

TINH SẠCH VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA PROTEASE CHIỀU KIỀM TỪ *BACILLUS* SP. SV1

Nguyễn Châu Sang¹ và Nguyễn Thị Hà²

¹ Lô 12A Khu Công nghiệp Trà Nóc, Quận Ô Môn, Thành phố Cần Thơ

² Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 03/06/2014

Ngày chấp nhận: 30/12/2014

Title:

Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus* sp. SV1

Từ khóa:

Bacillus sp. SV1, đơn phân, protease kiềm tính, sắc ký trao đổi ion, tinh sạch

Keywords:

Bacillus sp. SV1, ion-exchange chromatography, monomer, alkaline protease, purification

ABSTRACT

An alkaline protease with molecular mass about 19.2 kDa was isolated and purified from *Bacillus* sp. SV1 broth culture by ammonium sulfate fractionation following by a combination of cation-exchange on SP-streamline column and anion exchange chromatography on Unosphere Q column with phosphate buffer at pH 7.8. SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions and zymography analysis with casein as a substrate indicated that the protease was a monomer of about 19.2 kDa with no intermolecular disulfite bridges. The optimum pH and temperature for protease activity were 9.0 and 45°C, respectively. The presence of 2.5 mM Ca²⁺ led to a two fold increase of enzyme activity. Additionally, the purified protease was expected as a serine protease because it was completely inhibited by 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF).

TÓM TẮT

Protease kiềm tính từ *Bacillus* sp. SV1 đã được tinh sạch bằng phương pháp tủa ammonium sulfate bão hòa ở nồng độ 60%, kết hợp sắc ký trao đổi ion dương SP-streamline và sắc ký trao đổi ion âm Unosphere Q với đệm phosphate pH 7,8. Bằng kỹ thuật SDS-PAGE và điện di nhuộm hoạt tính với cơ chất casein, protease được xác định là một đơn phân và có khối lượng phân tử khoảng 19,2 kDa. Các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính cho thấy, protease này hoạt động mạnh ở pH tối ưu 9,0 và nhiệt độ tối ưu 45°C. Trong điều kiện thí nghiệm, sự có mặt của 2,5 mM ion Ca²⁺ làm tăng hoạt tính protease gấp hai lần, bên cạnh đó protease này có thể bị ức chế hoàn toàn bởi 2,0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), có khả năng đây là một serine protease.

1 GIỚI THIỆU

Protease (EC.3.4.21-24, 99; còn được gọi là peptidase hay proteinase) là nhóm các enzyme có khả năng phân hủy protein thành những thành phần đơn giản hơn như các chuỗi polypeptide ngắn hay các acid amin tự do nhờ vào khả năng cắt đứt các liên kết peptide (-CO-NH-). Dựa vào hoạt tính ở

những điều kiện pH khác nhau, protease được chia thành 3 nhóm bao gồm: protease acid, protease trung tính và protease kiềm tính. Theo đó, protease acid hoạt động tốt nhất ở pH 2,0 đến 5,0; protease có pH tối ưu vào khoảng 7 được gọi là protease trung tính; protease kiềm tính có hoạt tính tốt nhất khi pH lớn hơn 8 (pH kiềm) (Khan *et al.*, 2011).

Ngày nay, protease được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực công nghiệp như: sản xuất chất tẩy rửa, chế biến thực phẩm, thuốc da, dược phẩm và xử lý môi trường. Tuy nhiên, trong khoảng 3000 loại enzyme (bao gồm protease kiềm tính) đã được nghiên cứu chủ yếu đều thuộc nhóm trung tính (Genckal, 2004). Những enzyme này chỉ hoạt động tốt trong một khoảng pH và nhiệt độ rất hạn chế, do vậy chúng vẫn chưa là nguồn enzyme lý tưởng cho sản xuất. Một trong những loại enzyme có thể đáp ứng được yêu cầu trên đó là protease kiềm tính. Trên cơ sở đó, đề tài nghiên cứu "Tinh sạch và khảo sát một số đặc điểm của protease chịu kiềm từ *Bacillus* sp.SV1" được tiến hành.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Dòng *Bacillus* sp.SV1 được cung cấp bởi phòng Công nghệ Enzyme, Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Nuôi cấy vi khuẩn, thu nhận protease thô

