt độ 50°C. Ủ enzyme và cơ chất tại 50°C trong 30 phút. Bổ sung 900 µl dung dịch DNS, sau đó đun sôi 5 phút và làm lạnh nhanh dưới vòi nước chảy. Khi ống thí nghiệm đã đạt nhiệt độ

phòng, tiến hành đo độ hấp phụ ở bước sóng 540 nm. Bổ sung dung dịch DNS vào mẫu enzyme trong ống kiểm tra để bất hoạt, sau đó bổ sung cơ chất. Tiến hành đun sôi và làm các bước tiếp theo giống như ống thí nghiệm.

### Cách tính hoạt độ CMC-ase:

Một đơn vị hoạt độ của enzyme CMC-ase được định nghĩa là lượng enzyme giải phóng đường khử với tốc độ 1 µmol/phút dưới điều kiện thí nghiệm.

Hoạt độ CMC-ase được tính theo công thức sau:

$$\text{Hoạt độ (U/ml)} = \frac{(C_{\text{TN}} - C_{\text{DC}}) \times D \times 1000}{T \times V}$$

Trong đó:

$C_{\text{TN}}$ : số đọc từ đường chuẩn glucose của ống thí nghiệm, µmol/l

$C_{\text{DC}}$ : số đọc từ đường chuẩn glucose của ống đối chứng, µmol/l

D: độ pha loãng của mẫu

V: thể tích mẫu của phản ứng (0,15 ml)

T: thời gian phản ứng (30 phút)

- Xác định độ bền với nhiệt: mẫu enzyme được xử lý ở 60°C trong các khoảng thời gian nhất định và sau đó xác định hoạt độ CMC-ase theo phương pháp DNS [3].

- Xác định ảnh hưởng của kim loại và EDTA đến hoạt tính CMC-ase: các kim loại và EDTA được trộn với enzyme theo tỷ lệ 1:1 (v/v) sao cho nồng độ cuối cùng của kim loại và EDTA trong giếng là 5 mM, 10 mM và 50 mM tùy vào từng loại và được ủ tại nhiệt độ 37°C trong 2 giờ. Sau đó, hỗn hợp này được nhỏ vào các giếng thạch tương ứng và ủ trong 4 giờ tại 37°C. Tính ức chế hoặc không ức chế của ion kim loại và EDTA được thể hiện ở vòng sáng quanh giếng sau khi nhuộm với Lugol.

- Xác định nồng độ protein theo phương pháp Bradford [4].

- Sắc ký lọc gel: mẫu enzyme (1,5 ml) được dùng để chạy sắc ký với điều kiện như sau: cột nhồi gel Sephadex G-50 có kích thước: 80 x 1,2 cm; đệm phosphat 20 mM pH 7,0; tốc độ chảy 18 ml/h; phân đoạn: 2 ml.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn sinh CMC-ase ngoại bào

Từ 130 chủng xạ khuẩn hiện đang được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, chúng tôi đã tiến hành tuyển chọn những chủng có khả năng sinh CMC-ase ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Dựa trên kết quả đánh giá sơ bộ hoạt tính enzyme CMC-ase của 130 chủng này, chúng tôi quyết định tuyển chọn chủng A-2026 cho những nghiên cứu tiếp theo do những ưu điểm sau:

(i) chủng có hoạt tính enzyme cao nhất trong số các chủng thí nghiệm

(ii) chủng có khả năng sinh trưởng và biểu hiện hoạt tính CMC-ase trong dải nhiệt độ rộng ( $20^{\circ}\text{C}$ - $55^{\circ}\text{C}$ ) và pH rộng (4-10) (kết quả không trình bày ở đây).

Các thông số như nhiệt độ, môi trường và thời gian nuôi cấy của chủng xạ khuẩn A-2026 đã được tối ưu hóa (kết quả không trình bày ở đây) nhằm thu được CMC-ase ngoại bào tốt nhất sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### 3.2. Nghiên cứu hình thái chủng A-2026

Chủng xạ khuẩn A-2026 được nuôi cấy trên đĩa thạch và sau 5 ngày nuôi cấy, chủng này được chụp ảnh trên kính hiển vi quang học Olympus X41 với độ phóng đại 100 lần (hình 1). Sau khi quan sát hình thái của chủng A-2026 và so sánh với các chủng xạ khuẩn đã biết, chúng

tôi thấy chủng này có nhiều đặc điểm giống với chi xạ khuẩn hiếm *Nocardia* như bề mặt khuẩn lạc nhẵn, không hình thành sợi khí sinh, cấu trúc sợi cơ chất dạng cành cây và có hiện tượng đứt gãy ở các khuẩn lạc đã trưởng thành [5]. Ở một số điều kiện sinh trưởng đặc biệt (ví dụ như nhiệt độ cao), chủng A-2026 thậm chí hoàn toàn không hình thành cấu trúc sợi cơ chất.



