

SÀNG LỌC VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM VI KHUẨN *Enterococcus faecalis* MDs4 SINH GELATINASE

Phạm Mỹ Dung⁽¹⁾, Phạm Công Hoạt⁽²⁾,

Đinh Thị Mỹ Linh⁽³⁾ và Nguyễn Thị Thanh⁽¹⁾

¹ Viện Nông nghiệp và Tài nguyên, Trường Đại học Vinh

² Bộ Khoa học và Công nghệ

³ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 23/4/2020, ngày nhận đăng 19/6/2020

Tóm tắt: Gelatinase là một enzyme thuộc nhóm metalloprotease ngoại bào có khả năng thủy phân gelatin, collagen, elastin... được sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp chế biến, công nghệ thực phẩm và trong nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, 216 chủng vi khuẩn phân lập từ da cá bị bệnh được khảo sát khả năng sinh gelatinase. Kết quả đã sàng lọc được 11 chủng (5,09%) vi khuẩn có hoạt tính gelatinase. Hoạt tính gelatinase dao động từ 0,3 đến 0,64 U/ml, trong đó chủng vi khuẩn MD4 có khả năng tổng hợp gelatinase cao nhất $0,64 \pm 0,11$ U/ml. Chủng vi khuẩn MD4 phát triển tốt trên môi trường MPA; dải nhiệt độ từ $25 \div 45^\circ\text{C}$; pH $4,0 \div 10,0$; nồng độ NaCl từ $0,5 \div 5\%$; tối ưu ở 37°C , pH 7,0 và nồng độ NaCl 4%. Chủng vi khuẩn MD4 là chủng vi khuẩn gram dương, tế bào hình cầu, không sinh bào tử và không có khả năng di động trên môi trường MPA. Dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA, tỉ lệ tương đồng của chủng MD4 với loài *Enterococcus faecalis* NBRC 100480 là 99%, chủng vi khuẩn MD4 được định danh là *Enterococcus faecalis* MD4, mã số truy cập trên GenBank là MG982575.1.

Từ khóa: Vi khuẩn; *Enterococcus faecalis*; gelatin; gelatinase.

1. Đặt vấn đề

Gelatinase được nghiên cứu nhiều hiện nay do khả năng thủy phân gelatin, pheromone, collagen, casein và fibrinogen... thành các axit amin mà không gây hiện tượng chuyển dạng đồng phân của các axit amin. Đây là nguyên nhân làm mất hoạt tính của axit amin [6]. Cụ thể, enzyme ngoại bào này có khả năng làm giảm hầu hết các thành phần ngoại bào và là chất trung gian quan trọng trong việc tái tạo mô sinh lý trong quá trình điều trị bệnh lý ung thư. Trong công nghiệp thực phẩm, gelatinase được ứng dụng để thủy phân da bò, da cá... Gelatinase được tìm thấy nhiều ở người, động vật và vi khuẩn. Ở vi khuẩn, rất nhiều nghiên cứu được tiến hành về khả năng sinh tổng hợp gelatinase như *Bacillus* spp. [1], *Bacillus halodurans* [3], *Bacillus subtilis* BS1, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*. Nguồn gelatinase này cũng có khả năng thủy phân gelatin [10]. Trong số các gelatinase sinh tổng hợp từ vi khuẩn, chủng *Enterococcus faecalis* được nghiên cứu nhiều nhất. Gelatinase từ *Enterococcus faecalis* thuộc họ metalloendopeptidase M4, là enzyme chịu nhiệt, có thể thủy phân casein, hemoglobin, insulin, fibrinogen, collagen, gelatin và một số loại protein [2], [7]. Đáng chú ý, một số nghiên cứu báo cáo vi khuẩn có nguồn gốc từ cá bị bệnh hoặc từ nguồn gelatin đang bị phân hủy thường thể hiện hoạt tính gelatinase cao và ái lực mạnh đối với cơ chất gelatin từ da cá [9].

Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn được phân lập từ da cá nước ngọt bị bệnh được sàng lọc như là nguồn gen mã hóa gelatinase thích hợp cho thủy phân gelatin

từ da cá. Nghiên cứu góp phần cung cấp thêm dữ liệu về nguồn gen các chủng vi sinh vật tổng hợp gelatinase tự nhiên. Từ đó tạo chủng tái tổ hợp sinh tổng hợp gelatinase hiệu quả và ứng dụng gelatinase tái tổ hợp trong thủy phân da cá.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 216 chủng vi khuẩn được nhận từ bộ sưu tập giống của Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội. Môi trường MPA (g/L): cao thịt 3; pepton 5; NaCl 5; agar 20; nước 1000 ml; pH: 6,5 ÷ 7. Môi trường tuyển chọn vi sinh vật có khả năng sinh gelatinase (g/L): gelatin 15; peptone 4; cao nấm men 1; agar 15. Môi trường thử khả năng hóa lỏng gelatin (g/L): gelatin 15; peptone 4; cao nấm men; agar 7,5.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Định lượng hoạt tính gelatinase

Phương pháp định lượng hoạt tính gelatinase được thực hiện theo phương pháp của Tran và Nagano (2002). Hỗn hợp phản ứng bao gồm: 0,3 ml gelatin 0,2%; 0,2 ml Tris-HCl 150 mM; pH 7,5; 12 mM CaCl₂; 0,1 ml gelatinase. Hỗn hợp được ủ ở 30°C trong 30 phút. Phản ứng enzym được dừng bằng 0,6 ml HCl 0,1 N. Lượng amin tổng số được xác định bằng hoạt lực của gelatinase, được tính bằng số μ mol leucine tạo ra trong dịch lọc trong 1 phút/ml [8].

- Xác định khả năng hóa lỏng gelatine của dịch nuôi cấy

Các chủng hóa lỏng gelatin được đem nuôi thu dịch lên men trong môi trường MPA để thử hoạt tính gelatinase theo phương pháp của Balan và cộng sự (2012). Cây chủng trên đĩa thạch vào các ống nghiệm chứa 5 ml môi trường thử nghiệm, ống nghiệm ủ ở 37°C. Sau 48 giờ nuôi cấy, chuyển ống nghiệm vào tủ lạnh 4°C cho đến khi ống nghiệm đối chứng được cấy bởi nước vô trùng đông lại. Nếu gelatine bị thủy phân, môi trường không bị đông [1].

- Phân loại vi khuẩn bằng hình thái và sinh hóa

Đặc điểm hình thái, sinh hoá được quan sát và mô tả theo Sổ tay phân loại Bergey năm 1989 [4].

- Phân loại chủng vi khuẩn được tuyển chọn dựa trên trình tự gen 16S rRNA

Trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F và 1429R có trình tự:

27F	5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3'
1429R	5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3'

Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0%. Kích thước của các đoạn DNA thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang DNA chuẩn 1kb (Thermo Scientific, Mỹ). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PureLink™ - DNA Purification (Invitrogen, Mỹ) và giải trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM®3100 - Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Mỹ) tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trình tự gen 16S rRNA được so sánh với các trình tự tương ứng trên GenBank (NCBI)

nhờ công cụ BLAST. Dùng phần mềm Mega 7 để xây dựng cây phát sinh chủng loại; cây này được thiết lập trên cơ sở khoảng cách di truyền theo Kimura bằng việc sử dụng phương pháp Neighbor-joining. Phân tích giá trị Bootstrap của cây phát sinh chủng loại được tính với 1000 lần lặp.

