

DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.165

## SẢN XUẤT PROTEASE TỪ *Bacillus subtilis* N1 SỬ DỤNG PHỤ PHẨM ĐẬU NÀNH

Phan Thị Bích Trâm<sup>1\*</sup>, Lương Thị Thu Hương<sup>2</sup> và Khúc Ngọc Vy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Sinh lý - Sinh hóa, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Học viên Cao học khóa 26, ngành Công nghệ Sinh học, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Phan Thị Bích Trâm (email: ptbtram@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/05/2019

Ngày nhận bài sửa: 11/10/2019

Ngày duyệt đăng: 26/12/2019

### Title:

Production of protease from *Bacillus subtilis* N1 using soybean curd residue

### Từ khóa:

*Bacillus subtilis*, đậu nành tách béo, enzyme thủy phân fibrin, protease kiềm

### Keywords:

Alkaline protease, *Bacillus subtilis*, defatted soybean, fibrinolytic enzymes

### ABSTRACT

This study was aimed to isolate and select protease bacteria and determine the most appropriate culture medium to produce proteases. From commercial natto and fresh soybean residue, five bacterial isolates were isolated on casein medium (pH 9.5). N1 isolate with the highest protease activity was chosen to sequence and compared with database GenBank of NCBI by BLAST N software. The results showed that N1 isolate was 99% of the identity with GU980947.1 *Bacillus subtilis* CICC 10023 and was named *Bacillus subtilis* N1. The results of the most appropriate medium for the production of protease from *Bacillus subtilis* N1 was 1% defatted soybean, cultivation pH and incubation time were 8 and 48 hours, respectively, enzyme activity reached 1.870 TU/mL. The crude protease was the alkaline protease with the optimal pH in the range of pH 8-9 and had the fibrinolytic activity.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm phân lập, tuyển chọn và khảo sát môi trường nuôi cấy thích hợp cho vi khuẩn để tổng hợp protease. Từ natto thương mại và bã đậu nành đã phân lập được năm dòng vi khuẩn trên môi trường casein, pH 9,5. Vi khuẩn N1 có hoạt tính protease cao nhất được tuyển chọn để định danh bằng cách giải trình tự vùng gen 16S rRNA và sử dụng phần mềm BLAST N so sánh với trình tự các dòng vi khuẩn có trong GenBank của NCBI. Kết quả cho thấy vi khuẩn N1 có tỉ lệ đồng hình cao với dòng GU980947.1 *Bacillus subtilis* CICC 10023 tỉ lệ 99% và được đặt tên là *Bacillus subtilis* N1. Kết quả khảo sát môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* N1 cho thấy đậu nành tách béo ở nồng độ 1,2% với thời gian lên men 48 giờ trong môi trường pH 8 là thích hợp nhất cho sự tổng hợp protease của vi khuẩn, hoạt tính cao nhất đạt 1,870 TU/mL. Protease thô thu được thuộc nhóm protease kiềm hoạt động tối ưu trong khoảng pH 8-9 và có khả năng thủy phân huyết khối fibrin.

Trích dẫn: Phan Thị Bích Trâm, Lương Thị Thu Hương và Khúc Ngọc Vy, 2019. Sản xuất protease từ *Bacillus subtilis* N1 sử dụng phụ phẩm đậu nành. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(6B): 30-37.

### 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Protease là một trong ba nhóm enzyme công nghiệp lớn nhất trên thị trường enzyme thương mại, chiếm 60% tổng lượng enzyme toàn cầu

(Salleh *et al.*, 2006) và được sử dụng phổ biến trong công nghiệp tẩy rửa, công nghiệp chế biến thực phẩm, y học, nông nghiệp,... (Rao *et al.*, 1998). Phần lớn protease được thu nhận từ chi

*Bacillus* sp., với điều kiện nuôi cấy và thu nhận enzyme đơn giản, chế phẩm enzyme có độ bền cao, hoạt động trong khoảng nhiệt độ và pH phù hợp với điều kiện ứng dụng trong công nghiệp (Sharma *et al.*, 2017).

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), năm 2016 có 17,9 triệu người chết do các bệnh liên quan đến tim mạch (chiếm 31% tổng số ca tử vong trên toàn cầu). Trong đó 85% là do đau tim và đột quỵ, dự đoán đến năm 2030 con số tử vong có thể tăng lên 23,3 triệu (Huy *et al.*, 2016). Nguyên nhân chính gây bệnh này là do sự tích tụ cục máu đông fibrin trong thời gian dài dẫn đến sự hình thành huyết khối làm tắc nghẽn hoặc vỡ mạch máu (Wang *et al.*, 2009). Enzyme thủy phân fibrin phát hiện đầu tiên trong chế phẩm đậu nành lên men Nhật Bản (Sumi *et al.*, 1987) thuộc nhóm protease có khả năng thủy phân fibrin được ứng dụng rộng rãi để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh về tim mạch.

