

NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ TINH SẠCH ENZYME NGOẠI BÀO CELLULASE TỪ CHỦNG VI KHUẨN ƯA MẶN *Bacillus* sp. X2

TÔ LAN ANH, NGUYỄN KHÁNH HOÀNG VIỆT, NGUYỄN VĂN HOÀNG,
TÔ VĂN THIỆP, NGUYỄN THỊ NHUNG

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại các vùng ven biển hải đảo, nơi có nhiều đơn vị quân đội đóng quân cũng như các vùng dân cư sinh sống, tình trạng ô nhiễm suy thoái môi trường đang ngày càng trở nên nghiêm trọng. Chất thải phát sinh từ những hoạt động sinh hoạt, sản xuất với hàm lượng các chất hữu cơ cao như cacbonhydrat, protein, cellulose, xylan... thường bị nhiễm mặn, khó phân hủy, tạo điều kiện cho các sinh vật gây bệnh truyền nhiễm như ruồi, bọ, chuột, nấm phát triển cũng như làm ô nhiễm đất, nguồn nước mặt và nước ngầm. Trong đó, các hợp chất cellulose (lignin, cellulose, hemicellulose) là thành phần khó phân hủy sinh học nhất chiếm khoảng 70% theo khối lượng khô trong chất thải hữu cơ [7]. Cellulose cũng là polyme chủ yếu cấu tạo nên thành tế bào thực vật, với cấu trúc dạng bó sợi vững chắc được xây dựng từ các đơn phân D-glucose liên kết với nhau bằng liên kết β -1,4 glycoside [8]. Để phân hủy cấu trúc bó sợi bền vững này, cần có sự kết hợp của 3 loại enzyme cellulase: endoglucanase (EG), exoglucanase (CBH) và β -D-glucosidase (BG) [3, 6].

Trên thế giới, đã có rất nhiều công trình nghiên cứu về tách chiết, tinh sạch cellulase được ứng dụng trong các ngành công nghiệp như sản xuất giấy, thức ăn chăn nuôi, chất tẩy rửa, nhiên liệu sinh học hay enzyme thương mại [1÷3, 5]. Bên cạnh đó, cellulase cũng được bổ sung vào các chế phẩm sinh học xử lý ô nhiễm môi trường, giúp cho quá trình phân hủy các chất thải lignocellulose đạt hiệu quả cao, đồng thời thúc đẩy sự chuyển hóa vật chất trong tự nhiên.

Ở Việt Nam, trong thời gian gần đây, các nghiên cứu về tinh sạch và biểu hiện enzyme cellulase tái tổ hợp cũng đang được chú trọng nhằm sản xuất lượng lớn cellulase ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau [9÷11]. Tuy nhiên, nhìn chung các công trình nghiên cứu về cellulase hoạt động trong nồng độ muối cao chưa có nhiều. Vì vậy, trong bài báo này, nhóm tác giả tiến hành nghiên cứu thu nhận và tinh sạch cellulase có khả năng phân hủy cellulose trong điều kiện mặn, ứng dụng trong sản xuất chế phẩm enzyme xử lý chất thải hữu cơ có độ mặn cao gây ô nhiễm môi trường ven biển hải đảo.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

Chủng vi khuẩn X2 được phân lập từ mẫu nước biển tại vùng biển Hải Phòng.

Hóa chất: Các hóa chất trong nghiên cứu là các hóa chất thường sử dụng cho vi sinh và sinh học phân tử từ các hãng Sigma, Mecrk, Thermo Scientific, GE.

2.2. Thiết bị

Các thiết bị thí nghiệm được sử dụng chủ yếu như: Máy PCR, thiết bị điện di ngang của hãng Bio-rad (Mỹ), hệ thống chụp ảnh điện di Mega bio print của hãng Fisher biotech (Úc), máy ly tâm lạnh của hãng Orto alresa (Tây Ban Nha), thiết bị tinh sạch protein của hãng GE (USA), bộ điện di protein của hãng Cleaver (Mỹ).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng

Tiến hành xác định hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào, khả năng sinh bào tử và xây dựng đường cong sinh trưởng của chủng.

