

## ĐẶC ĐIỂM PROTEASE NGOẠI BÀO TỪ CHỦNG *Bacillus tequilensis* ON1

Nguyễn Quang Lịch<sup>1\*</sup>, Nguyễn Đức Huy<sup>2</sup>, Trịnh Thị Phương Thảo<sup>2</sup>, Lê Thị Kim Thoa<sup>2</sup>, Lê Công Tuấn<sup>3</sup>,

<sup>1</sup>Khoa Kỹ thuật công nghệ, Đại học Huế, 01 Điện Biên Phủ, Huế, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, tỉnh lộ 10, Phú thượng, Phú Vang, Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Môi trường, Trường đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ Nguyễn Quang Lịch <nqlich@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 28-06-2021; Ngày chấp nhận đăng: 25-11-2021)

**Tóm tắt.** Từ mẫu bùn thải của ao nuôi tôm tại huyện Phong Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã phân lập được chủng vi khuẩn phân giải casein. Định danh phân tử thông qua giải trình tự 16S rRNA và so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank cho thấy chủng phân lập tương đồng cao với vi khuẩn *Bacillus tequilensis* và được đặt tên là *B. tequilensis* ON1. Hoạt tính protease ngoại bào đạt giá trị cao nhất 192,42 U·mL<sup>-1</sup> sau 24 giờ nuôi cấy. Điện di SDS-PAGE trên nền cơ chất cho thấy protease ngoại bào chính của chủng ON1 có khối lượng phân tử khoảng 130 kDa. Enzyme ngoại bào hoạt động tối ưu ở 50 °C và pH 8. Hoạt tính protease tăng lên khi có mặt Ca<sup>2+</sup> và Mg<sup>2+</sup>, trong khi đó Mn<sup>2+</sup> ức chế hoạt động của protease. Protease hoạt động và ổn định hơn trong các dung môi hữu cơ kỵ nước.

**Từ khóa:** *Bacillus tequilensis*, bùn thải, tôm, protease

## Characterization of extracellular protease produced by *Bacillus tequilensis* ON1

Nguyen Quang Lich<sup>1\*</sup>, Nguyen Duc Huy<sup>2</sup>, Trinh Thi Phuong Thao<sup>2</sup>, Le Thi Kim Thoa<sup>2</sup>, Le Cong Tuan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of Technology and Engineering, Hue University, 01 Dien Bien Phu St., Hue, Vietnam

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Vietnam

<sup>3</sup>Department of Environmental Science, University of Sciences, Hue University, Hue, Vietnam

\* Correspondence to Nguyen Quang Lich <nqlich@hueuni.edu.vn>

(Received: 28 June 2021; Accepted: 25 November 2021)

**Abstract.** A bacterial strain with casein hydrolytic activity was isolated from shrimp waste sludge from a culture pond at Phong Dien, Thua Thien Hue. Molecular identification using 16S rRNA nucleotide sequence shows a high similarity to *Bacillus tequilensis* on the NCBI database. Hence, the isolate was named *B. tequilensis* ON1. Extracellular protease activity value is 192,42 U·mL<sup>-1</sup> after 24 h culture. Zymogram SDS-PAGE electrophoresis shows that the major extracellular protease has a molecular weight of 130 kDa. The enzyme exhibits maximal activity at 50 °C and pH 8. Protease activity increases in the presence of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions, while Mn<sup>2+</sup> inhibits protease activity. The protease activity was more active and stable in hydrophobic organic solvents.