Hiện nay với nhu cầu sử dụng của xã hội, có rất nhiều nghiên cứu được các nhà khoa học thực hiện phân lập, ly trích nguồn protease thủy phân fibrin từ vi sinh vật đặc biệt chủng *Bacillus subtilis* (Pagnoncelli *et al.*, 2017) và có thể sử dụng các nguồn nguyên liệu rẻ tiền từ cám lúa mì (Wang *et al.*, 2009), đậu nành (Kapoor and Panda, 2013) hoặc chủng *Pseudomonas* sử dụng vỏ tôm (Wang *et al.*, 2011),... nhằm chủ động nguồn sản xuất một cách hiệu quả và tiện lợi cho người sử dụng. Cùng với xu hướng đó, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu phân lập, tuyển chọn và khảo sát môi trường nuôi cấy thích hợp cho vi khuẩn để tổng hợp protease có hoạt tính thủy phân fibrin, đề tài có thể làm cơ sở để ứng dụng chế phẩm trong lĩnh vực y học.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu sử dụng gồm: đậu nành, bã đậu nành, đậu nành tách béo, vỏ đầu tôm. Các nguyên liệu được phơi tự nhiên, sau đó xay mịn và sàng qua rây 2 mm, bảo quản ở 4°C. Các hóa chất: pepton, yeast extract, N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phep-nitroanilide (Sigma), L-tyrosin, casein (Merck). Natto, thực phẩm lên men từ đậu nành (Natto Mameki 45g - Nhật) và bã đậu nành được sử dụng để phân lập vi khuẩn.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* có hoạt tính protease cao

Tiến hành phân lập vi khuẩn sinh protease từ natto thương mại và bã đậu nành trên môi trường

casein pH 9,5 theo phương pháp của Wakilwala và Patel (2017). Chọn các khuẩn lạc rời rạc và khác nhau về hình thái để cấy chuyển nhiều lần đến khi khuẩn lạc đồng nhất. Tuyển chọn vi khuẩn có hoạt tính protease cao trên đĩa thạch casein 1%, agar 2% dựa theo phương pháp Lê Thị Bích Phượng và *ctv.* (2012). Hút 100 µL dịch enzyme từ các dòng vi khuẩn vào lỗ thạch (đường kính 0,7 cm), ủ ở 4°C trong 24h. Hoạt tính protease của vi khuẩn được đánh giá thông qua đường kính vòng thủy phân casein trên đĩa thạch, chọn dòng vi khuẩn có khả năng sinh protease có hoạt tính cao nhất để định danh và sử dụng trong các nghiên cứu sau.

Định danh sơ bộ đặc điểm, hình thái vi khuẩn và sinh lý theo phương pháp của Barrow và Feltham (1993). Kết hợp định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng gen 16S rRNA (mẫu được phân tích tại công ty Sinh hóa Phù Sa, TP. Cần Thơ) và so sánh với dòng vi khuẩn chuẩn trong GenBank của NCBI bằng chương trình Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

#### 2.2.2 Khảo sát môi trường lên men thích hợp cho sinh tổng hợp protease của vi khuẩn

##### Khảo sát nguồn cơ chất và thời gian lên men thích hợp cho sự tổng hợp protease

Thí nghiệm sử dụng dòng vi khuẩn có hoạt tính protease cao đã được phân lập và tuyển chọn trong mục 2.2.1. Các nghiệm thức khảo sát gồm: (1) đậu nành, (2) đậu nành tách béo, (3) bã đậu, (4) đầu tôm. Nguồn cơ chất của các nghiệm thức sử dụng nồng độ 1%, bổ sung thêm NaCl 0,5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1%, CaCl<sub>2</sub> 0,05%, glucose 0,5% vào môi trường lên men lỏng, điều chỉnh pH môi trường về mức 8. Nuôi cấy vi khuẩn trong các khoảng thời gian 24h, 48h và 72h, sau đó thu dịch enzyme bằng cách ly tâm 7500 rpm, 4°C và đo hoạt tính protease của các nghiệm thức bằng phương pháp Kunitz cải tiến (Kunitz, 1947). Chọn nguồn cơ chất và thời gian nuôi cấy vi khuẩn thích hợp thông qua nghiệm thức có hoạt tính protease cao nhất. Đơn vị hoạt tính protease (TU) là lượng enzyme cần thiết thủy phân casein giải phóng ra 1µmol tyrosine trong thời gian một phút ở pH 7,5, nhiệt độ 37°C và biểu hiện qua đơn vị TU/mL.