Vi khuẩn từ môi trường thạch nghiêng được cấy vào 25 ml môi trường Horikoshi I Glucose 10g, Polypeptone 5g, Yeast extract 5g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, Na_2CO_3 10g, agar 20g, nước cất 1 lít (Horikoshi, 1971) trong bình tam giác 250 ml. Những bình tam giác này sau đó được lắc ở 30°C, lắc 120 vòng/phút trong 24h. Sau đó, 2 ml dịch vi khuẩn (10^9 CFU/ml) được chuyển sang nuôi cấy trong 50 ml dung dịch Horikoshi I trong bình tam giác 250 ml ở 30°C, lắc 120 vòng/phút. Sau 72 giờ, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 4°C, tốc độ 7000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được sử dụng như nguồn protease thô cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2 Tinh sạch protease từ dịch nuôi cấy

Kết tủa phân đoạn protease bằng ammonium sulfate bão hòa

Muối ammonium sulfate được thêm vào dịch protease thô theo từng phân đoạn từ 20-90% bão hòa. Hỗn hợp được giữ ở 4°C trong 12 giờ. Sau đó, phần cặn lắng của mỗi phân đoạn được thu lại sau khi ly tâm 8000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. Hòa tan phần cặn lắng trong đệm 50 mM phosphate pH 7,8. Tiếp đến, phần cặn lắng này được mang đi thẩm tích trong đệm 50 mM phosphate pH 7,8 để loại muối. Các phân đoạn sau đó được kiểm tra hoạt tính. Phân đoạn có hoạt tính cao được chọn cho các bước tinh sạch tiếp theo.

Tinh sạch enzyme protease bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion

Sắc ký trao đổi ion dương

Cột SP-streamline (GE Healthcare, Anh) 1,5x20cm được cân bằng với dung dịch đệm 50 mM phosphate pH 7,8.

Protein kết tủa được cho qua cột với tốc độ 0,8 ml/phút. Tiếp tục cho dung dịch đệm 50 mM phosphate pH 7,8 qua cột với tốc độ 1 ml/phút để loại các protein tạp chất không bám trên cột.

Protein bám trên cột được rửa giải bằng gradient nồng độ muối NaCl liên tục từ 0-1 M với tốc độ dòng chảy là 1 ml/phút để thu nhận các phân đoạn.

Sắc ký trao đổi ion âm

Cột Unosphere (Bio-rad, Mỹ) 1,5x20 cm được cân bằng với dung dịch đệm 50 mM phosphate pH 7,8.

Protein không bám từ cột sắc ký trao đổi ion dương được cho qua cột với tốc độ 0,8 ml/phút. Tiếp tục cho dung dịch đệm 50mM phosphate pH 7,8 qua cột với tốc độ 1 ml/phút để loại các protein tạp chất không bám trên cột.

Protein bám trên cột được rửa giải bằng gradient nồng độ muối NaCl liên tục từ 0-1 M với tốc độ dòng chảy là 1 ml/phút để thu nhận các phân đoạn.

2.2.3 Xác trọng lượng và độ tinh sạch của protease

Phân đoạn protease thu được sau mỗi bước tinh sạch được kiểm tra và đánh giá độ tinh sạch và trọng lượng bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE (Hames, 1998) và kỹ thuật điện di nhuộm hoạt tính protease với cơ chất casein trên gel SDS-PAGE (Dương Thị Hương Giang, 2010) trong điều kiện khử (có BEM) và không khử (không có BEM).

2.2.4 Xác định hàm lượng protein và hoạt tính protease

Dịch protease thô và các phân đoạn có hoạt tính sau khi qua cột sắc ký được xác định hàm lượng protease bằng phương pháp Bradford (Bradford, 1976) và hoạt tính bằng phương pháp Kunizt cải tiến (Kunizt, 1947).

Đơn vị đo hoạt tính protease: 1 đơn vị hoạt protease được biểu hiện qua đơn vị tyrosin TU (Tyrosin Unit), là lượng enzyme cần thiết để thủy

phân casein cho ra 1 μmol tyrosine ($\sim 0,181$ mg) trong một phút ở 37°C , pH 9,0.

Hoạt tính đặc hiệu (hoạt tính riêng) là số đơn vị hoạt tính của enzyme trong 1 mg protein (TU/mg).

