

SINH TỔNG HỢP VÀ TÍNH CHẤT CỦA PROTEAZA KIỂM NGOẠI BÀO TỪ *BACILLUS* SP. 20

Ngô Tự Thành, Nguyễn Việt Dũng, Nguyễn Văn Duy
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Proteaza được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất các chất tẩy rửa, chế biến thực phẩm, dược phẩm và các ngành công nghiệp khác... Hầu hết các enzym dùng trong công nghiệp được sản xuất từ vi sinh vật. Lượng proteaza sản xuất từ vi khuẩn được ước tính vào khoảng 500 tấn, chiếm tới 59% tổng số lượng enzym được sử dụng [4].

Với những đặc tính quý hiếm và thích hợp cho nhiều quá trình công nghệ, proteaza kiểm chiếm tỷ lệ lớn trong lượng proteaza nói trên. Việc nghiên cứu enzym này thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học, kể cả những nghiên cứu ở mức độ phân tử [2 - 3, 5 - 7, 10 - 11]. Nhiều chủng *Bacillus* tổng hợp mạnh mẽ proteaza kiểm [1].

Để nghiên cứu một cách có hệ thống về proteaza kiểm từ các chủng vi khuẩn *Bacillus* ở Việt Nam, chúng tôi đã tiến hành phân lập các chủng *Bacillus* ưa kiềm, trong đó có *Bacillus* sp. 20 như đã báo cáo trước đây [8]. Trong báo cáo này, chúng tôi trình bày những kết quả nghiên cứu mới đây về sinh tổng hợp và tính chất của proteaza kiểm của chủng vi khuẩn này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vi sinh vật

Được phân lập trước đây từ đất [8], chủng *Bacillus* sp. 20 được bảo quản trên môi trường Horikoshi & Akiba (HA) thạch nghiêng (xem dưới đây), ở pH 9,5 và nhiệt độ 4°C.

Môi trường

Môi trường HA: pepton 0,5%; cao nấm men 0,05%; glucoza 1%; KH_2PO_4 0,2% và MgSO_4 0,02%. Khử trùng ở 1 atm trong 15 phút. Bổ sung Na_2CO_3 20% (khử trùng riêng) theo tỉ lệ thể tích 3:100; chỉnh pH đến 9,5. Môi trường này được bổ sung thạch để dùng cho bảo quản giống dưới dạng thạch nghiêng, hoặc không bổ sung thạch để dùng như một môi trường gốc, từ đó tạo ra các môi trường khác.

Các môi trường lên men có nguồn nitơ khác nhau: pepton và cao nấm men trong môi trường HA được lần lượt thay bằng gelatin 1%, casein 1%, hỗn hợp gelatin 0,5% + casein 0,5%.

Lên men sinh tổng hợp proteaza

Vi khuẩn được nuôi trong các môi trường lỏng, lắc đều ở tốc độ 180 vòng/ phút và nhiệt độ 30°C. Dịch enzym thô được thu bằng ly tâm ở 5000 x g và nhiệt độ 4°C trong 15 phút.

Xác định khả năng sinh trưởng

Đo sinh trưởng của vi khuẩn bằng phép đo mật độ quang (OD_{600}) trên máy so màu Corning Colorimeter 252.

Xác định hoạt độ proteaza

Hoạt độ proteaza trong các mẫu được xác định theo phương pháp Anson cải tiến [9]. Đơn vị hoạt độ proteaza (U) là lượng enzym xúc tác thủy phân casein (Merck, Đức) thành các sản phẩm có phản ứng màu với thuốc thử Folin - Ciocalteu, tương đương với 1 μM tyrozin, trong một phút, ở các điều kiện của thí nghiệm.

Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein tổng số của các mẫu được xác định theo Lowry [9].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Động học của sinh trưởng và sinh tổng hợp proteaza ở *Bacillus* sp. 20

Sinh tổng hợp proteaza ngoại bào của chủng vi khuẩn này trong môi trường HA lỏng đạt hoạt độ cao nhất sau 48 giờ nuôi ở 30°C trong điều kiện thí nghiệm. Hoạt độ proteaza tăng dần và đạt cực đại vào cuối pha ổn định là 1,58 U/ml khi tỷ lệ giống sử dụng là 10%; trong khi đó số lượng tế bào tăng đến mức cao nhất và sinh trưởng đi vào pha ổn định ở giờ thứ 24 (hình 1).