##### Khảo sát nồng độ nguồn cơ chất và pH môi trường thích hợp cho sự tổng hợp protease

Nguồn cơ chất và thời gian đã chọn trong thí nghiệm trước, tiến hành bổ sung vào môi trường lên men với năm nồng độ cơ chất khác nhau: 0,5%; 0,8%; 1%; 1,2%; 1,5%. Sau thời gian lên men thích hợp tiến hành thu dịch enzyme và đo hoạt tính protease các nghiệm thức. Chọn nồng độ cơ chất thích hợp thông qua nghiệm thức cho hoạt tính

protease cao nhất. Sau khi xác định được nồng độ cơ chất thích hợp, tiến hành khảo sát pH môi trường lên men với năm mức độ từ 6 đến 10. Tiến hành thu dịch enzyme và đo hoạt tính protease bằng phương pháp Kunitz cải tiến. Xác định pH môi trường thích hợp để vi khuẩn hoạt động cho hoạt tính protease cao nhất.

### 2.2.3 Xác định một số tính chất của chế phẩm protease thô

*Xác định pH tối ưu cho sự hoạt động của chế phẩm protease thô*

Dịch protease thô được ủ năm phút trong pH đệm với các giá trị từ 7 đến 11. Sau đó tiến hành đo hoạt tính protease của các nghiệm thức theo phương pháp Kunitz cải tiến với cơ chất casein được pha trong các đệm tương ứng.

*Xác định hoạt tính thủy phân fibrin trong chế phẩm protease thô*

Khả năng làm tan huyết khối của protease thô được xác định theo phương pháp của Lê Thị Bích Phượng và *ctv.* (2012). Tiến hành hút 100  $\mu$ L dịch enzyme thô cho lên màng huyết khối heo. Quan sát sự thay đổi kích thước của các màng huyết khối sau 150 phút. Khả năng thủy phân fibrin bằng cơ chất đặc hiệu theo phương pháp Wang *et al.* (2011). Cho dịch enzyme phản ứng với cơ chất đặc hiệu N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide, ủ ở 37°C trong năm phút, phản ứng kết thúc bằng cách thêm 1,4 mL TCA 0,15 M và sản phẩm *p*-nitroanilide giải phóng được đo ở bước sóng 405 nm. Một đơn vị hoạt tính enzyme được xác định là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1nmol *p*-nitroaniline trong một phút với các điều kiện phản ứng và biểu hiện qua đơn vị U/mL.

### 2.3 Xử lý số liệu

Các thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại. Thống kê kết quả và đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phần mềm SPSS 20.0

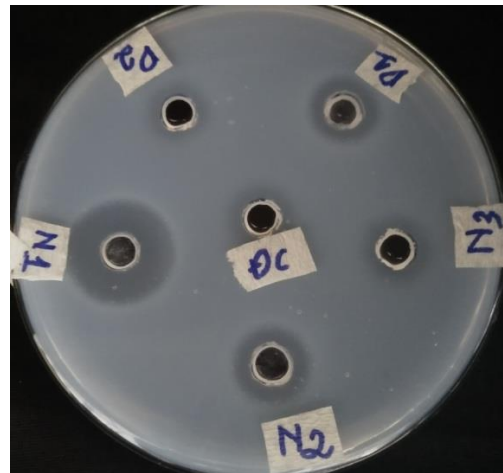
## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus subtilis* có hoạt tính protease cao

Từ mẫu natto thương mại và bã đậu nành tươi đã phân lập được năm dòng vi khuẩn ở điều kiện hiếu khí trên môi trường casein (pH 9,5). Trong đó, ba dòng được phân lập từ natto thương mại (kí hiệu N1, N2, N3) và hai dòng được phân lập từ bã đậu