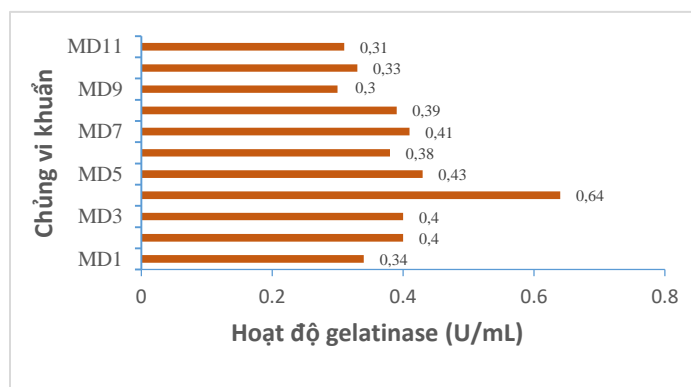
2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Excell 2010.

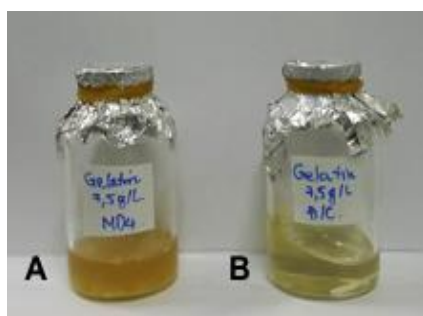
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Sàng lọc khả năng sinh gelatinase từ các chủng vi khuẩn phân lập từ da cá nước ngọt bị bệnh

Trong tổng số 216 chủng vi khuẩn được phân lập từ da cá nước ngọt bị bệnh, 11 chủng (5,09%) vi khuẩn thể hiện khả năng sinh GEL. Hoạt độ gelatinase của 11 chủng có sự khác biệt, dao động từ 0,3 đến 0,64 U/ml. Cụ thể, 72,7% các chủng có hoạt tính trong khoảng $0,3 \div 0,4$ U/ml và 27,3% các chủng có hoạt tính sinh GEL trên 0,4 U/ml; trong đó chủng vi khuẩn MD4 có hoạt tính GEL cao nhất $0,64 \pm 0,11$ U/ml (Hình 1), thể hiện khả năng hóa lỏng thạch gelatin 7,5 g/L (Hình 2). Do đó chủng vi khuẩn MD4 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1: Hoạt tính phân giải gelatin của dịch lên men 11 chủng vi khuẩn được phân lập từ mẫu cá nước ngọt bị bệnh sau 48 giờ nuôi cấy.

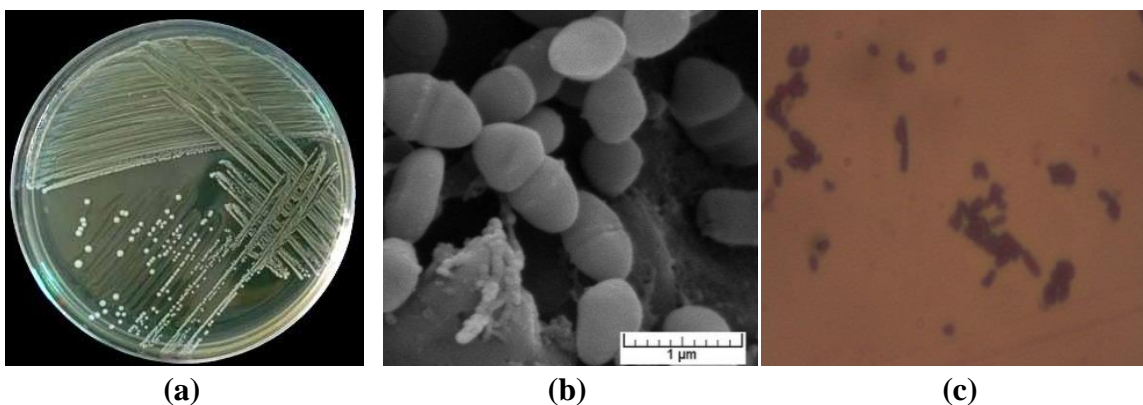


Hình 2: Khả năng thủy phân gelatin (nồng độ 7,5 g/l) sang dạng lỏng của chủng MD4; (A). Hình ảnh môi trường thạch gelatin 7,5g/L bị hóa lỏng sau khi cấy chủng MD4 và ở 30°C trong 48 giờ; (B) Hình ảnh môi trường thạch gelatin 7,5 g/L đối chứng.