**Keywords:** *Bacillus tequilensis*, sludge, shrimp, protease

## 1 Mở đầu

Trong quá trình nuôi tôm, các hộ nuôi tôm thường sử dụng các loại thức ăn công nghiệp chứa hàm lượng protein cao để giúp tôm sinh trưởng. Lượng thức ăn thừa không được tôm sử dụng hết, cùng với phân tôm và xác tảo chết tích tụ nhiều, đã dẫn đến lượng bùn tích lũy trong ao khá lớn sau mỗi vụ nuôi tôm. Thông thường, một lượng lớn bùn nuôi trồng thủy sản được xả và bơm ra từ cống đáy ao. Bùn chứa nhiều protein, amoniac, nitrit, nitrat, cacbon hữu cơ, phốt phát, chất rắn lơ lửng và nhu cầu oxy hóa học (COD) [1]. Hoạt động xả thải nguồn nước trong ao và bơm bùn đáy ao trong nuôi tôm thâm canh và bán thâm canh ra kênh rạch tự nhiên mà chưa được xử lý sẽ làm cho hệ thống kênh rạch bị bồi lắng, môi trường nước tự nhiên bị ô nhiễm nghiêm trọng. Nếu việc xả thải diễn ra liên tục, không có thời gian gián đoạn để môi trường phục hồi thì mùn bã hữu cơ sẽ tích lũy làm môi trường nước trở nên phú dưỡng, nghề nuôi tôm thâm canh và bán thâm canh sẽ lại càng chịu rủi ro nhiều hơn nữa. Vì vậy, bùn thải phải được xử lý một cách hiệu quả để không làm ô nhiễm nước mặt, nước ngầm và các vấn đề môi trường khác [2, 3].

Phương pháp sinh học sử dụng protease để xử lý bùn thải đã được xem là một phương pháp xử lý hiệu quả đối với protein dư thừa trong nước thải chăn nuôi bò sữa, bùn hoạt tính, nước thải lò mổ và bùn thải [4]. Protease dùng để chỉ một nhóm enzyme quan trọng có tác dụng thủy phân hoặc phân hủy các phân tử protein và tham gia vào nhiều con đường sinh hóa khác nhau trong tế bào sống. Đối với vi sinh vật, protease cần thiết cho nhiều chức năng của tế bào vì chúng rất hữu ích trong quá trình tiêu hóa nhờ khả năng phá vỡ các liên kết peptit trong protein của thức ăn và giải phóng các axit amin cần thiết cho cơ thể [5]. Vi sinh vật trong bùn thải với điều kiện sống khác nghiệt

có tiềm năng tạo ra protease và các enzyme thủy phân khác có hoạt tính cao. Sử dụng protease để phân hủy protein sẽ là một nỗ lực lớn để giảm thiểu ô nhiễm hữu cơ trong bùn thải. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất protease mạnh từ bùn thải ao nuôi tôm và xác định một số đặc điểm của enzyme này.

## 2 Phương pháp

### 2.1 Vật liệu

Bùn thải được lấy từ ao nuôi tôm tại huyện Phong Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế.

### 2.2 Phân lập các chủng có hoạt tính protease

Cho 1 mL bùn thải cho vào ống nghiệm chứa 9 mL nước cất vô trùng, khuấy mạnh trên máy khuấy (vortex) và pha loãng tiếp đến tỉ lệ  $10^{-4}$  hoặc  $10^{-5}$ . Hút lần lượt 100  $\mu$ L mẫu đã pha loãng nhỏ lên bề mặt đĩa Petri chứa môi trường casein agar (1% casein và 2% agar), dùng que trải phân phối dịch mẫu đều khắp mặt thạch. Đĩa môi trường đã trải mẫu được ủ ở 30 °C trong 72 giờ. Các khuẩn lạc có vòng phân giải casein được lựa chọn và thuần chủng trên môi trường LB.

### 2.3 Định danh phân tử

DNA của chủng vi khuẩn được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và cs. [6]. Sinh khối tế bào được thu hồi bằng ly tâm trong năm phút ở 14.000 vòng/phút và 4 °C. Sau đó, rửa lại bằng nước cất vô trùng để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy và tái huyền phù trong 500  $\mu$ L đệm CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8, 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA, 2% CTAB, 0,2%  $\beta$ -mercaptoethanol). Hỗn hợp sau đó được ủ ở 65 °C trong 30 phút. Dịch chiết tế bào chứa DNA tổng số được ly tâm trong năm phút ở 14.000 vòng/phút

và 4 °C. DNA tổng số được tách chiết và tinh chế với 500 µL hỗn hợp phenol/chloroform/isopropanol (tỷ lệ 25:24:1), trộn đều bằng vortex và phân tách bằng ly tâm lạnh với tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C. Khoảng 400 µL pha trên được chuyển sang ống 1,5 mL mới. DNA tổng số được kết tủa với hai lần thể tích ethanol tinh khiết, rửa kết tủa bằng ethanol 70% và hòa tan trong 50 µL nước cất vô trùng. Điện di kiểm tra DNA tổng số trên gel agarose 0,8% ở 80 V trong 55 phút. Gel được quan sát dưới đèn tử ngoại (UV transilluminator, Wealtec).