2.3.2. Định danh chủng vi khuẩn và xây dựng cây phát sinh loài

Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số của chủng bằng bộ Kit tinh sạch DNA của hãng ANABIO. Đoạn gene 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR như sau: 95°C trong 3 phút, 30 chu kỳ với các bước: biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi 51°C trong 15 giây, tổng hợp ở 72°C trong 2 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di gel agarose và gửi đi giải trình tự tại Trung tâm 1st BASE (Singapore), sử dụng Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) với cặp mồi 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') và 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Trình tự gene 16S rRNA sau khi giải trình tự được BLAST để tìm ra các chủng có độ tương đồng cao và xây dựng cây phát sinh loài sử dụng phương pháp Neighbor joining trong phần mềm BioEdit.

2.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme cellulase của chủng vi khuẩn X2

Thí nghiệm được tiến hành nhằm khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường ban đầu, nhiệt độ, pH, nồng độ muối tới quá trình thu nhận cellulase ngoại bào của chủng. Chủng được nuôi cấy trong các môi trường: **(1)** CMC 10 g/L; NaCl 30 g/L; pepton 10 g/L; cao nấm men 5 g/L, **(2)** CMC 10 g/L; NaCl 30 g/L; (NH₄)₂SO₄ 1 g/L; K₂HPO₄ 1 g/L; CaCl₂ 0,04 g/L; MgSO₄ 0.3 g/L; cao nấm men 1 g/L, **(3)** CMC 10 g/L; NaCl 30 g/L; glucose 1 g/L; cao nấm men 3 g/L; pepton 5 g/L. Tiến hành thu dịch enzyme ngoại bào của chủng trong các môi trường lựa chọn vào thời điểm 24 h, 48 h, 72 h, 96 h để xác định hoạt tính enzyme, từ đó lựa chọn môi trường và thời điểm thu nhận enzyme. Nuôi cấy chủng trong môi trường nuôi cấy đã lựa chọn, lần lượt xác định hoạt tính enzyme ở các điều kiện nhiệt độ 30°C, 37°C, 40°C, 50°C, các pH 6, 7, 8, 9 và các nồng độ muối là 0; 20; 30; 40; 50 g/L.

2.3.4. Kết tủa protein bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

150 ml dịch enzyme thô được bổ sung từ từ muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa 80%, khuấy đều nhẹ nhàng bằng đũa thủy tinh cho đến khi tan hết. Tiếp tục khuấy thêm 30 phút sau đó đem ly tâm 9000 vòng/phút, 15 phút, 4°C, loại bỏ dịch nổi. Hòa tan kết tủa bằng 10ml dung dịch đệm Tris 20 mM pH 8. Dịch enzyme sau khi hòa tan được tiến hành thẩm tích qua đệm bằng túi thẩm tích kích thước 10 kDa, sử dụng đệm Tris 10 mM pH 8, thay đệm 4 lần trong quá trình thẩm tích.

2.3.5. Tinh sạch enzyme bằng sắc ký trao đổi ion và kiểm tra sản phẩm sau tinh sạch

Cellulase thu nhận được sau khi kết tủa với muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ được tiến hành tinh sạch qua cột XK16 của hãng GE (USA) sử dụng Superloop 10ml, nhựa trao đổi ion âm DEAE, pha động đệm Tris 20 mM pH 8, tốc độ dòng 2 ml/phút. Chương trình chạy tinh sạch cellulase được tiến hành như sau: Cân bằng 5 CV; Rửa cột 4 CV; Rửa giải 5 CV chế độ gradient 0÷100% Tris 20 mM NaCl 2M pH 8; Rửa cột 5 CV; Cân bằng lại 5 CV, trong đó CV là thể tích cột (column volume). Các phân đoạn 2 ml thu được bảo quản ở 4°C và xác định hoạt độ cellulase.