2.2.5 Khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt động của protease

Dung dịch cơ chất casein 0,6% được sử dụng để kiểm tra hoạt tính của enzyme ở các giá trị pH khác nhau từ 6 đến 12 (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

Đồng thời, phản ứng xúc tác của enzyme cũng được thực hiện ở nhiệt độ từ 30 đến 70°C (30°C , 35°C , 40°C , 45°C , 50°C , 55°C , 60°C và 70°C). Cơ chất casein được ủ ở nhiệt độ cần thiết trước khi được sử dụng để kiểm tra hoạt tính enzyme.

2.2.6 Khảo sát ảnh hưởng ion Ca^{2+} lên hoạt động của protease

Hoạt tính của protease được khảo sát với sự hiện diện của ion Ca^{2+} ở các nồng độ khác nhau (2,5 mM, 5 mM và 10 mM).

2.2.7 Khảo sát ảnh hưởng chất ức chế PMSF lên hoạt động protease

PMSF ở các mức độ khác nhau được bổ sung

vào hỗn hợp phản ứng.

Nồng độ enzyme sử dụng trong các thí nghiệm ở mục 2.2.5, 2.2.6 và 2.2.7 là như nhau (0,017 mg/ml). Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.8 Phân tích thống kê

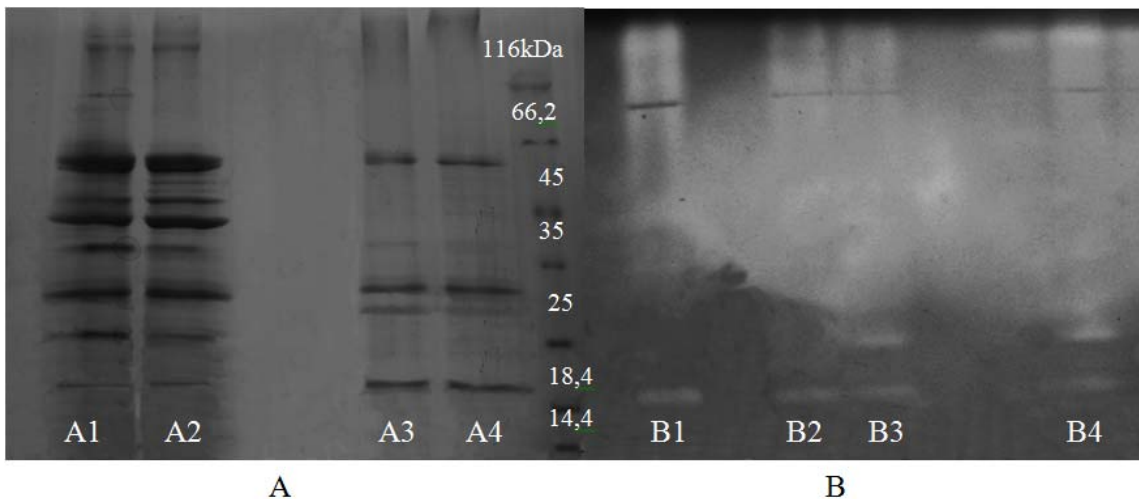
Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm thống kê Statgraphics centurion phiên bản XV.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tinh sạch protease

3.1.1 Kết tủa bằng ammonium sulfate

Khi thực hiện kết tủa bằng ammonium sulfate ở các nồng độ từ 20-90% bão hòa cho thấy protease kết tủa ở 2 phân đoạn 60% và 80% AS bão hòa với hoạt tính riêng lần lượt là 9,5 U/mg và 5,7 U/mg. Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE và điện di nhuộm hoạt tính với cơ chất casein các phân đoạn cho thấy đã thu nhận được 2 dạng protease có phân tử lượng lần lượt là 30,8 và 19,2 kDa Trước đó, Kumar và Takagi (1999) cũng đã công bố hầu hết các protease kiềm tính có phân tử lượng trong khoảng 15-30 kDa, ngoại trừ một vài trường hợp ngoại lệ.