Trên thế giới, rất nhiều tác giả đã sàng lọc và khai thác các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp gelatinase từ nhiều nguồn khác nhau. Năm 2012, Shanmugasundaram và cộng sự đã sàng lọc được *Bacillus* spp. có hoạt tính gelatinase ngoại bào đạt tới 2,1 U/ml từ mẫu bùn lắng tại bờ biển Porto Novo [1]. Mahmoud cũng sàng lọc 21 chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy gelatin từ các nguồn lây nhiễm trong dây chuyền sản xuất gelatin, trong đó 17,5% số chủng có hoạt tính thủy phân gelatin mạnh (đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn 2cm) [6]. Từ 30 mẫu thu thập từ da cá, thùng chứa, sàn nhà và dụng cụ chế biến cá ở bến tàu ở Songkla, các tác giả đã phân lập được 115 chủng vi khuẩn, trong đó có 25 chủng thủy phân gelatin từ da cá với hoạt tính đạt 5,16 đến 41 U/mg protein. Từ các mẫu đất và nước biển tại Brazil, Kumar và cộng sự đã phân lập được 33 chủng có khả năng phân hủy gelatin da cá [5]. Các kết quả trên chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn mang mã gen mã hóa gelatinase thường có khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường chứa cơ chất gelatin (da cá, cơ chất sản xuất gelatin).

3.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng vi khuẩn MD4

Ở nhiệt độ 30°C sau 24 giờ, khuẩn lạc vi khuẩn MD4 có khuẩn lạc tròn không đều, bề mặt bóng, nhót, mặt cắt hình lồi nhọn, mép khuẩn lạc dạng rãnh hình răng cưa, cấu trúc dạng sợi (Hình 3a). Khi nhuộm Gram thấy chủng MD4 bắt màu xanh tím, soi trên kính hiển vi với vật kính x100 thấy hình dạng vi khuẩn là hình cầu hoặc hình bầu dục, liên kết thành cặp hoặc chuỗi (Hình 3c). Quan sát ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét cho thấy vi khuẩn MD4 hình cầu, kích thước tế bào từ 0,5 μm đến 0,7 μm , xếp chuỗi từ hai hay nhiều tế bào (Hình 3b).



Hình 3: Hình ảnh về khuẩn lạc và nhuộm Gram của chủng MD4

Ghi chú: (a) Khuẩn lạc trên môi trường MPA; (b) Tế bào MD4 dưới kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 10000 lần; (c) Nhuộm Gram với độ phóng đại 100 lần.

Chủng vi khuẩn MD4 có khả năng đồng hóa hầu hết các nguồn đường, ngoại trừ maltose, caprate và adipate. Bên cạnh đó, chủng MD4 có khả năng sử dụng đa số nguồn nitơ như L-phenylalanin, L-tryptophan, L-arginin, L-valin và L-threonin. Chủng không có khả năng sử dụng các nguồn nitơ L-asparagin monohydrat, L-histidine monohydrate, L-leucin, L-isoleucin, L-methionin, L-lysin. Chủng MD4 có khả năng sinh trưởng ở dải

hiệt độ rộng, từ 20 ÷ 45°C, tối ưu ở 37°C. Chúng phát triển vùng pH từ axit yếu (pH 4,0) đến vùng pH kiềm nhẹ (pH 10,0), tốt nhất ở pH 7,0. Chúng phát triển tốt trên môi trường nồng độ muối 0,5 ÷ 5% và có khả năng phân giải một số chất hữu cơ thử nghiệm là tinh bột, casein và gelatin (Bảng 1).