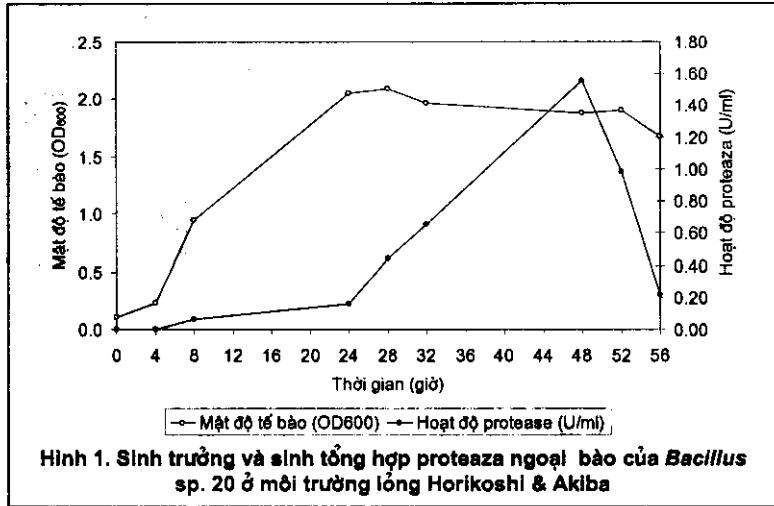
Kết quả trên cho thấy: ban đầu các tế bào *Bacillus* sp. 20 sử dụng nguồn dinh dưỡng có trong môi trường chủ yếu cho quá trình sinh trưởng. Quá trình tổng hợp proteaza ngoại bào chỉ bắt đầu và diễn ra chủ yếu ở pha ổn định. Có thể do lúc đó trong môi trường dinh dưỡng, nguồn nitơ còn lại chủ yếu là các pôlypeptit mạch dài nên vi khuẩn tổng hợp các proteaza ngoại bào để thủy phân các cao phân tử này thành các axit amin và peptit mạch ngắn cần thiết cho quá trình sống của nó.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng và sinh tổng hợp proteaza ngoại bào của *Bacillus* sp. 20

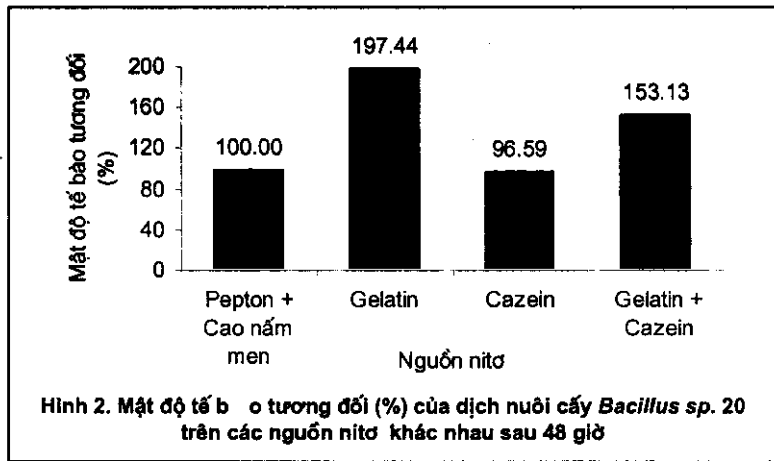
Trên hình 2 có thể thấy sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus* sp. 20 diễn ra mạnh nhất trên gelatin, gấp khoảng 2 lần so với trên pepton + cao nấm men, tiếp đó là trên gelatin + casein. Còn trên casein riêng lẻ, chỉ số sinh trưởng chỉ xấp xỉ bằng trên pepton + cao nấm men. Kết quả này củng cố thêm dự kiến của chúng tôi thay pepton và cao nấm men bằng gelatin là nguyên liệu rẻ hơn.