Sau khi kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 0,8%, chúng tôi sử dụng DNA tổng số làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng cặp primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Thành phần PCR bao gồm 6 µL 2× GoTaq Green master mix (Promega, Mỹ), 10 pmol mỗi primer, 50 ng genomic DNA và nước cất vừa đủ 12 µL. Sau khi được biến tính ở 95 °C trong 5 phút, chúng tôi tiến hành chu trình nhiệt PCR bao gồm các bước: biến tính ở 95 °C trong một phút, bắt cặp ở 55 °C trong một phút, kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây, lặp lại 30 chu kỳ. Sau đó, phản ứng PCR được tiến hành ở 72 °C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarose gel 0,8%.

Sản phẩm PCR được gửi đến công ty Firstbase (Malaysia) để tinh chế và giải trình tự nucleotide bằng phương pháp Sanger. Trình tự nucleotide được so sánh đối chiếu với dữ liệu trên GenBank. Cây phát sinh loài được xây dựng sử dụng phần mềm MEGA X, sử dụng phương pháp Maximum Likelihood [7].

## 2.4 Xác định hoạt độ protease

Hoạt độ protease của chủng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp Sigma với cơ chất casein [8]. Một đơn vị hoạt độ của protease được định nghĩa là lượng enzyme thủy phân casein giải

phóng ra một lượng amino acid tương đương 1 µmol (181 mg) tyrosine trong một phút ở pH 7,5 và 37 °C.

Năm mili lít cơ chất casein 0,65% được ủ trong bể ủ nhiệt ở 37 °C. Sau năm phút, bổ sung 1 mL enzyme và phản ứng được dừng lại sau 10 phút bằng cách bổ sung 5 mL tricloacetic acid 5%. Protein được kết tủa trong 30 phút. Hỗn hợp sau đó được đem đi ly tâm trong 10 phút ở 6000 vòng/phút và 4 °C. Hai mili lít dịch ly tâm được trộn với 5 mL dung dịch Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M cùng với 1 mL thuốc thử folin 1 M. Độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 660 nm. Dựa vào đường chuẩn tyrosine để tính hoạt độ enzyme.

$$\text{Unit/mL enzyme} = \frac{\mu\text{mol Tyrosine} \times 11}{10 \times 2 \times 1}$$

trong đó 11 là tổng thể tích hỗn hợp phản ứng enzyme (mL); 10 là thời gian phản ứng (phút); 1 là thể tích enzyme dùng cho phản ứng (mL); 2 là thể tích dùng để đo cường độ quang sau phản ứng với thuốc thử folin (mL)

## 2.5 Xác định đường cong sinh trưởng

Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng ở nhiệt độ phòng, tốc độ lắc 180 vòng/phút, sau mỗi bốn giờ tiến hành đo mật độ quang (OD) ở 600 nm để xác định đường cong sinh trưởng.

## 2.6 Sản xuất protease ngoại bào

Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB. Sau 16 giờ nuôi cấy, huyền phù tế bào (1%, v/v) được chuyển sang môi trường sản xuất protease (1% casein, 0,2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,05% NaCl, pH 7,4) trong 32 giờ ở tốc độ lắc 180 vòng/phút. Protease ngoại bào được thu sau mỗi bốn giờ bằng cách ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C [9]. Hoạt độ enzyme được xác định bằng phương pháp đã mô tả ở trên.