Sản phẩm sau khi tinh sạch được kiểm tra bằng phương pháp điện di biến tính trên gel polyarylamide (SDS-PAGE), so sánh với thang chuẩn kích thước 10÷200 kDa.

2.3.6. Xác định hoạt độ và hoạt tính enzyme

- Định tính enzyme cellulase bằng phương pháp đục lỗ thạch

Chuẩn bị môi trường đĩa peptri gồm có CMC 2 g/L, NaCl 30 g/L, Agar 20 g/L, đục lỗ đường kính 10 mm. Nhỏ 200 μl dịch enzyme thô vào các lỗ thạch, đặt ở 4°C trong 8 tiếng sau đó đặt các đĩa thạch ở điều kiện 37°C qua đêm. Hoạt tính enzyme được xác định qua kích thước vòng phân giải ($D'-d'$, mm). Trong đó D' là đường kính vòng phân giải, d' là đường kính lỗ khoan. Mẫu đối chứng âm sử dụng nước cất thay thế cho dịch enzyme.

- Xác định hoạt độ enzyme

Hoạt độ enzyme được xác định theo phương pháp đường khử-DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) [4]. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ đường khử tạo thành từ quá trình phân cắt phân tử cơ chất CMC của enzym cellulases trong một phạm vi nhất định. Hoạt độ enzyme (U/ml) là lượng enzyme giải phóng ra 1 μmol glucose trong 1 phút.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

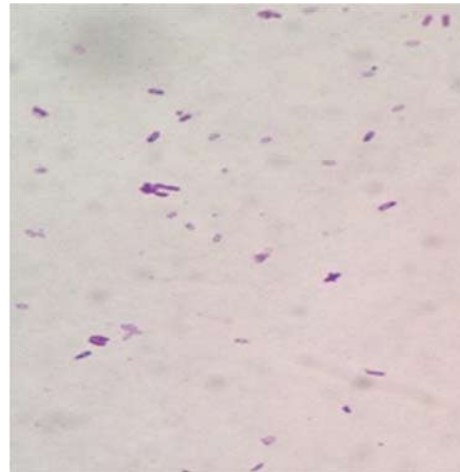
3.1. Khảo sát một số đặc điểm sinh lý sinh hóa và định danh chủng vi khuẩn

3.1.1. Khảo sát một số đặc điểm sinh trưởng của chủng vi khuẩn X2

Chủng vi khuẩn X2 được tiến hành hoạt hóa và nuôi cấy trên môi trường LB bổ sung CMC 10 g/L và NaCl 30 g/L, nuôi ở 37°C, lắc 150 vòng/phút. Kết quả nhuộm Gram cho thấy chủng là vi khuẩn Gram dương, hình que, có khả năng sinh bào tử, phát triển tốt trên môi trường LB với nồng độ NaCl 30 g/L (hình 1).