Trên hình 3 trình bày ảnh hưởng của các nguồn nitơ nói trên đến lượng enzym ngoại bào được hình thành trong dịch nuôi, hay còn gọi là hoạt độ proteaza của dịch nuôi. Dễ nhận thấy rằng hoạt độ này là lớn nhất trên gelatin, kể đến là trên hỗn hợp gelatin + casein. Điều đáng chú ý là trên gelatin, nếu sinh trưởng là gấp 2 lần so với trên pepton + cao nấm men (hình 2) thì hoạt độ proteaza của dịch nuôi lớn gấp 4 lần. Điều đó có nghĩa là gelatin không những kích thích sinh

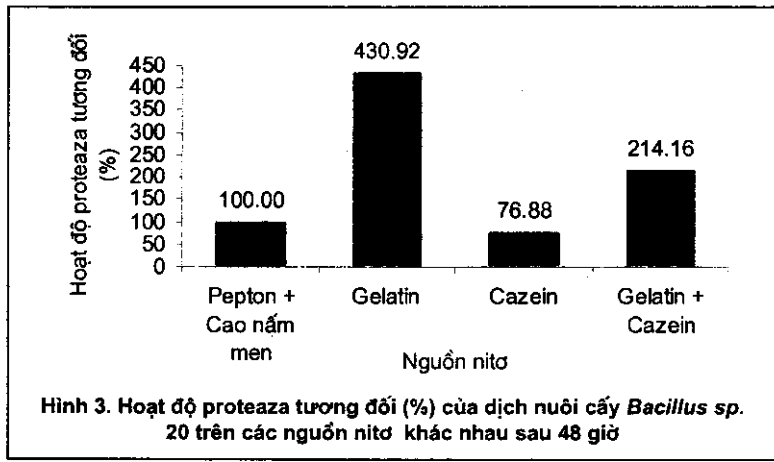
trưởng của chúng này mà quan trọng hơn là kích thích khả năng sinh tổng hợp proteaza (có tính di truyền) của mỗi tế bào. Điều đó được thấy rõ hơn khi so sánh các tỷ số hoạt độ của dịch nuôi (U/ml) với chỉ số sinh trưởng tương ứng (OD₆₀₀). Cách tính này được biểu thị trên hình 4, qua đó thấy rằng gelatin đã kích thích khả năng sinh tổng hợp của chúng lên khoảng 2 lần so với hỗn hợp pepton + cao nấm men. Cũng qua hình 4, thấy rằng nguồn nitơ hỗn hợp gelatin + casein làm tăng khả năng sinh tổng hợp của chúng lên khoảng 1,5 lần so với đối chứng pepton + cao nấm men.



Hình 1. Sinh trưởng và sinh tổng hợp proteaza ngoại bào của *Bacillus* sp. 20 ở môi trường lỏng Horikoshi & Akiba



Hình 2. Mật độ tế bào tương đối (%) của dịch nuôi cấy *Bacillus* sp. 20 trên các nguồn nitơ khác nhau sau 48 giờ



Hình 3. Hoạt độ proteaza tương đối (%) của dịch nuôi cấy *Bacillus* sp. 20 trên các nguồn nitơ khác nhau sau 48 giờ

Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến proteaza ngoại bào của *Bacillus* sp. 20

Ảnh hưởng của nhiệt độ

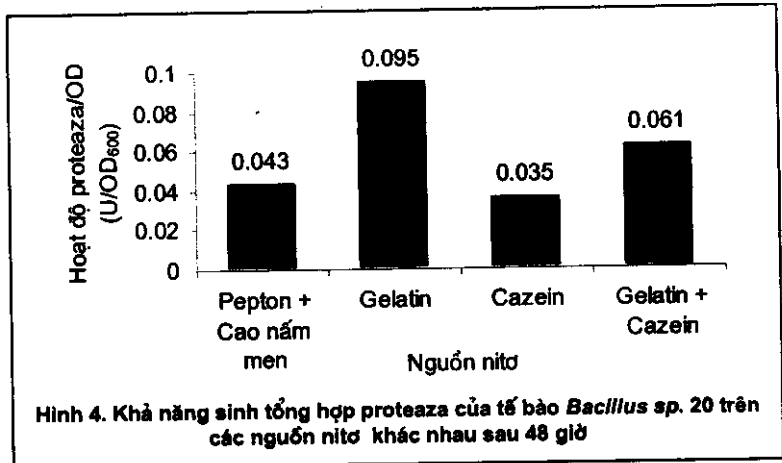
Proteaza ngoại bào của *Bacillus* sp. 20 biểu hiện hoạt độ cao nhất ở 50°C. Ở 45 và 55°C, hoạt độ này vào khoảng 68,3 và 73,2%, theo thứ tự, so với hoạt độ cực đại (hình 5).