Hình 1. Sợi cơ chất của chủng A-2026.

Dựa trên đặc điểm hình thái nêu trên, chúng tôi sơ bộ xếp chủng A-2026 vào chi *Nocardia*. Tuy nhiên, để có thể định danh một cách chính xác cần phải giải trình tự gen mã hoá cho 16S rRNA của chủng này.

#### 3.3. Một số tính chất của CMC-ase ngoại bào được sinh tổng hợp bởi chủng xạ khuẩn A-2026

##### 3.3.1. pH thích hợp

Chúng tôi đã tiến hành xác định hoạt độ CMC-ase bằng phương pháp DNS. Cơ chất CMC 1% được pha trong đệm Britton 50 mM, pH từ 4 - 11 (bảng 1). Như vậy pH tối ưu của enzyme này là 6.

Bảng 1. Hoạt độ của CMC-ase ngoại bào của chủng A-2026 ở các pH khác nhau.

| Ph             | 4   | 5   | 6    | 7   | 8   | 9   | 10  | 11 |
|----------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|----|
| Hoạt độ (U/ml) | 6,3 | 7,9 | 12,3 | 9,5 | 4,2 | 0,9 | 0,6 | 0  |

### 3.3.2. Độ bền nhiệt

Dịch nuôi cấy chứa CMC-ase ngoại bào được tiến hành xử lý nhiệt ( $60^{\circ}\text{C}$ ) trong các khoảng thời gian khác nhau từ 5 đến 70 phút, tuy nhiên hoạt độ của CMC-ase ngoại bào này không bị giảm (kết quả không trình bày ở đây). Để khẳng định thêm độ bền nhiệt của enzyme này, dịch nuôi cấy có chứa CMC-ase tiếp tục được xử lý ở  $100^{\circ}\text{C}$  trong 5, 10, 15 và 30 phút. Kết quả cho thấy, sau khi xử lý ở  $100^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút, hoạt tính CMC-ase vẫn còn khoảng 10% so với hoạt độ chưa xử lý (bảng 2) và mất hoàn toàn sau 10 phút xử lý. Từ kết quả trên có thể thấy rằng, CMC-ase ngoại bào của chủng A-2026 là enzyme tương đối bền nhiệt.

Bảng 2. Hoạt độ CMC-ase tại  $100^{\circ}\text{C}$ .

| Thời gian xử lý tại $100^{\circ}\text{C}$ | Hoạt độ enzyme (U/ml) |
|-------------------------------------------|-----------------------|
| 0                                         | 12,3                  |
| 5                                         | 1,3                   |
| 10                                        | 0                     |
| 15                                        | 0                     |
| 30                                        | 0                     |

### 3.3.3. Ảnh hưởng của một số kim loại và EDTA đến hoạt độ của enzyme

Một số ion kim loại kiềm  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  (ion  $\text{Ca}^{2+}$  thường đóng vai trò hoạt hoá hoặc làm bền enzyme ngoại bào) và một số ion kim loại  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  (thường ức chế hoạt tính enzyme CMC-ase ở một số loài [2, 6, 7]) cũng như EDTA (chất tạo phức với ion trị II trong enzyme và ức chế hoạt tính của enzyme) đã được lựa chọn để xác định ảnh hưởng của chúng đối với CMC-ase ngoại bào của chủng A-2026 (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của một số ion kim loại và EDTA đến hoạt động của CMC-ase ngoại bào của chủng A-2026.

| Hóa chất        | Nồng độ | Mức độ ức chế |
|-----------------|---------|---------------|
| $\text{CaCl}_2$ | 5 mM    | 0             |
|                 | 50 mM   | 0             |
| $\text{CoCl}_2$ | 5 mM    | +             |
|                 | 10 mM   | +             |