## 2.7 Điện di SDS – PAGE và điện di cơ chất

Điện di trên gel sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide (SDS-PAGE) được thực hiện theo phương pháp của Wang và cs. Mười lăm micro lít dịch nuôi cấy sau khi ly tâm được trộn với 2 × loading dye buffer. Hỗn hợp sau đó được điện di trên gel SDS-PAGE với stacking gel 5% và separating polyacrylamide gel 12%. Gel được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue R-250 và rửa trong dung dịch acetate methanol. Zymogram được thực hiện bằng cách sử dụng gel separating polyacrylamide 12% có bổ sung 0,8 mg/mL cơ chất casein. Buồng điện di được đặt trong tủ lạnh ở 4 °C trong suốt quá trình điện di. Sau khi điện di, gel được rửa hai lần bằng Triton X-100 2,5% (v/v) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ SDS; rửa ba lần bằng nước cất và ủ trong đệm phản ứng (50 mmol/L Tris – HCl pH 8,3, 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub>) ở 37 °C trong hai giờ. Nhuộm và rửa gel giống như SDS-PAGE. Sự xuất hiện của một vùng sáng rõ ràng trên nền xanh đen của gel cho thấy có sự xuất hiện của hoạt tính protease [9].

## 2.8 Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt tính protease

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của protease được xác định bằng cách ủ protease với cơ chất casein 0,65% ở các nhiệt độ khác nhau, từ 20 đến 70 °C trong 10 phút. Xác định hoạt tính của protease tại các nhiệt độ trên. Thí nghiệm được thực hiện nhằm tìm ra nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzyme protease.

Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của enzyme được tiến hành với nhiệt độ thích hợp chọn ra từ thí nghiệm trước. Dịch enzyme thô được ủ với đệm phản ứng có pH từ 2 đến 12 (bao gồm đệm glycine HCl (pH 2–3), sodium acetate (pH 4–5), đệm sodium phosphate (pH 6–8) và glycine-NaOH (pH 9–12)). Hoạt tính protease được xác định theo phương pháp mô tả ở trên.

## 2.9 Ảnh hưởng của ion kim loại và chất ức chế đến hoạt tính protease

Ảnh hưởng của các ion kim loại đối với protease được kiểm tra bằng cách ủ hỗn hợp phản ứng bao gồm dịch enzyme, cơ chất casein với muối của các kim loại: Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> và K<sup>+</sup> ở nồng độ 1 mM với pH và nhiệt độ đã được xác định ở trên trong một giờ. Mẫu đối chứng không bổ sung ion kim loại.

Ảnh hưởng của các chất ức chế enzyme khác nhau đối với hoạt động của protease đã được kiểm tra bằng cách sử dụng ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) và β-mercaptoethanol. Protease được ủ trước ở 25 °C trong một giờ với mỗi tác nhân ở nồng độ cuối cùng là 1 mM. Đối chứng đã được ủ trước mà không có chất ức chế.

## 2.10 Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ đến hoạt tính protease

Hoạt tính của protease được xác định bằng phương pháp mô tả ở trên khi có mặt 30% dung môi hữu cơ (v/v) ở nhiệt độ và pH tối ưu. Methanol, ethanol, isopropanol, acetone và hexane được sử dụng làm dung môi hữu cơ trong hỗn hợp phản ứng. Hoạt động protease ở mẫu không chứa dung môi được sử dụng làm đối chứng.

## 2.11 Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và tính giá trị trung bình. Xử lý số liệu bằng phần mềm Excel 2010.

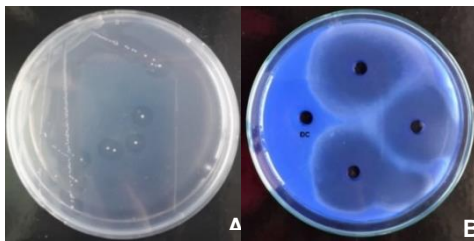
## 3 Kết quả và thảo luận

### 3.1 Phân lập và định danh chủng *Bacillus tequilensis* ON1

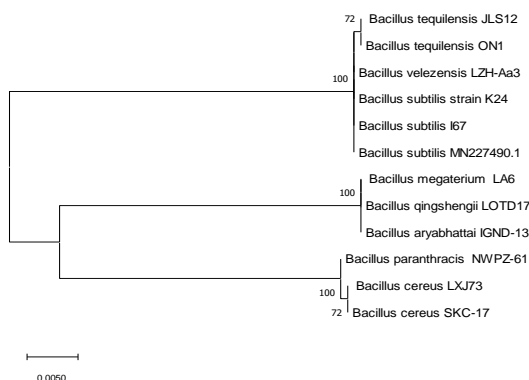
Từ các mẫu bùn thải nuôi tôm, chúng tôi đã phân lập chủng vi khuẩn ON1 và tạo vòng phân giải lớn nhất trên môi trường casein agar. Đây là một chủng có khả năng sản xuất protease tốt (Hình