Hình 1: Kết quả điện di trên gel arylamide (A) và điện di nhuộm hoạt tính trên cơ chất casein của các phân đoạn protein (B)

- A1. Phân đoạn 80% không xử lý BME; A2. Phân đoạn 80% có xử lý BME;
 A3. Phân đoạn 60% không xử lý BME; A4. Phân đoạn 60% có xử lý BME.
 B1. Phân đoạn 60% không xử lý BME; B2. Phân đoạn 60% có xử lý BME;
 B3. Phân đoạn 80% không xử lý BME; B4. Phân đoạn 80% có xử lý BME.

Kết quả điện di SDS-PAGE và điện di nhuộm hoạt tính cũng cho thấy cả hai loại protease thu nhận được điều ở dạng đơn phân và không có cầu nối disulfite trong cấu trúc phân tử của chúng. Trước đó, Singh và ctv. (2001) đã công bố tinh

sạch được một protease đơn phân tử có khối lượng vào khoảng 28,7kDa từ *Bacillus sphaericus*.

Do các phân đoạn enzyme sau khi kết tủa còn lẫn nhiều protein tạp nên cần được nghiên cứu tinh sạch tiếp theo bằng phương pháp sắc ký và

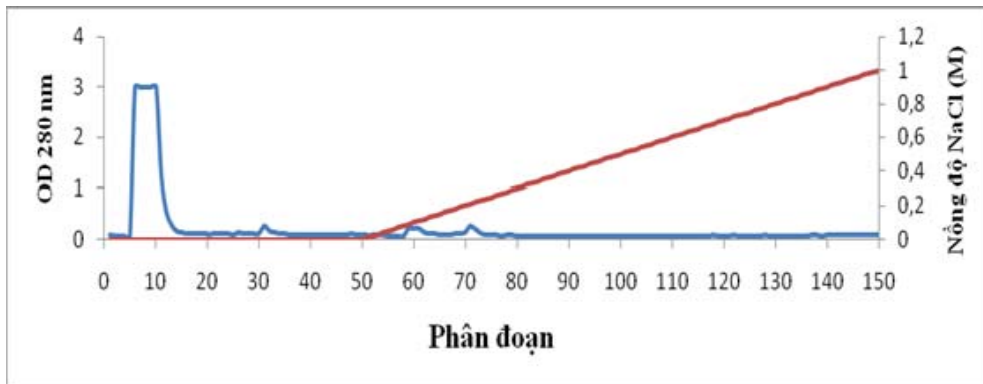
phân đoạn 60% AS bão hòa có hoạt tính riêng cao nhất (9,5 U/mg) được chọn cho các bước tinh sạch tiếp theo.

3.1.2 Tinh sạch bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion (ion exchange chromatography)

a. Sắc ký trao đổi ion dương

Sau khi cho phân đoạn 60% bão hòa đi qua cột sắc ký trao đổi ion dương SP-streamline, hầu như toàn bộ protein của phân đoạn này không bám vào

gel sắc ký và tập trung vào phân đoạn không bám với lượng protein tổng thu được ở phân đoạn này là 15,4 mg và hoạt tính riêng là 9,6 U/mg (Hình 2). Điều đó có nghĩa cột sử dụng SP-streamline với đệm phosphate 50mM pH 7,8 không thể tinh sạch được protease ở phân đoạn 60% AS bão hòa một cách hiệu quả. Do đó, toàn bộ phân đoạn protein không bám này được tiếp tục cho đi qua cột sắc ký trao đổi ion âm Unosphere Q với cùng một dung dịch đệm pH 7,8.