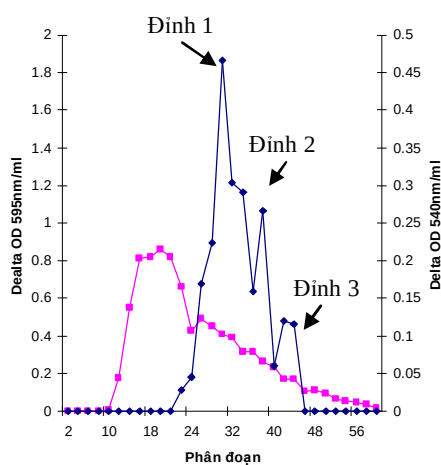
|                 |       |      |
|-----------------|-------|------|
| EDTA            | 5 mM  | +++  |
|                 | 10 mM | ++++ |
| $\text{HgI}_2$  | 5 mM  | +    |
|                 | 10 mM | +    |
| KCl             | 5 mM  | 0    |
|                 | 50 mM | +    |
| $\text{MnCl}_2$ | 5 mM  | +    |
|                 | 50 mM | +    |
| $\text{NiCl}_2$ | 5 mM  | ++   |
|                 | 10 mM | +++  |

Kí hiệu: (0) không ức chế; (+) ít ức chế; (++) ức chế trung bình; (+++) ức chế mạnh; (++++); ức chế hoàn toàn

Qua kết quả trình bày trên bảng 3, chúng tôi nhận thấy:  $\text{Ca}^{2+}$  không có biểu hiện ức chế hoạt động của CMC-ase;  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  với các nồng độ nghiên cứu có ảnh hưởng nhưng không rõ rệt tới hoạt tính enzyme. Ngược lại, EDTA và  $\text{NiCl}_2$  lại ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính của CMC-ase (EDTA với nồng độ 10 mM đã ức chế hoàn toàn hoạt tính enzyme). KCl cũng ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme này, nhưng ở mức độ thấp hơn. Mức độ ảnh hưởng phụ thuộc vào nồng độ của ion và hoá chất. Nồng độ EDTA,  $\text{Ni}^{2+}$  cao ức chế hoạt động của enzyme mạnh hơn. EDTA được biết đến là chất ức chế hoạt động của nhiều enzyme do nó tạo phức càng của với ion kim loại hóa trị II trong trung tâm hoạt động. Kết quả trên gợi ý rằng, trong trung tâm hoạt động của CMC-ase ngoại bào của chủng A-2026 có chứa ion kim loại hóa trị II. Đặc biệt,  $\text{Hg}^{2+}$  là ion ức chế hoạt động của hầu hết các enzyme, nhưng với CMC-ase ngoại bào của chủng A-2026,  $\text{HgI}_2$  với nồng độ 5 và 10 mM lại ảnh hưởng không đáng kể đến hoạt tính của nó.

### 3.4. Tinh sạch CMC-ase ngoại bào của chủng A-2026

Sắc ký lọc gel qua cột Sephadex G-50 đã được sử dụng để tinh sạch bước đầu CMC-ase ngoại bào được sinh tổng hợp từ chủng xạ khuẩn A-2026 (hình 2). Sau khi qua cột Sephadex G-50, từ dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn A-2026 chứa CMC-ase ngoại bào đã tách được 2 đỉnh protein, trong đó đỉnh thứ hai là đỉnh có hoạt tính.



Hình 2. Phổ sắc ký lọc gel mẫu enzyme ngoại bào thu được từ chủng xạ khuẩn A-2026.

Điều kiện sắc ký: Kích thước cột: 80 x 1,2 cm; vận tốc chảy: 18ml/h; phân đoạn: 2ml; thể tích mẫu: 1,5 ml; hoạt độ phân giải CMC: OD 540nm (xác định theo phương pháp DNS); protein: OD 595nm (xác định theo Bradford).

Hỗn hợp của 200  $\mu$ l từ các phân đoạn có hoạt tính (gọi là mẫu xuống cột) được xác định hoạt độ CMC-ase bằng phương pháp DNS và xác định protein tổng số bằng phương pháp Bradford. Bên cạnh đó, hoạt độ CMC-ase và protein tổng số của từng đỉnh cũng được xác định song song với mẫu lên cột và xuống cột. Bảng tổng kết sắc ký được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả tinh sạch enzyme CMC-ase ngoại bào của chủng A-2026 qua cột Sephadex G-50

| Mẫu       | Protein tổng số (mg) | Hoạt độ (U/ml) | Hoạt độ tổng số (U) | Hoạt độ riêng (U/mg protein) | Hiệu suất (%) | Số lần tinh chế |
|-----------|----------------------|----------------|---------------------|------------------------------|---------------|-----------------|
| Lên cột   | 3,077                | 1917           | 2876                | 935                          | 100           | 1,0             |
| Xuống cột | 1,328                | 154            | 3696                | 2783                         | 43            | 3,0             |
| Đỉnh 1    | 1,046                | 76             | 1140                | 1090                         | 34            | 1,2             |
| Đỉnh 2    | 0,155                | 107            | 428                 | 2763                         | 5             | 3,0             |
| Đỉnh 3    | 0,127                | 121            | 605                 | 4776                         | 4             | 5,1             |