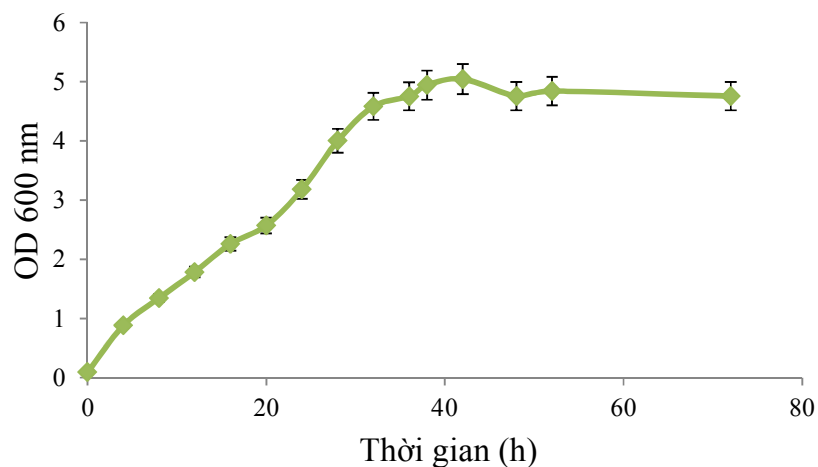


Hình 1a. Hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn X2



Hình 1b. Hình thái tế bào của chủng vi khuẩn X2

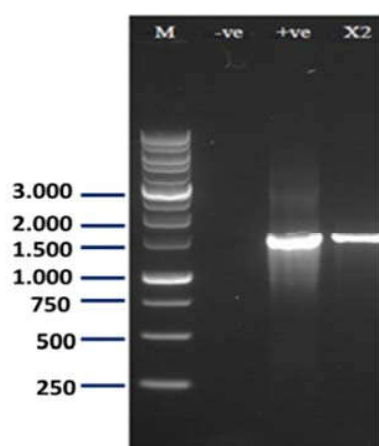
Tiến hành thu dịch nuôi cấy chủng tại các thời điểm khác nhau và đo mật độ quang của dịch ở bước sóng 600nm để khảo sát đường cong sinh trưởng của chủng. Kết quả cho thấy chủng có khả năng thích nghi nhanh trong môi trường nuôi cấy. Mật độ quang tăng mạnh từ sau 12h và đạt cực đại ở 42 h, pha cân bằng từ 36÷48 h (hình 2).



Hình 2. Động học quá trình sinh trưởng của chủng X2 trong môi trường LB

3.1.2. Định danh chủng vi khuẩn X2

Đoạn gen 16S rRNA được nhân PCR với cặp mồi đặc hiệu 27F và 1492R. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên agarose 1% thu được 1 băng có kích thước khoảng 1,5 kb. Trong khi đó mẫu đối chứng âm (không có khuôn DNA) thì không xuất hiện băng nào (hình 3).



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR đoạn gene 16S rRNA chủng vi khuẩn X2

M: Marker

-ve: Mẫu đối chứng âm (dùng nước thay thế cho khuôn DNA)

+ve: Mẫu đối chứng dương (dùng DNA tách chiết từ E.coli làm khuôn)

X2: Sản phẩm PCR đoạn gen 16S rRNA của chủng X2

Trình tự nucleotide có kích thước 1496 bp thu được sau khi giải trình tự được so sánh với các trình tự đã công bố để tìm ra các chủng có độ tương đồng cao với chủng X2 và xây dựng cây phát sinh loài. Kết quả cho thấy, chủng X2 có độ tương đồng cao nhất là 99% so với nhiều chủng *Bacillus licheniformis* DSM 13. Vì vậy, kết luận chủng X2 thuộc chi *Bacillus*, có khả năng thuộc loài *Bacillus licheniformis*, và được đề nghị đặt tên *Bacillus* sp. X2.



Hình 4. Cây phát sinh loài chủng vi khuẩn X2 dựa trên so sánh độ tương đồng của trình tự 16S rRNA

3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính cellulase của chủng *Bacillus* sp. X2

3.2.1. Môi trường nuôi cấy và thời gian thu nhận enzyme

Nuôi cấy chủng trong các môi trường 1, 2, 3 có thành phần dinh dưỡng khác nhau, thời điểm thu dịch enzyme ngoại bào để xác định hoạt tính là 24 h, 48 h, 72 h, 96 h. Hoạt tính enzyme ngoại bào của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. X2 dựa trên kích thước vòng thủy phân trong các môi trường và thời điểm khác nhau được thể hiện trong bảng 1.

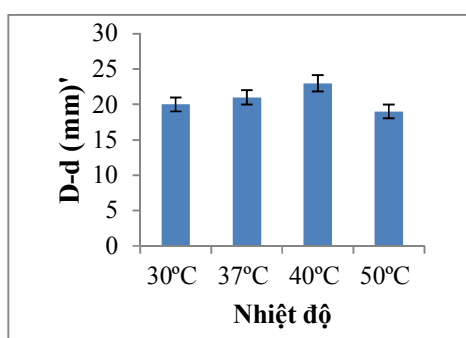
Bảng 1. Hoạt tính cellulase của chủng *Bacillus* sp. X2 ở các môi trường nuôi cấy và thời điểm khác nhau