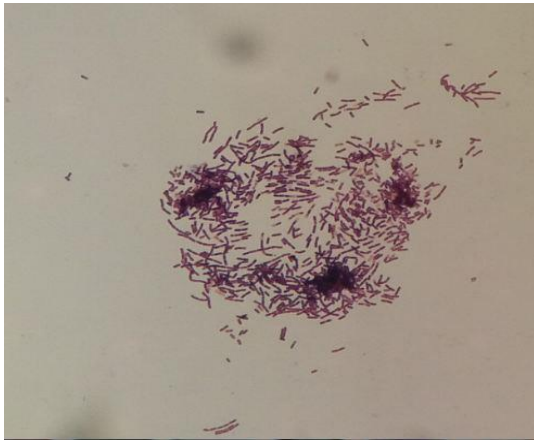
nành tươi (kí hiệu D1, D2). Về hình thái khuẩn lạc, dòng N1 có khuẩn lạc màu trắng đục, trung tâm có núm nhỏ màu nhạt hơn, bìa răng cưa, bề mặt nhẵn, khô, bám sát mặt thạch, dòng N2 và D1 khuẩn lạc màu vàng, bề mặt nhẵn bóng, bìa nguyên, dòng N3 và D2 khuẩn lạc màu trắng đục, bề mặt bóng, bìa nguyên. Khi quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 40X (phóng đại 400 lần), các dòng vi khuẩn có dạng hình que ngắn và có khả năng chuyển động.

Các dòng vi khuẩn được đánh giá khả năng tổng hợp protease dựa trên vòng thủy phân casein trên đĩa thạch. Có 4/5 dòng vi khuẩn tạo được vòng thủy phân casein trên đĩa thạch casein 1%. Đường kính vòng thủy phân của các dòng vi khuẩn dao động từ 0,1 cm đến 1,4 cm. Trong đó, dòng vi khuẩn N1 có đường kính vòng thủy phân lớn nhất là 1,4 cm, dòng N2 và D1 đường kính vòng thủy phân là 0,7 cm và 0,6 cm, dòng N3 có đường kính vòng thủy phân là 0,1 cm, dòng D2 hầu như không tạo được vòng thủy phân (Hình 1). Do đó có thể kết luận sơ bộ dòng vi khuẩn N1 có khả năng sinh protease có hoạt tính cao nhất trong năm dòng vi khuẩn phân lập.

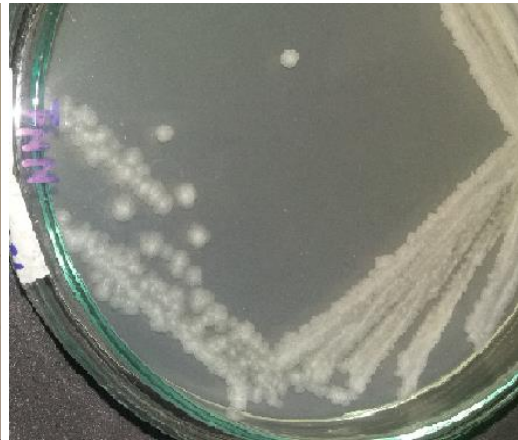


**Hình 1: Vòng phân giải casein trên đĩa thạch của các dòng vi khuẩn**

Định danh sơ bộ qua đặc điểm hình thái và sinh lý: vi khuẩn N1 được tiến hành nhuộm gram và thử nội bào tử theo phương pháp của Barrow and Feltham (1993). Dòng N1 cho kết quả là gram dương và có khả năng hình thành nội bào tử. Theo cảm nang phân loại của Cowan và Steel (Barrow and Feltham, 1993), dòng N1 có khả năng thuộc giống *Bacillus* (Hình 2 và 3).



**Hình 2: Tế bào vi khuẩn N1 x400 lần**



**Hình 3: Hình thái khuẩn lạc N1**

Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử dòng N1: tiến hành giải trình tự vùng gen 16S rRNA và sử dụng chương trình BLAST N để so sánh mức độ đồng hình của trình tự vi khuẩn N1 với trình tự của các dòng vi khuẩn chuẩn trong GenBank của NCBI.

Trình tự nucleotid của dòng N1:

GCTGCTATCATGCAAGTCGAGCGGACAGATGG  
 GAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTG  
 AGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGG  
 ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGG  
 TTGTTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTG  
 GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCG  
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG  
 GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG  
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT  
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG  
 ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA  
 TGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG  
 GGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACC  
 TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT  
 ACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCA  
 AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTC  
 GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC  
 CGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGG  
 AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCAC  
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA

CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC  
 TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA  
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG  
 ATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTT  
 AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG  
 GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA  
 TTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG  
 GTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  
 GTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGA  
 CGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCA  
 TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTA  
 GTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC  
 TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC  
 GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC  
 ACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCG  
 AAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGT  
 TCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGC  
 GTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATAGCA  
 TGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC  
 ACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCC  
 GAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCG  
 CCGAAGGTGGAAC