Proteaza từ *Bacillus* sp. 20 giữ được 100% hoạt tính ở 45°C trong 30 phút. Ở 50°C, hoạt độ này còn lại 59,6% và enzym mất hoàn toàn hoạt tính khi nhiệt độ tăng lên 70°C (hình 6).

Ảnh hưởng của pH

Proteaza ngoại bào của *Bacillus* sp. 20 biểu hiện hoạt độ cao nhất ở pH 10 khi hoạt độ được kiểm tra từ pH 6 - 11 ở 37°C trong 10 phút. Kết quả này chứng tỏ proteaza của *Bacillus* sp. 20 là proteaza kiềm tính (hình 7).

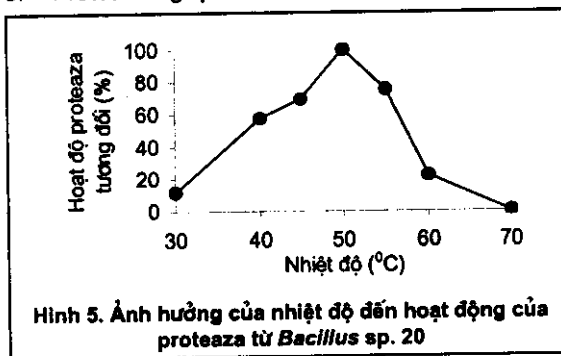
Ảnh hưởng của pH đến độ bền của enzym được kiểm tra khi hoạt độ dư được xác định sau khi giữ enzym ở các pH khác nhau trong 2,5 giờ ở 30°C. Enzym giữ được hoạt tính ở pH 10 và giảm mạnh hoạt tính ở các pH lân cận (hình 8).



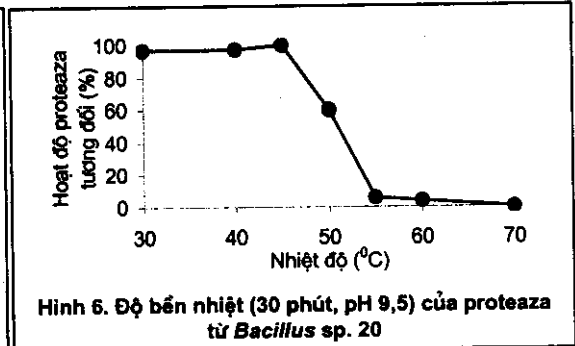
Hình 4. Khả năng sinh tổng hợp proteaza của tế bào *Bacillus* sp. 20 trên các nguồn nitơ khác nhau sau 48 giờ

KẾT LUẬN

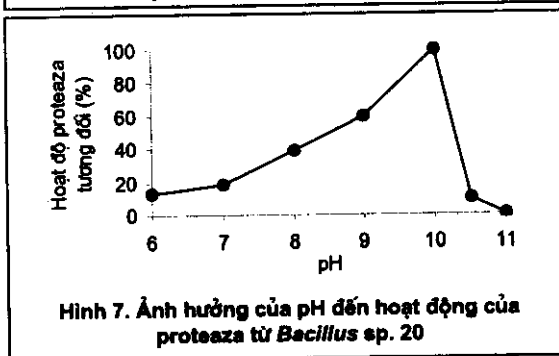
1. Trên môi trường lỏng HA có nguồn nitơ là pepton và cao nấm men, sinh trưởng của *Bacillus* sp. 20 bước vào giai đoạn cân bằng ở 24 giờ tuổi, còn sinh tổng hợp proteaza ngoại bào đạt cực đại ở 48 giờ tuổi.
2. Sinh trưởng và sinh tổng hợp proteaza ngoại bào của vi khuẩn này trên nguồn nitơ gelatin tăng lên khoảng 2 lần so với trên pepton và cao nấm men.
3. Proteaza ngoại bào của vi khuẩn này là một proteaza kiềm, hoạt động tốt nhất ở pH 10 và nhiệt độ