Môi trường Thời gian	D-d (mm) MT1	D-d (mm) MT2	D-d (mm) MT3
24 h	10	11	10
48 h	15	15	16
72 h	21	19	19
96 h	20	15	17

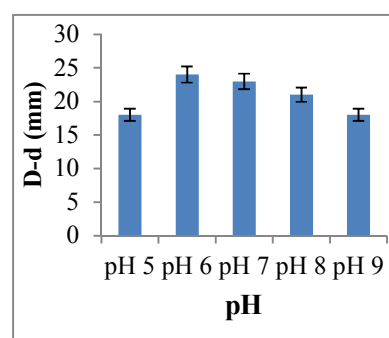
Dựa vào bảng 1 có thể thấy, trong 3 môi trường nuôi cấy, hoạt tính cellulase của chủng được thể hiện tốt nhất ở môi trường 1 là môi trường LB có bổ sung cơ chất CMC 10 g/L, nồng độ muối 30 g/L, hoạt tính đạt cao nhất ở thời điểm 72 h (vòng thủy phân đạt 21 mm). Do đó, nhóm tác giả lựa chọn môi trường 1 cho các nghiên cứu tiếp theo, đồng thời lựa chọn thời điểm 72 h thu nhận dịch enzyme.

3.2.2. Nhiệt độ và pH

Nuôi cấy chủng trong môi trường 1 đã lựa chọn lần lượt ở các nhiệt độ và pH khác nhau, kết quả xác định hoạt tính enzyme được thể hiện ở hình 5.



Hình 5a. Hoạt tính cellulase của chủng *Bacillus* sp. X2 ở các nhiệt độ khác nhau

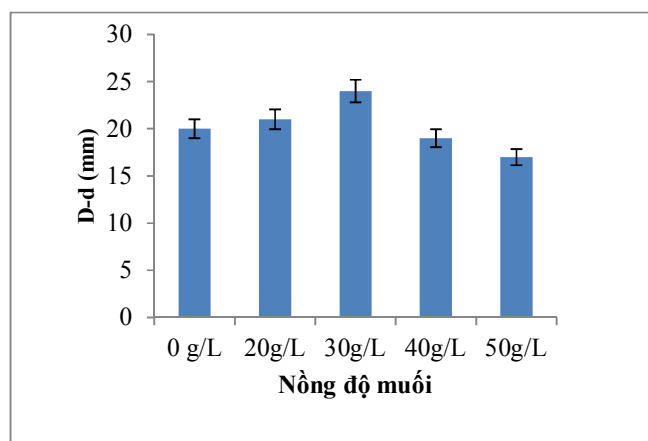


Hình 5b. Hoạt tính cellulase của chủng *Bacillus* sp. X2 ở các pH khác nhau

Với môi trường 1, khả năng thu nhận enzyme ngoại bào của chủng khá tốt ở nhiệt độ 30÷37°C và tốt nhất ở 40°C. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đó về *Bacillus licheniformis* là loài vi khuẩn hiếu khí, ưa ấm. Bên cạnh đó, chủng cũng thể hiện khả năng sinh enzyme ngoại bào tốt trong điều kiện pH từ 5÷9, tuy nhiên pH trung tính 6÷7 là thích hợp nhất cho quá trình thu nhận enzyme ngoại bào. Chủng vi khuẩn *Bacillus sp. X2* là chủng vi khuẩn thích nghi trong môi trường nước biển có pH ≥ 7 , do đó, nhóm tác giả lựa chọn pH 7 và nhiệt độ 40°C để nuôi cấy chủng cho quá trình thu nhận enzyme.

3.2.3. Nồng độ muối NaCl trong môi trường nuôi cấy

Đối với chủng vi khuẩn ưa mặn, nồng độ muối có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh trưởng và sinh enzyme ngoại bào. Nuôi cấy chủng *Bacillus sp. X2* trong môi trường 1, pH 7 và nhiệt độ 40°C, ở các nồng độ NaCl 0; 20; 30; 40; 50 g/L. Kết quả được thể hiện trên hình 6.