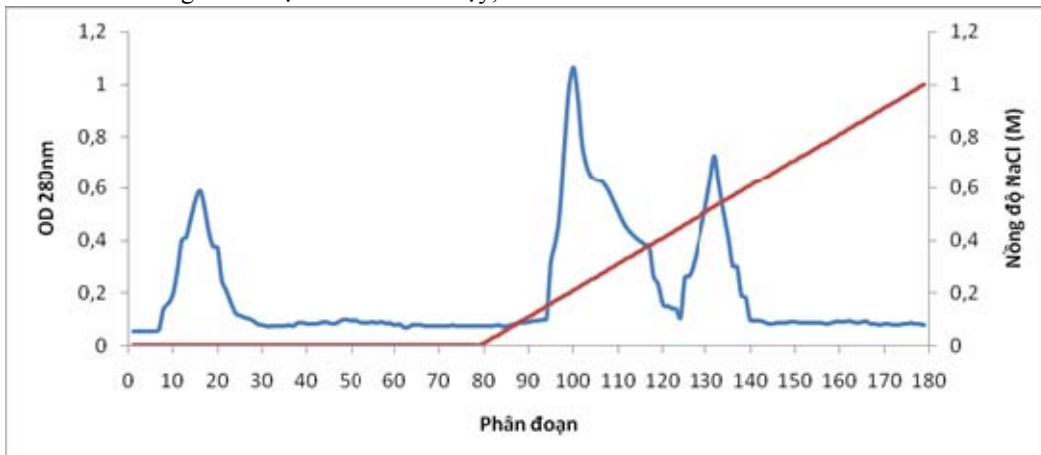


Hình 2: Biểu đồ sắc ký trên cột SP-streamline của phân đoạn protein 60% bão hòa

b. Sắc ký trao đổi ion âm

Sau khi cho phân đoạn không bám đi qua cột sắc ký trao đổi ion âm Unosphere Q với đệm phosphate 50mM pH 7,8 thu được 3 phân đoạn protein gồm phân đoạn không bám, phân đoạn F1 và F2 (Hình 4). Trong đó, phân đoạn không bám có hoạt tính riêng là 182 U/mg; hai phân đoạn F1 và F2 hoàn toàn không có hoạt tính. Như vậy,

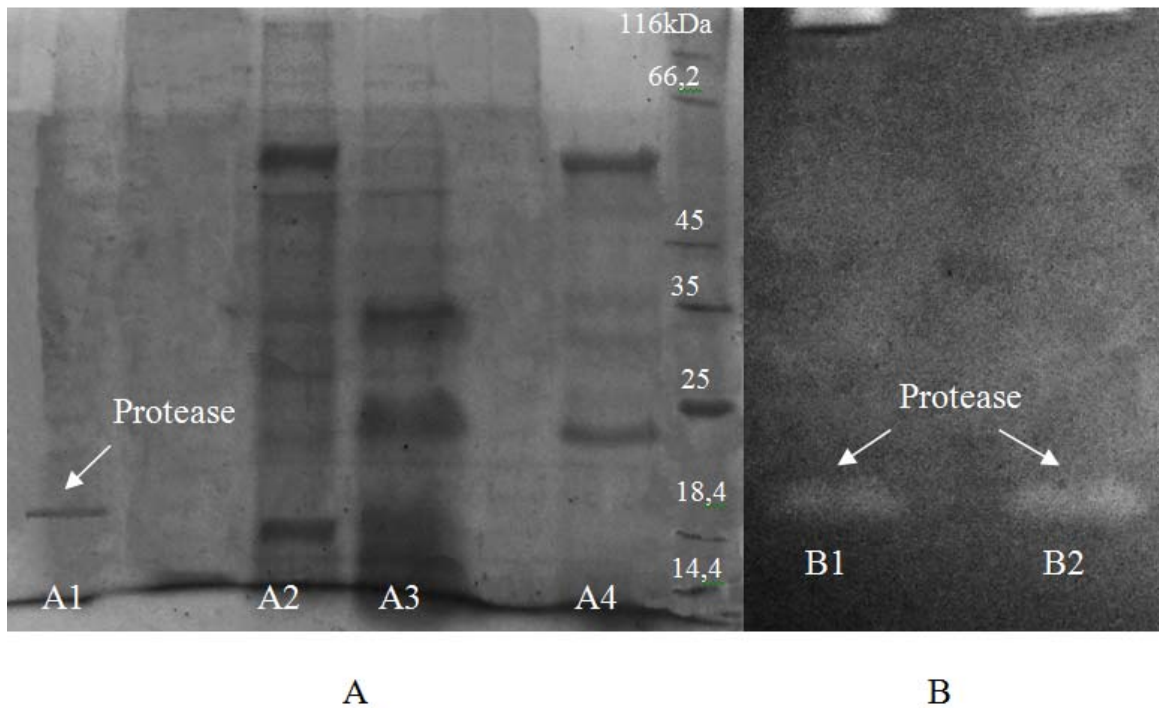
protease đều không bám vào gel ở cả hai cột SP-streamline và Unosphere Q ở pH 7,8. Điều này có thể là do protease có giá trị pI rất gần với giá trị của dung dịch đệm phosphate là 7,8. Chính vì vậy, protease chỉ có thể tương tác một cách lỏng lẻo với gel (trong cả hai trường hợp) nên dễ dàng đi ra khỏi cột chỉ nhờ vào lực ion rất yếu của dung dịch đệm.