Đối chiếu các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của chủng MD4 với khóa phân loại Bergey, chủng MD4 có đặc điểm tương đồng với chi *Enterococcus*. So sánh với nhiều nghiên cứu trên các mẫu cá bị bệnh khác nhau cho thấy *Enterococcus* là chi xuất hiện phổ biến [9].

Bảng 1: Khả năng đồng hoá nguồn cacbon và nitơ và đặc điểm sinh trưởng của chủng MD4 sau 2 ngày nuôi cấy ở 37°C.

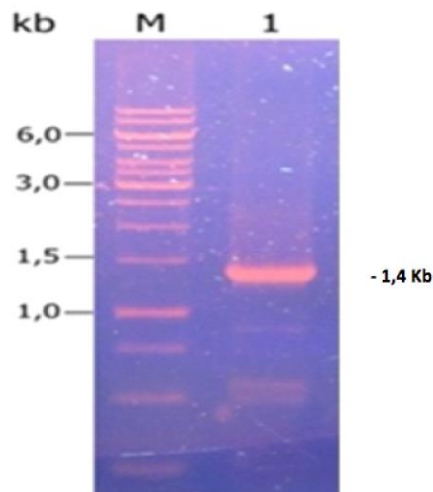
Nguồn cacbon (1,0%, w/v)	Khả năng sinh trưởng	Nguồn nitơ (1,0%, w/v)	Khả năng sinh trưởng
D glucose	+	L-asparagin monohydrate	-
Arabinose	+	L-histidine monohydrate	-
Mannose	+	L-phenylalanin	+
Manitol	+	L-leucin	-
N-acetyl glucosamine	+	L-tryptophan	+
Maltose	-	L-arginin	+
Gluconate	+	L-soleucin	-
Caprate	-	L-valin	+
Adípate	-	L-methionin	-
Malate	+	L-lysin	-
Citrate	+	L-threonin	+
Đối chứng âm	-	Đối chứng âm	-
Đặc điểm	Khả năng sinh trưởng	Khả năng phân giải	
Nhiệt độ sinh trưởng/ tối ưu (°C)	20 ÷ 45°C/37°C	Tinh bột	Có
pH sinh trưởng/ tối ưu	4,0 ÷ 10,0/7,0	Casein	Có
Phát triển ở nồng độ muối (%)	0,5 ÷ 6,0%	Gelatin	Có

Ghi chú: (+) Phát triển tốt bằng hoặc tốt hơn đối chứng dương (D glucose);
 (-) Không phát triển hoặc phát triển yếu hơn đối chứng âm (khoáng)

3.3. Phân loại vi khuẩn dựa trên trình tự gen mã hoá 16S rRNA

Khuếch đại gen 16S rRNA

Kết quả khuếch đại gen 16S rRNA của chủng MD4 cho thấy sản phẩm PCR xuất hiện một băng ADN rất rõ nét và có kích thước khoảng 1,4 kb như mong muốn (Hình 4). Đoạn ADN này sẽ được tinh sạch và giải trình tự để định loài.



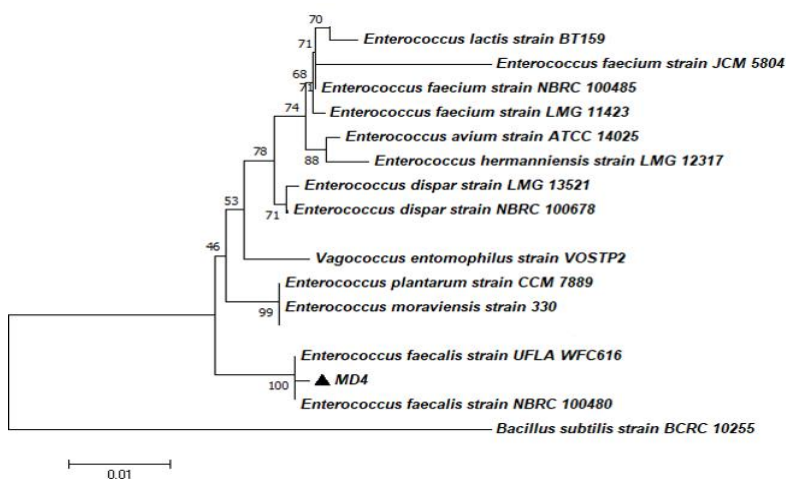
Hình 4. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA trên gel agarose 1,0%
 M: Thang DNA chuẩn 1kb (Thermo Scientific, Mỹ);
 1: Sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA của chủng MD4