Dòng N1 có tổng số nucleotid được giải là 1439 nucleotid, cho kết quả đồng hình với dòng GU980947.1 *Bacillus subtilis* CICC 10023 với tỉ lệ

99% (Hình 4). *Bacillus subtilis* là vi khuẩn quan trọng để sản xuất protease ứng dụng trong công nghiệp và y học (Dos Santos Aguilar and Satto, 2018). Phần lớn các enzyme thủy phân fibrin trên

thị trường đều được tổng hợp từ các dòng *Bacillus subtilis* với độ ổn định cao (Pagnoncelli *et al.*, 2017), do đó tiềm năng sản xuất enzyme của dòng N1 là rất lớn.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus subtilis strain CICC 10023 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	99%	GU850947.1
Bacillus subtilis strain CICC-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	99%	EU000495.1
Bacillus sp. Arit-2b partial 16S rRNA gene, isolate Arit-2b	2641	2641	99%	0.0	99%	HF678932.2
Bacillus subtilis strain X501 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2641	2641	99%	0.0	99%	KU240466.1

Hình 4: Mức độ tương đồng của dòng N1 với các dòng khác trên cơ sở dữ liệu NCBI

### 3.2 Môi trường lên men thích hợp cho sự tổng hợp protease từ *Bacillus subtilis* N1

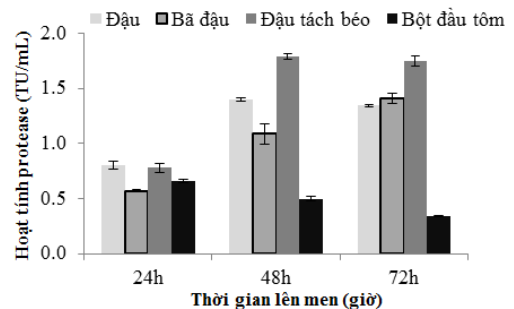
#### 3.2.1 Nguồn cơ chất và thời gian lên men thích hợp

Từ Hình 5 cho thấy ba loại nguyên liệu là đậu nành, bã đậu và đậu nành tách béo đều thích hợp làm nguồn cơ chất cho sự lên men protease của *Bacillus subtilis* N1. Cụ thể, *Bacillus subtilis* N1 cho hoạt tính protease cao nhất trong môi trường đậu nành tách béo với 1,473 TU/mL cao hơn so với khi sử dụng đậu nành nguyên chất (1,212 TU/mL), hoạt tính protease thấp nhất trong môi trường bột đậu tằm (0,513 TU/mL). Kết quả này phù hợp với báo cáo của Zu *et al.* (2010), sự tổng hợp enzyme thủy phân fibrin của *Bacillus subtilis* trong môi trường phụ phẩm đậu nành cho hoạt tính cao hơn so với sử dụng đậu nành nguyên chất. Nguyên nhân có thể do lượng chất béo trong đậu nành làm ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của *Bacillus subtilis*.

So với một số nghiên cứu sử dụng nguồn cơ chất đất liền để sản xuất protease từ vi khuẩn như: cao chiết thịt bò cho hoạt tính protease 0,414 TU/mL (Naidu and Devi, 2005), casein cho hoạt tính 0,758 TU/mL (Đỗ Thị Bích Thủy, 2012) thì đậu nành tách béo được sử dụng trong nghiên cứu này cho hoạt tính protease cao hơn. Theo Li *et al.* (2013), phụ phẩm đậu nành nói chung có hàm lượng chất béo thấp (9,3%-10,9%), chất xơ cao (52,8%-58,1%), protease dồi dào (36%-38%), ngoài ra còn chứa magiê, sắt, photpho, isoflavone và lượng axit amin đa dạng, do đó rất thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Mặt khác, phụ phẩm đậu nành đặc biệt đậu nành tách béo là nguồn cơ chất rẻ tiền và rất dồi dào được sử dụng trong chăn nuôi. Từ đó có thể kết luận, nguyên liệu này hoàn toàn có thể là nguồn cơ chất tiềm năng cho sự sản xuất protease từ vi khuẩn.