Hình 3: Biểu đồ sắc ký trên cột UnosphereQ của phân đoạn protein 60% bão hòa

Mặc dù được đẩy ra khỏi cột trong phân đoạn không bám, nhưng kết quả điện di trên gel SDS-PAGE và điện di nhuộm hoạt tính với cơ chất

casein cho thấy protease đã được tinh sạch thành công bằng việc thể hiện một band duy nhất trên gel (Hình 4. A1).



Hình 4: Kết quả điện di các phân đoạn protein sau khi qua cột sắc ký (A) và kết quả điện di nhuộm hoạt tính trên gel casein (B)

A1: không bảm; A2: phân đoạn F2; A3: phân đoạn F1; A4: Dịch enzyme thô
 B1: không bảm không xử lý BME; B2: không bảm có xử lý BME

Theo Bảng 1, hiệu suất thu hồi protein sau khi tiến hành sắc khí trao đổi ion âm là 0,97%, tuy nhiên, protease được tinh sạch có hoạt tính riêng khá cao 182 U/mg với độ tinh sạch là 43,75 lần. Hoạt tính riêng của protease tinh sạch (182 U/mg)

cao hơn so với protease được từ *Bacillus* strain 18' (99,4 U/mg) trong nghiên cứu của Fujiwara và ctv (1991). Tuy nhiên thấp hơn so với protease từ *Bacillus hirokoshi* (1.232,5 U/mg) được công bố bởi Joo và Choi (2012).

Bảng 1: Bảng tổng kết các bước tinh sạch protease

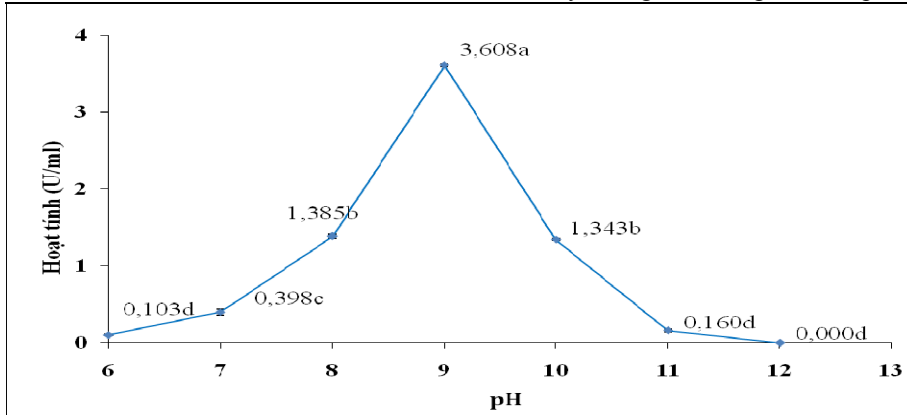
Bước tinh sạch	Thể tích (mL)	Protein (mg/mL)	Protein tổng (mg)	Hoạt tính (U/mL)	Hoạt tính tổng (U)	Hoạt tính đặc hiệu (U/mg)	Hiệu suất thu hồi protein (%)	Hiệu suất thu hồi hoạt tính (%)	Độ tinh sạch
Dịch enzyme thô	400	0,18	72	0,75	300,00	4,16	100	100	1
Tủa phân đoạn	20	0,78	15,60	7,44	148,80	9,54	21,67	49,60	2,29
Sắc ký trao đổi ion dương	20	0,77	15,4	7,41	148,20	9,62	21,39	49,40	2,31
Sắc ký trao đổi ion âm	35	0,02	0,70	3,64	127,4	182	0,97	42,47	43,75