Hình 6. Hoạt tính cellulase của chủng *Bacillus sp. X2* ở nồng độ muối khác nhau

Khả năng thu nhận enzyme ngoại bào của chủng đạt hiệu quả tốt trong khoảng nồng độ muối 0÷30 g/L và cao nhất ở nồng độ muối 30 g/L. Tuy nhiên, ở nồng độ muối cao hơn, chủng vẫn có khả năng sinh enzyme ngoại bào tương đối tốt. Vì vậy, chủng phù hợp làm nguồn thu nhận enzyme cho quá trình sản xuất chế phẩm phân hủy chất thải hữu cơ có độ mặn cao tại các vùng ven biển hải đảo.

3.2.4. Nuôi cấy thu nhận enzyme cellulase

Sau quá trình, điều kiện nuôi cấy chủng để thu nhận enzyme được lựa chọn là môi trường LB bổ sung CMC 10 g/L, nồng độ muối 30 g/L, nhiệt độ 40°C, pH 7, thu nhận sau 72h. Kết quả đánh giá hoạt tính cellulase trong môi trường nuôi cấy tối ưu được thể hiện trên hình 3.6 và bảng 3.2. Hoạt độ enzyme sau 72 h là 0,231 U/ml xác định bằng phương pháp đường khử DNS. Hoạt độ enzyme tương đối thấp so với các

nghiên cứu đã công bố trước đây có thể là do thời điểm thu nhận được lượng enzyme nhiều nhất chưa phải là điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzyme. Bên cạnh đó, thời điểm 72h là thời điểm tế bào đang ở pha suy vong, sự phân hủy nội bào giải phóng các enzyme protease phân hủy protein ngoại bào có trong canh trường, làm hoạt độ cellulase giảm.



Hình 7. Hoạt tính cellulase của chủng theo phương pháp đục lỗ

Thời gian	Hoạt độ (U/mL)	D-d (mm)
24 h	0,157	12
48 h	0,176	19
72 h	0,231	24

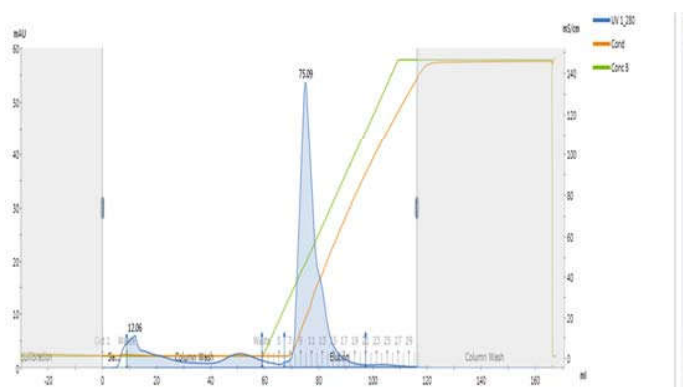
Bảng 2. Hoạt độ và hoạt tính cellulase của chủng trong điều kiện nuôi cấy tối ưu

3.3. Tinh sạch enzyme cellulase

150 ml dịch enzyme thô có hàm lượng protein tổng 2271 mg và hoạt độ tổng 34,65U. Sau kết tủa, 10 ml enzyme thu được đạt hoạt độ 15,8 U với hàm lượng protein là 216,8 mg. Tiến hành tinh sạch enzyme bằng sắc ký trao đổi ion với nhựa DEAE, cân bằng bằng đệm Tris HCl 20 mM pH 8 và rửa giải với Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 2M theo gradient từ 0÷100%. Kết quả thu được 1 peak từ phân đoạn 7 đến 14 trong quá trình rửa giải (hình 3.8). Dịch thu được từ tất cả các giai đoạn của quá trình tinh sạch như rửa cột, rửa giải được giữ lại và xác định hoạt độ cellulase. Kết quả cho thấy chỉ có các phân đoạn từ 7 đến 14 ở giai đoạn rửa giải có hoạt tính cellulase. Các phân đoạn này được gom lại, có hoạt độ tổng là 0,49 U và hàm lượng protein 4,4 mg. Kết quả tinh sạch cellulase được trình bày trên bảng 3.