Bảng 2: Độ tương đồng trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn MD4 với trình tự gen tương ứng của các chủng được đăng ký trên Genbank (NCBI)

Trình tự gene 16S rRNA của chủng vi khuẩn được so sánh	Mã số truy cập trên GenBank	Độ tương đồng (%)
<i>Enterococcus faecalis</i> UFLA WFC616	KY660402.1	99
<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC 100480	NR_113901.1	99
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	NR_115765.1	99
<i>Enterococcus dispar</i> LMG 13521	NR_114781.2	98
<i>Enterococcus lactis</i> BT159	NR_117562.1	98

Phân tích trình tự gen 16S rRNA

Kết quả phân tích trình tự 16S rRNA và so sánh với trình tự gene đã công bố trên GenBank bằng công cụ BLAST (NCBI) cho thấy chủng MD4 có trình tự tương đồng cao với chủng *Enterococcus faecalis* UFLA WFC616 (99%) và chủng *Enterococcus faecalis* NBRC 100480 (99%) (Bảng 2). Từ cơ sở dữ liệu trên, sử dụng phần mềm Mega 7 để xây dựng cây phát sinh chủng loại; cây này được thiết lập trên cơ sở khoảng cách di truyền theo Kimura bằng việc sử dụng phương pháp Neighbor-joining. Phân tích giá trị Bootstrap của cây phát sinh chủng loại được tính với 1000 lần lặp (Hình 5).



Hình 5: Cây phát sinh chủng loại dựa trên việc so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng MD4 với các trình tự gen tương ứng của các chủng khác trên GenBank.

Dựa vào kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân tích trình tự gen 16S rRNA, chủng vi khuẩn MD4 được định danh là *Enterococcus faecalis* MD4. Trình tự gen 16S rRNA của chủng *Enterococcus faecalis* MD4 được đăng ký trên GenBank (NCBI) với mã số MG982575.1.

Theo các tài liệu, chi *Enterococci* phân bố rộng rãi trong nhiều hệ sinh thái tự nhiên như động vật và con người, đặc biệt chiếm ưu thế trong các sản phẩm lên men sữa truyền thống. Năm 2017, Rahman và cộng sự đã phân lập được 48 chủng thuộc chi *Enterococci* từ các loài cá da trơn, cá rô phi tại Bangladesh. *Enterococcus faecalis* cũng được phân lập từ nhiều mẫu cá bị bệnh trên thế giới như cá rô phi Nile, cá da trơn African, cá chép bạc, cá đối xám [9]. Tuy nhiên, *Enterococcus faecalis* là nguyên nhân hàng đầu gây bệnh nhiễm trùng cơ hội. Một trong những yếu tố độc lực của *Enterococcus faecalis* là tổng hợp gelatinase có hoạt độ cao, phân huỷ nhiều loại protein. Điều này cho thấy sự cần thiết của việc phân lập gen mã hoá và thu nhận gelatinase từ *Enterococcus faecalis* [2].

Trong nghiên cứu này, chủng *Enterococcus faecalis* MD4 có khả năng sinh gelatinase cao hứa hẹn ứng dụng trong công nghiệp chế biến. Do đó cần có những nghiên cứu sâu hơn về tạo chủng và thu nhận enzyme tái tổ hợp.