Sau khi qua cột sắc ký lọc gel, dịch nuôi cấy chứa enzyme CMC-ase ngoại bào của chủng A-2026 đã loại được một đỉnh protein tạp. Ngoài ra, phần có hoạt tính lại được tách thành ba đỉnh, trong đó đỉnh thứ ba có độ tinh sạch lớn nhất (độ tinh sạch 5,1 lần). Do trong một loài cũng có thể chứa nhiều enzyme CMC-ase, nên phải chăng ba đỉnh này tương ứng với ba loại enzyme CMC-ase ngoại bào khác nhau? Để làm rõ thêm điều này, các đỉnh mang hoạt tính cần được tinh sạch thêm và được kiểm tra lại bằng điện di trên gel có cơ chất.

#### 4. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1) Chủng xạ khuẩn A-2026 là chủng có khả năng sinh tổng hợp CMC-ase tốt nhất trong số 130 chủng xạ khuẩn được nghiên cứu.

2) Enzyme ngoại bào thu được từ chủng xạ khuẩn A-2026 có pH thích hợp là 6 và đó là một enzyme ngoại bào tương đối bền nhiệt.

3) Enzyme ngoại bào thu được từ chủng xạ khuẩn A-2026 bị ức chế bởi  $\text{Ni}^{2+}$  và EDTA với cả hai nồng độ 5 mM và 10 mM

4) Bước đầu tinh sạch enzyme ngoại bào của chủng xạ khuẩn A-2026 qua sắc ký lọc gel Sephadex G-50 thu được 3 đỉnh có hoạt tính CMC-ase với độ sạch tăng 1,2; 2,9 và 5,1 lần tương ứng.

### Lời cảm ơn

Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài thuộc Chương trình trọng điểm và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đến năm 2020.

### Tài liệu tham khảo

- [1] L.R. Lynd, P.J. Weimer, W.H.V. Zyl and I.S. Pretorius, Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology, *Microbiol Mol Biol Rev* (2002) 507.
- [2] Y. J. Lee, B.K. Kim, B.H. Lee, K.I. Jo, N.K. Lee, C.H. Chung, Y.C. Lee, J.W. Lee, Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull, *Bioresour Technol.* 99 (2007) 378.
- [3] T. K. Ghose, Measurement of cellulase activities, *Pure & Appl Chem* 59(2) (1987) 257.
- [4] M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248.
- [5] S. Miyado, T. Okuda, I. Inouye, T. Goto, et al, *The World of Microorganisms*, (2006) 40.
- [6] K. Moriyoshi, T. Ohmoto, T. Ohe and K. Sakai, Purification and characterization of an endo-1,4- $\beta$ -glucanase from *Neisseria sicca* Sb that hydrolyzes  $\beta$ -1,4- linkages in cellulose acetate, *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(3) (2001) 508.
- [7] O.K. Simeon, W.G. Emma, O.O. Bridget and O.S. Olusola, Purification and Biochemical Characterization of Carboxymethyl Cellulase (CMCase) from a Catabolite Repressive Insensitive of *Bacillus pumilus*, *Int J Agr Biol* 8(2) (2006) 286.

## Primary study on some properties of extracellular CMC-ase, synthesized from actinomycetes A-2026

Nguyen Quynh Uyen<sup>1</sup>, Vu Thi Phuong<sup>1</sup>, Phan Thi Ha<sup>1</sup>,  
Nguyen Huynh Minh Quyen<sup>1</sup>, Tran Quoc Viet<sup>2</sup>

Laboratory of Protein-Enzyme Technology, Institute of Microbiology and Biotechnology, VNU,  
144 Xuan Thuy, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>National Institute of Animal Husbandary

Among 130 actinomycetes strains, stored at Vietnam Type Culture Collection, Vietnam National University Hanoi, strain A-2026 has been selected regarding the extracellular CMC-ase. This strain has been primary studied the morphology by optical microscope Olympus X41. pH 6 is the optimum pH of this enzyme. The CMC-ase is inhibited by  $\text{Ni}^{2+}$  and EDTA (with the both of concentration of 5 và 10 mM) and this enzyme is thermo-stable. This extracellular CMC-ase has been purified primarily through gel filtration Sephadex G-50 and as a result three protein peaks with CMC-ase activity have been obtained. The purity of these peaks has been increased 1.2, 2.9 and 5.1 times.

**Keywords:** CMC-ase, thermo-stability, chromatography.