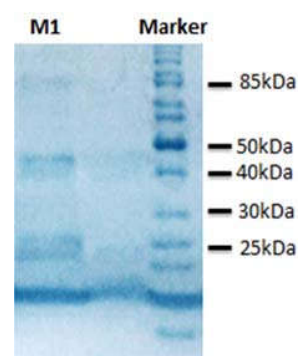
Bảng 3. Mức độ tinh sạch của enzyme cellulase thu nhận từ chủng *Bacillus* sp. X2 ở các phân đoạn khác nhau

Phân đoạn	Hoạt độ tổng (U)	Protein tổng (mg)	Hoạt độ riêng (U/mg)	Độ tinh sạch
Dịch enzyme thô	34,56	2271	0,015	1
Kết tủa muối	15,8	216,8	0,07	4,7
Sắc ký trao đổi ion	0,49	4,4	0,11	7,3



Hình 8. Sắc ký đồ quá trình tinh sạch cellulase bằng sắc ký trao đổi ion

- UV 280 nm (mAU)
- Nồng độ dung dịch rửa giải (%)
- Độ dẫn điện (mS/cm)



Hình 9. Điện di sản phẩm enzyme cellulase sau tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion
M1: Sản phẩm sau tinh sạch
Marker: Thang protein chuẩn

Dịch enzyme thô sau khi kết tủa bằng muối và tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion có độ tinh sạch cao hơn 7 lần so với ban đầu, hoạt độ riêng của enzyme thu được là 0,11 U/mg. Điện di sản phẩm sau tinh sạch thu được cho kết quả trên băng điện di với 2 vạch có kích thước khoảng 45 kDa và 25 kDa, ngoài ra còn có 1 băng mờ có kích thước khoảng 85 kDa (hình 3.9). Điều đó chứng tỏ có thể cellulase của chủng là một hỗn hợp các enzyme với các kích thước khác nhau, nhưng có điện tích tương đối giống nhau do đó chúng chưa thể phân tách hoàn toàn sau quá trình chạy sắc ký trao đổi ion. Các enzyme này có thể mang hoạt tính phân cắt endo- hoặc exo- và đóng vai trò hỗ trợ nhau trong quá trình phân cắt hoàn toàn chuỗi sợi cellulose.

Theo kết quả giải trình tự các chủng thuộc loài *Bacillus licheniformis*, có một số gene mã hóa cho endoglucanase kích thước 79,5 kDa (mã genbank là EID46754), 63,56 kDa (mã genbank là EID46755) và 59,6 kDa (mã genbank là EID46965.1). Một số enzyme cellulase khác từ *Bacillus licheniformis* cũng đã được nghiên cứu có hoạt tính exoglucanase với kích thước 81,02 kDa, hay hoạt tính endoglucanase có kích thước 54,99 kDa (theo *Uniprot.org*). Ngoài ra, các enzyme có kích thước 29 kDa, 37 kDa cũng đã được nghiên cứu về khả năng phân hủy cellulose [2, 5]. Điều đó cho thấy, rất nhiều chủng thuộc loài *Bacillus licheniformis* đã được nghiên cứu có khả năng tổng hợp các loại cellulase khác nhau. Vì vậy, sản phẩm sau tinh sạch trong nghiên cứu này sẽ tiếp tục được phân tách và nghiên cứu các hoạt tính endoglucanase, exoglucanase hay glucosidase phục vụ cho mục đích sản xuất chế phẩm enzyme tái tổ hợp.