4. Kết luận

Từ 11 chủng vi khuẩn có hoạt tính gelatinase, đã sàng lọc và tuyển chọn được chủng vi khuẩn MD4 có khả năng tổng hợp gelatinase cao nhất $0,64 \pm 0,11$ U/ml. Chủng vi khuẩn MD4 phát triển tốt trên môi trường MPA, tối ưu ở 37°C, pH 7,0 và nồng độ NaCl 4%. Dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA, chủng vi khuẩn MD4 được định danh là *Enterococcus faecalis* MD4, mã số truy cập trên GenBank là MG982575.1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.S Balan, R. Nethaji, S. Sankar and S. Jayalakshmi, “Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* spp isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2**(3), pp. S1811-S1816, 2012.
- [2] M.F. Del Papa, L.E. Hancock, V. C. Thomas and M. Perego, “Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage”, *Journal of bacteriology*, **189**(24), pp. 8835-8843, 2007.
- [3] A. S. Ibrahim and A. A. Al-Salamah, “Optimization of media and cultivation conditions for alkaline protease production by alkaliphilic *Bacillus halodurans*”, *Research Journal of Microbiology*, **4**(7), pp. 251-259, 2009.
- [4] J. G. Holt and S. T. Williams, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 4, Lippincott Williams & Wilkins, 1989.
- [5] S. Kumar, R. Karan, S. Kapoor and S. Singh, “Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes”, *Brazilian Journal of Microbiology*, **43**(4), pp: 1595-1603, 2012.
- [6] M. S. Mohamed, M. S. Khalil, M. A. Tagrida and Y. A. Mawgoud, “Purification of gelatinase from the bacteria contaminating gelatin production process”, *Research Journal of pharmaceutical biological and chemical sciences*, **8**(4), pp. 914-919, 2017.
- [7] J. Nakayama, S. Chen, N. Oyama and K. Nishiguchi, “Revised model for *Enterococcus faecalis* fsr quorum-sensing system: the small open reading frame fsrD encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD”, *Journal of bacteriology*, **188**(23), pp. 8321-8326, 2006.
- [8] L. Tran and H. Nagano, “Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production”, *Journal of food science*, **67**(3), pp. 1184-1187, 2002.
- [9] M. Rahman, M. M. Rahman, S. C. Deb and M. S. Alam, “Molecular identification of multiple antibiotic resistant fish pathogenic *Enterococcus faecalis* and their control by medicinal herbs”, *Scientific reports*. **7**(1), pp. 3747, 2017.
- [10] M. Shaheen, A. A. Shah, A. Hameed and F. Hasan, “Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1”, *Pak. J. Bot.* **40**(5), pp: 2161-2169, 2008.

SUMMARY

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF GELATINASE PRODUCING *Enterococcus faecalis* MD4

Gelatinase is an extracellular metalloprotease and is capable of hydrolyzing gelatine, collagen, elastin, etc., which is used in processing industries, food technology and research. In this study, 216 bacterial strains isolated from diseased fishes were examined their ability to produce gelatinase. As a result, eleven strains (5.09%) were positive for gelatinase production. Gelatinase activity ranged from 0.3 to 0.64 U/ mL, in which the strain MD4 showed the highest gelatinase activity (0.64 ± 0.11 U/mL). Strain MD4 grew in the range of temperature from 25 to 45°C (optimum at 37°C), pH 4.0 ÷ 10.0 (optimum at pH 7.0), and NaCl concentration from 0.5 to 5% (optimum at 4%). Strain MD4 was characterized as Gram-positive, spheroidal, non-spore-forming, non-spore organism. As a consequence, strain MD4 was selected and genetically identified using 16S rRNA gene sequence analysis. The 16S rRNA sequence of strain *Enterococcus faecalis* MD4 (GenBank accession No. MG982575.1.) shared 99% identity with *Enterococcus faecalis* NBRC 100480.

Key words: Bacteria; *Enterococcus faecalis*; gelatin; gelatinase.