Hoạt tính protease tăng từ 24 giờ đến 48 giờ lên men, nhưng sau đó hoạt tính không tăng lên từ 48 giờ đến 72 giờ lên men. Kết quả khá giống với nghiên cứu của Olajuyigbe và Ajele (2008); Chu

(2007) sự tổng hợp protease của vi khuẩn *Bacillus* đạt tối đa sau 48 giờ lên men. Trong khi đó Huang *et al.* (2003) báo cáo rằng *Bacillus* cho hoạt tính protease cao nhất sau 28 giờ lên men. Như vậy, tùy thuộc vào loài vi khuẩn, nguồn dinh dưỡng, điều kiện nuôi cấy mà có thời gian lên men khác nhau (Sharma *et al.*, 2017). Đối với thí nghiệm này, thời gian thích hợp để thu protease từ *Bacillus subtilis* N1 là 48 giờ lên men.



Hình 5: Hoạt tính protease theo nguồn cơ chất và thời gian lên men

#### 3.2.2 Nồng độ cơ chất và pH môi trường lên men thích hợp

Sau khi lựa chọn được nguồn cơ chất thích hợp cho sự tổng hợp protease là đậu nành tách béo, thí nghiệm tiếp tục khảo sát nồng độ cơ chất thích hợp để nâng cao hoạt tính protease, kết quả thể hiện trong Bảng 1.

*Bacillus subtilis* N1 cho hoạt tính protease tăng dần từ 0,664 TU/mL đến 1,538 TU/mL khi tăng nồng độ nguồn cơ chất từ 0,5% đến 1,2%, tuy nhiên hoạt tính có xu hướng giảm rõ rệt khi tiếp tục tăng nồng độ cơ chất từ 1,2% lên 1,5%, nguyên nhân có thể do nồng độ cơ chất cao đã làm ảnh hưởng đến tốc độ chuyển động của vi khuẩn trong môi trường lỏng, ngoài ra sự dư thừa nguồn nitrogen làm ức chế tổng hợp protease của vi khuẩn (Moon and Parulekar, 1991 trích dẫn từ Bhunia *et al.*, 2012). Như vậy, bổ sung đậu nành

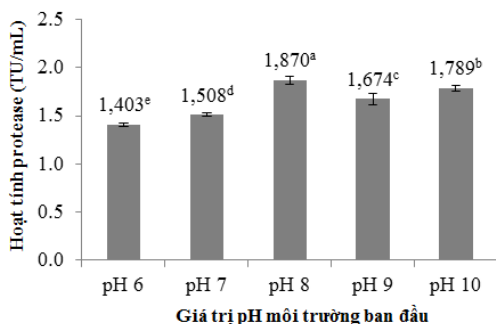
tách béo ở nồng độ 1,2% vào môi trường lên men là thích hợp nhất.

Kết quả khảo sát pH môi trường lên men thích hợp để tổng hợp protease được thể hiện ở Hình 6. *Bacillus subtilis* N1 có hoạt tính protease tăng lên từ 1,403 TU/mL đến 1,870 TU/mL khi pH môi trường tăng từ pH 6 đến pH 8, sau đó hoạt tính protease giảm khi pH môi trường lên mức pH 9 và pH 10. Giá trị pH môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự trao đổi ion H<sup>+</sup> qua màng tế bào vi khuẩn từ đó liên quan đến sự ổn định cũng như hoạt động của enzyme được tiết ra ngoài môi trường (Bhunja *et al.*, 2012), vi khuẩn tiết protease kiềm luôn đòi hỏi pH môi trường ban đầu phải cao hơn 7,5 (Kumar and Takagi, 1999). Do đó theo nghiên cứu của Olajuyigbe và Ajele (2005); Dodia *et al.* (2006), pH môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng và tổng hợp protease kiềm của *Bacillus* sp. trong khoảng pH 8-10. Trong nghiên cứu này, *Bacillus subtilis* N1 cho hoạt tính protease cao nhất trong môi trường có pH 8 nên có khả năng protease thu được thuộc nhóm protease kiềm.

**Bảng 1: Hoạt tính protease theo nồng độ theo nồng độ nguồn cơ chất**

Nghiệm thức	Nồng độ cơ chất (%)	Hoạt tính protease (TU/mL)
1	0,5	0,664 <sup>d</sup> ±0,004
2	0,8	1,405 <sup>b</sup> ±0,014
3	1,0	1,435 <sup>b</sup> ±0,093
4	1,2	1,538 <sup>a</sup> ±0,047
5	1,5	1,239 <sup>c</sup> ±0,037
F		**
CV		4%

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Duncan; \*\*: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1%.