4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn sinh cellulase chịu mặn thuộc chi *Bacillus* được đề nghị đặt tên là *Bacillus* sp. X2. Chủng có khả năng sinh tổng hợp cellulase tối ưu trong môi trường LB, ở nồng độ muối 30 g/L, nhiệt độ 40°C, pH 7. Sau tinh sạch cellulase thu được có hoạt độ riêng 0,11 U/mg cao hơn 7 lần so với dịch enzyme thô ban đầu. Kết quả chạy điện di SDS-PAGE sản phẩm sau tinh sạch thu được 3 băng với các kích thước tương ứng 25 kDa, 45 kDa, 85 kDa. Các protein này sẽ tiếp tục được phân tách và nghiên cứu hoạt tính phân hủy cellulose (endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase) tạo tiền đề cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm enzyme cellulase ứng dụng trong xử lý chất thải hữu cơ vùng ven biển hải đảo Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Asha B. M., Sakthive N., *Production, purification and characterization of a new cellulase from Bacillus subtilis that exhibit halophilic, alkalophilic and solvent-tolerant properties*. Microbiol 2014, **64**(4):1839-1848.
2. Azadian F., Arastoo B., Abdolhamid N., Mehdi H., *Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from Bacillus licheniformis AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production*. Molecular Biology Research Communications, 2016, **5**(3):143-155.
3. Lee Y.J., Kim B.K., Lee B.H., Jo. K.I., Lee N. K., Chung C.H., Lee Y.C., Lee J. W., *Purification and characterization of cellulase produced by Bacillus amyloliquefaciens DL-3 utilizing rice hull*, Bioresource Technology, 2008, **99**(2):378-386.
4. Miller G.L., *Use of dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical chemistry, 1959, **31**(3):426-428.
5. Mohamed A. Abdella, Atef M. Ibrahim, *Purification, characterization and cloning of alkaliphilic cellulase - encoding gene (cel12A) from Bacillus licheniformis strain MK7*. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, 2015, **5**(2):1506-1520.
6. Wanga C.Y., Hsieha Y.R., Nga C.C., Chanb H., Linc H.T., Tzenga W.S., Shyu Y.T., *Purification and characterization of a novel halostable cellulase from Salinivibrio sp. strain NTU-05*. Enzyme and Microbial Technology, 2009, **44**(6-7):373-379.
7. *Waste profiling*, Fraunhofer Institute for Building Physics IBP, 2014.
8. Lê Ngọc Tú, *Hóa sinh công nghiệp*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, 2010.

9. Nguyễn Thị Thảo, *Nghiên cứu sàng lọc gene mã hóa enzyme tham gia thủy phân cellulose từ khu hệ vi sinh vật trong ruột mối bằng kỹ thuật metagenomic*. Luận án tiến sĩ, 2014.
10. Trịnh Đ.K., Quyền Đ. T., Nguyễn S.L.T., *Tuyển chọn và nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1*. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2007, p.355-362.
11. Trịnh Đình Khá, *Tinh sạch và nghiên cứu đặc tính của cellulase tự nhiên và tạo cellulase tái tổ hợp từ nấm sợi tại việt nam*. Luận án tiến sĩ, 2015.

SUMMARY

PRODUCTION AND PURIFICATION OF HALOPHILIC CELLULASE FROM *Bacillus* sp. X2

Extracellular cellulase was purified from culture supernatants of the halophilic bacterium X2, which was identified as a *Bacillus* species by analysis of 16S rRNA gene sequence and named as *Bacillus* sp X2. Under optimized conditions, including pH 7.0, 40°C and 30 g/L NaCl, incubation for 72 h in Luria-Bertani medium, the strain *Bacillus* sp. X2 exhibited a maximum production of cellulase. After purification by ion exchange chromatography with DEAE resin, the purified enzyme performed a specific activity of 0,11 U/mg, 7-fold higher than that of the supernatants, and showed 3 bands on SDS-PAGE with molecular weight of 25, 45, 85 kDa, respectively.

Keywords: Halophilic cellulase, purification of cellulase, Bacillus licheniformis.

Nhận bài ngày 24 tháng 8 năm 2017

Hoàn thiện ngày 08 tháng 10 năm 2017

Viện Công nghệ mới, Viện KH-CN Quân sự