3.2 Khảo sát một số yếu tố pH, nhiệt độ, ion Ca²⁺ và chất ức chế PMSF đến hoạt động của protease

3.2.1 Ảnh hưởng của Ph

Kết quả khảo sát hoạt động của protease ở các điều kiện pH khác nhau từ 6-12 (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) cho thấy protease có thể hoạt động tốt trong khoảng pH từ 8-10 và hoạt động tối ưu ở pH 9 với

hoạt tính là 3,610 U/ml (Hình 5); hầu như mất hoàn toàn hoạt tính ở pH ≥12. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Kumar và Takagi (1999) trong đó các protease chịu kiềm từ vi khuẩn thông thường có pH tối ưu trong khoảng 9 đến 11. Trong các nghiên cứu của Joo và ctv. (2002) và Manachini và Fortina (1998) trên protease từ *Bacillus horikoshi* và *Bacillus licheniformis* trên cơ chất casein đều cho thấy chúng hoạt động tối ưu ở pH 9.

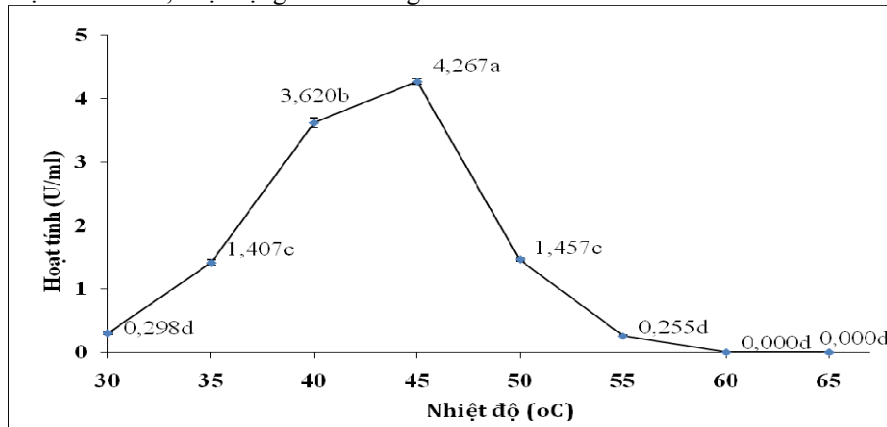


Hình 5: Ảnh hưởng của pH đến hoạt động của protease

3.2.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của protease

Sau khi khảo sát hoạt động của protease ở điều kiện nhiệt độ khác nhau (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 và 65°C) cho thấy protease có thể hoạt động trong khoảng nhiệt độ từ 35-50°C, hoạt động tối ưu trong

khoảng 45°C và mất hoạt tính khi ủ ở nhiệt độ ≥ 60°C (Hình 6). Như vậy, protease có cùng nhiệt độ hoạt động tối ưu với protease từ *Bacillus horikoshi* (45°C) (Joo et al., 2002) nhưng thấp hơn so với protease từ *Bacillus licheniformis* (70°C) (Manachini & Fortina., 1998).



Hình 6: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của protease

3.2.3 Ảnh hưởng của ion Ca²⁺ lên hoạt động của protease

Sự hiện diện của 2,5 mM ion Ca²⁺ trong hỗn hợp phản ứng giúp nâng cao hoạt tính của protease gấp hai lần từ 3,61 U/ml lên đến 7,185 U/ml. Khi gia tăng nồng độ ion Ca²⁺ lên 5mM và 10mM

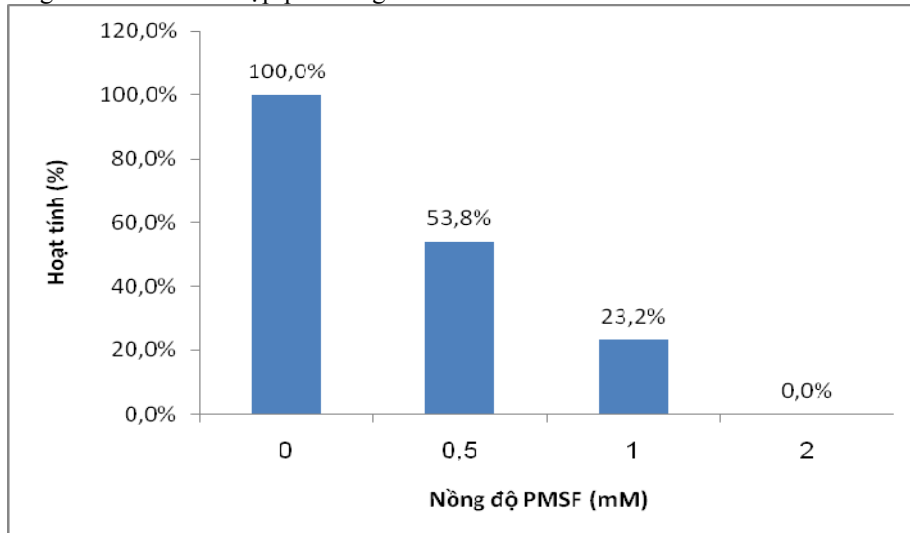
không cho thấy sự nâng cao về hoạt tính cũng như ức chế đối với protease (Bảng 2). Một nghiên cứu của Horikoshi (1999) cũng cho thấy protease từ chủng *Bacillus* 221 tăng 70% hoạt tính khi bổ sung 5 mM Ca²⁺ vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ tối ưu là 60°C.