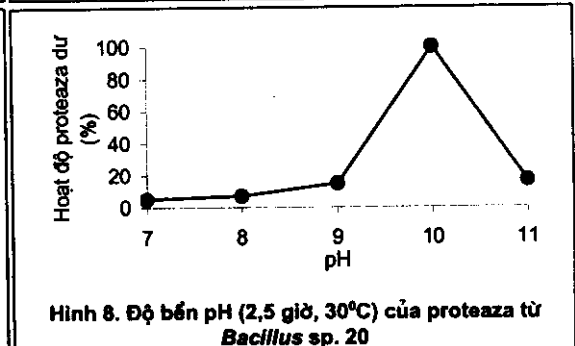
Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của proteaza từ *Bacillus* sp. 20



Hình 6. Độ bền nhiệt (30 phút, pH 9,5) của proteaza từ *Bacillus* sp. 20



Hình 7. Ảnh hưởng của pH đến hoạt động của proteaza từ *Bacillus* sp. 20



Hình 8. Độ bền pH (2,5 giờ, 30°C) của proteaza từ *Bacillus* sp. 20

50°C, bền ở pH trên trong 2,5 giờ và ở nhiệt độ 45°C trong 30 phút.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adiarayana, K. and P. Ellaiah, 2002. *Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated Bacillus sp.* J. Pharm Pharmaceut Sci., 5: 272 - 8.
2. Alik, P., A. Bayram and T. H. Ozdamaz, 2003. *Regulatory effects of alkaline - group amino acids recombinant Bacillus licheniformis.* Biotechnol. Appl. Biochem., 37: 165 - 71.
3. Beynon, R. J. and J. S. Bond, 1994. *Proteolytic Enzymes: A practical approach.* Oxford Univ. Press, p. 1 - 22.
4. Crueger, W. and A. Crueger, 1984. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology.* Science Tech., Madison, p. 161 - 86.
5. Fu, Z., S. B. Hamid, C. N. Razak, M. Basri, A. B. Salleh and R. N. Rahman, 2003. *Secretory expression in Escherichia coli and single - step purification of a heat - stable alkaline protease.* Protein Expr. Purif., 28: 63 - 8.
6. Huang, Q., Y. Peng, X. Li, H. Wang and Y. Zhang, 2003. *Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from Bacillus pumilus.* Curr. Microbiol., 46: 169 - 73.
7. Kawakami, K., C. Toma and Y. Homa, 2000. *Cloning sequencing and expression of the gene encoding the extracellular metalloprotease of Aeromonas caviae.* Microbiol. Immunol., 44: 341 - 7.
8. Ngô Tự Thành, 2001. *Sự phân bố, sinh trưởng và sinh tổng hợp proteaza ngoại bào của Bacillus ở vùng Hà Nội.* Tạp chí Sinh học, 23 (3a): 153 - 7.
9. Nguyễn Văn Mùi, 2001. *Thực hành hóa sinh học.* Nxb KH&KT, Hà Nội, tr. 62 - 3, 70 - 2.
10. Tang, B., S. Nirasawa, M. Kitaoka and K. Hayashi, 2002. *In vitro stepwise autoprocessing of the proform of pro - aminopeptidase processing protease from Aeromonas caviae T. 64.* Biochem. Biophys. Acta., 1596: 16 - 27.
11. Tsuchiya, K., I. Ikeda, T. Tsuchiya and T. Kimura, 1997. *Cloning and expression of an intracellular alkaline protease gene from alkalophilic Thermoactinomyces sp. HS 682.* Biosci. Biotechnol. Biochem., 61: 298 - 303.

SUMMARY

PRODUCTION AND PROPERTIES OF EXTRACELLULAR ALKALINE PROTEASE FROM BACILLUS SP. 20

Ngo Tu Thanh, Nguyen Viet Dung, Nguyen Van Duy
University of Natural Sciences, VNU, Hanoi

Alkalophilic bacterial strain *Bacillus* sp. 20 isolated from soil produced extracellular alkaline protease. The cultural supernatant of *Bacillus* sp. 20 exhibited maximum activity after 48 hours of cultivation with shaking at 30°C. Growth and production of protease of *Bacillus* sp. 20 were induced strongly by 1% gelatine. Extracellular protease from *Bacillus* sp. 20 showed optimal activity at pH 10 and 50°C. The enzyme was stable at pH 10 and at temperatures up to 45°C.