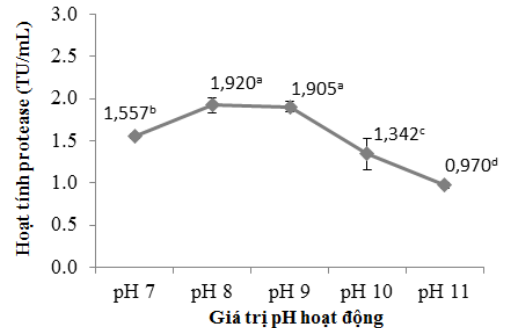


**Hình 6: Hoạt tính protease theo pH môi trường lên men**

**3.3 Một số tính chất của protease thô**

**3.3.1 pH hoạt động tối ưu của protease thô**

Kết quả khảo sát pH tối ưu của protease thô thu nhận hoạt động trong khoảng pH từ 8 đến 9 tương ứng với hoạt tính đạt 1,920 TU/mL và 1,905 TU/mL (Hình 7). Theo Dos Santos Aguilar và Satto (2018), nhóm protease kiềm hoạt động tối ưu nhất trong khoảng pH từ 7 đến 11, do đó protease thô thu được từ *Bacillus subtilis* N1 thuộc nhóm protease kiềm cho thấy tiềm năng ứng dụng của chế phẩm là rất cao.

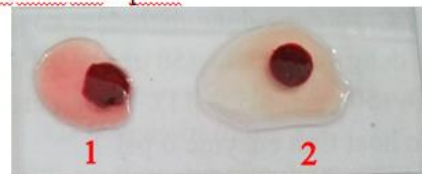


**Hình 7: pH tối ưu của protease thô thu nhận từ *Bacillus subtilis* N1**

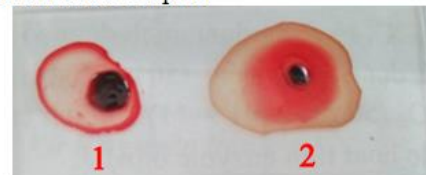
**3.3.2 Hoạt tính thủy phân fibrin của protease thô**

Kết quả kiểm tra khả năng làm tan huyết khối cho thấy mảnh huyết khối được nhỏ dịch enzyme protease thô (mẫu 2) đã giảm kích thước rõ rệt sau 150 phút trong khi mảnh huyết khối đối chứng (mẫu 1) không có sự thay đổi về kích thước ở cùng thời gian (Hình 8).

**Huyết khối lúc 0 phút**



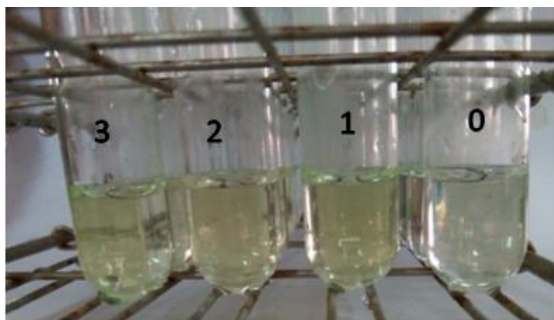
**Huyết khối sau 150 phút**



**Hình 8: Khả năng làm tan huyết khối của dịch enzyme**

Ghi chú: mẫu 1: đối chứng (không có dịch enzyme thô); mẫu 2: có dịch enzyme thô

Khi đo hoạt tính thủy phân fibrin trên cơ chất đặc hiệu N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide, protease thô có khả năng thủy phân liên kết amide, giải phóng p-nitroanilide có màu vàng (Hình 9) cho độ hấp thu cao nhất ở bước sóng 405 nm với hoạt tính trung bình là  $153,59 \pm 24,32$  U/mL. Từ các kết quả trên có thể nhận định protease thô có hoạt tính thủy phân fibrin, đây là tính chất đặc biệt quan trọng trong y học để điều trị các bệnh liên quan đến tim mạch. Theo ước tính thị trường toàn cầu về các loại thuốc làm tan fibrin là gần 14 tỷ USD (Wang *et al.*, 2009) cho thấy nhu cầu của xã hội đối với loại thuốc này là rất lớn. Do đó chế phẩm enzyme rất có giá trị trong thực tiễn đời sống.