Bảng 2: Ảnh hưởng của ion Ca²⁺ đến hoạt động của protease

Nồng độ Ca ²⁺	Hoạt tính (U/ml)
0	3,61b
2,5	7,18a
5	7,16a
10	7,17a

3.2.4 Ảnh hưởng của PMSF lên hoạt động của protease

Khi bổ sung PMSF vào hỗn hợp phản ứng cho



Hình 7: Ảnh hưởng của chất ức chế PMSF đến hoạt động của protease

4 KẾT LUẬN

Kết quả phân đoạn ammonium sulphate kết hợp với sắc ký trao đổi ion trên cột SP-Streamline và Unosphere Q cho phép tinh sạch một protease kiềm tính có khối lượng phân tử trong khoảng 19,2 kDa từ dịch nuôi cấy *Bacillus* sp.SV1. Protease này hoạt động tối ưu ở pH 9,0, nhiệt độ 45°C, với sự hiện diện của ion Ca²⁺ (2,5 mM). Đây có thể là một serine protease, do ở nồng độ PMSF 2,0 mM hoạt tính enzyme bị ức chế hoàn toàn.

LỜI CẢM ƠN

Cám ơn Viện Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện vật chất cho thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dương Thị Hương Giang. 2010. Bài giảng hóa protein. Viện nghiên cứu và phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

thấy PMSF làm giảm hoạt động của protease. Protease bị ức chế hoàn toàn khi có sự hiện diện của 2 mM PMSF trong hỗn hợp phản ứng (Hình 10). Điều này cho thấy protease tinh sạch được có thể thuộc nhóm serine protease. PMSF tấn công vào vị trí của serine trong tâm hoạt động từ đó làm protease mất đi khả năng xúc tác phản ứng phân hủy protein. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Gupta và ctv. (2002) cho rằng hầu hết các protease kiềm tính là những serine protease hoặc metallo-protease.

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.

- Fujiwara, N., K. Yamamoto, and A. Masui. 1991. Utilization of thermostable alkaline protease from an alkaliphilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film. *Ferment. Bioeng.*, 72:306-308
- Genckal, H. 2004. Study on alkaline protease production from *Bacillus* sp. (Unpublish master's thesis). Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey.
- Gupta, R., Q.K. Beg., S. Khan and B. Chauhan. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 381.
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(4): 735.

7. Joo, H., G. Kumar, G., Park, K. T., Kim, S. R., Paik and C., Chang. 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Proc. Biochem.*, 38:155.
8. Joo, H., and J., W., Choi. 2012. Purification and characterization of a novel alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Biol. Chem.*, 64: 234-235.
9. Khan, M.A., N. Ahmad, U.A. Zafar, I.A. Nasir, and M.A. Qadir. 2011. Isolation and screening of alkaline protease producing bacteria and physio-chemical characterization of the enzyme. *Afr. J. Biotech.*, 10(33): 6203-6212.
10. Kumar, C.G. and H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.*, 17:561.
11. Kunitz, M. 1947. Crystalline soyabean trypsin inhibitor. II. General properties. *Gen. Physiol.*, 30: 291-310.
12. Manachini, P. L, and M. G. Fortina. 1998. Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Letters*, 20: 565.
13. Singh, J., N. Batra, R. C. Sobti. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Proc. Biochem.*, 36: 781.