**Hình 9: Đo hoạt tính thủy phân fibrin trên cơ chất đặc hiệu**

Ghi chú: ống nghiệm 0: mẫu Blank; ống nghiệm 1, 2 và 3: mẫu thật tương ứng với 3 lần lặp lại

#### 4 KẾT LUẬN

Dòng vi khuẩn N1 được phân lập từ natto thương mại cho hoạt tính protease cao và có tỉ lệ tương đồng 99% với dòng *Bacillus subtilis* CICC 10023. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* N1 với đậu nành tách béo nồng độ 1,2% và thời gian lên men 48 giờ trong môi trường pH 8 là thích hợp nhất cho sự phát triển của vi khuẩn để sản sinh protease cho hoạt tính cao nhất. Protease thô thu được thuộc nhóm protease kiềm, hoạt động tối ưu trong khoảng pH 8-9 và có khả năng thủy phân cục huyết khô fibrin nên có giá trị ứng dụng cao trong thực tế.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A., 1993. Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria, third edition. Cambridge University Press. Cambridge, 355 pages.

Bhunia, B., Basak, B. and Dey, A., 2012. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. Journal of Biochemical Technology, 3(4): 448-457.

Chu, W.H., 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species

of *Bacillus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 34(3): 241-245.

Dodia, M.S., Joshi, R.H., Patel, R.K. and Singh, S.P., 2006. Characterization and stability of extracellular alkaline proteases from halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from saline habitat of Coastal Gujarat, India. Brazilian Journal of Microbiology, 37: 276-282.

Dos Santos Aguilar, J.G. and Satto, H.H., 2018. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. Food Research International, 103: 253-262.

Đỗ Thị Bích Thủy, 2012. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự thu nhận chế phẩm protease ngoại bào của *Bacillus amyloliquefacien* N1. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Huế, 71. 277-288.

Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H. and Zhang, Y., 2003. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. Current Microbiology, 46(3): 169-173.

Huy, D.N.A., Hao, P.A. and Hung, P.V., 2016. Screening and identification of *Bacillus* sp. isolated from traditional Vietnamese soybean-fermented products for high fibrinolytic enzyme production. International Food Research Journal, 23: 326-331.

Kumar, C.G. and Takagi, H., 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotechnology Advances, 17: 561-594.

Kunitz, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. Journal General Physiology, 30: 291-310.

Lê Thị Bích Phượng, Võ Thị Hạnh, Trần Thạch Phong, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân và Lê Thị Hương, 2012. Phân lập và tuyển chọn một số chủng *Bacillus* sinh tổng hợp Nattokinase. Tạp chí Sinh học, 34: 99-104.

Li, S., Zhu, D., Li, K., Yang, Y., Lei, Z. and Zhang, Z., 2013. Soybean curd residue: composition, utilization and related limiting factors. ISRN Industrial engineering, 2013: 1-8.

Naidu, K.S.B. and Devi, K.L., 2005. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. African Journal of Biotechnology, 4(7): 724-726.

Olajuyigbe, F.M. and Ajele, J.O., 2005. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. African Journal of Biotechnology, 4(8): 776-779.

Olajuyigbe, F.M. and Ajele, J.O., 2008. Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* LBBI-II isolated from 'iru', a traditionally fermented African locust bean condiment. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 3(1): 42-46.

Pagnoncelli, M.G.B., Fernandes, M.J., Rodrigues, C. and Soccol, C.R., 2017. Nattokinase. In: Pandey, A., Negi, S. and Soccol, C.R. (Eds.). Current

- developments in biotechnology and bioengineering: Production, isolation and purification of industrial products. Elsevier Science. Amsterdam, pp. 507-524.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiology and Molecular Biology*, 62: 597-635.
- Salleh, A.B., Razak, C.N.A., Rahman, R.N.Z.R.A. and Basri, M., 2006. Protease: Introduction. *In: Salleh, A.B., Rahman, R.N.Z.R.A. and Basri, M. (Eds.). New lipase and protease*. Nova Science Publishers. New York, pp. 23-39.
- Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S. and Kumar, A., 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1): 115-126.
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H. and Muraki, H., 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experienta*, 43(10): 1110-1111.
- Vakilwala, M. and Patel, D., 2017. Isolation and screening of protease producing organisms from soil sample. *International Journal of Research and Scientific Innovation*, 4: 75-78.
- Wang, C., Du, M., Zheng, D., Kong, F., Zu, G. and Feng, Y., 2009. Purification and Characterization of Nattokinase from *Bacillus subtilis* natto B-12. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 9722-9729.
- Wang, S.L., Wu, Y.Y. and Liang, T.W., 2011. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *New Biotechnology*, 28(2): 196-202.
- Zu, X., Z. Zhang, Y. Yang, Che, H., Zhang, G. and Li, J., 2010. Thrombolytic activities of nattokinase extracted from *Bacillus subtilis* fermented soybean curd residues. *International Journal of Biology*, 2(2): 120-125.