1A). Chúng vi khuẩn sau đó được nuôi trên môi trường sản xuất protease; hoạt tính enzyme được kiểm tra trên đĩa thạch. Hoạt tính protease của chủng ON1 rất mạnh với đường kính vòng phân giải casein trên đĩa thạch là  $35,67 \pm 2,9$  mm (Hình 1B).

Chúng vi khuẩn này có các đặc điểm hình thái, sinh hóa và sinh lý như Gram dương, catalase dương tính, có khả năng di động và có hình que. Gen 16S rRNA của chủng ON1 được khuếch đại, giải trình tự và sau đó được so sánh với các chủng vi khuẩn khác bằng phân tích BLAST trong cơ sở dữ liệu NCBI. Kết quả cho thấy trình tự của chủng ON1 tương đồng 100% với chủng *B. tequilensis* JLS 12. Vì vậy, chủng này được đặt tên là *B. tequilensis* ON1. Cây phát sinh loài của chủng *B. tequilensis* ON1 được trình bày trên Hình 2. Trình tự nucleotide 16S rRNA đã được gửi lên ngân hàng gen (GenBank) với mã số MZ396456.



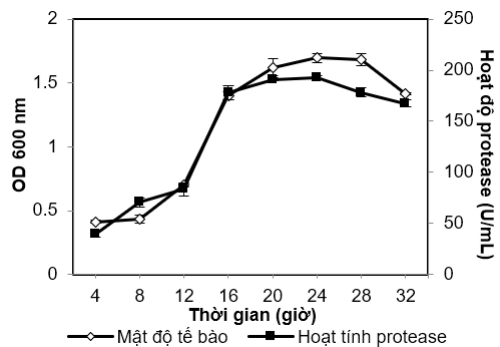
Hình 1. Vòng phân giải casein của chủng *B. tequilensis* ON1



Hình 2. Cây phát sinh loài của chủng *B. tequilensis* ON1 và một số chủng *Bacillus* khác trên GeBank. Cây có mức độ tương đồng likelihood cao nhất được lựa chọn. Các chữ số biểu diễn phần trăm của cây phát sinh có liên quan đến nhóm phân loại tiếp theo

### 3.2 Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh protease

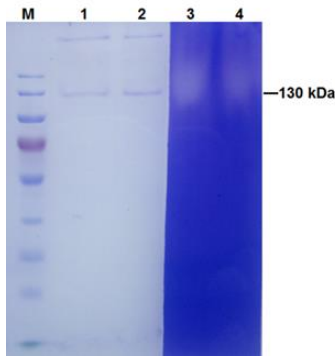
Giai đoạn thích nghi của chủng ON1 là 0–8 giờ. Lúc này, protease ít được sản xuất; từ 8 giờ đến 20 giờ vi khuẩn ở pha log phát triển sinh khối tế bào nhanh. Giai đoạn từ 20 đến 32 giờ thuộc pha cân bằng và pha suy vong. Khả năng sản xuất protease của chủng ON1 tương đồng với mật độ tế bào. Ở giai đoạn thích nghi, hoạt độ protease thu được thấp; khi mật độ tế bào tăng dần, hoạt độ protease tăng theo đến pha cân bằng thì đạt cực đại (192,42 U/mL) sau 24 giờ và sau đó giảm dần. Kết quả này tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước: chủng *B. stearothermophilus* và *B. mojavensis* có hoạt tính mạnh nhất sau 24 giờ nuôi cấy sản xuất enzyme [10]. Tuy nhiên, một số chủng *Bacillus* khác như *B. subtilis* có mức sản xuất protease cao sau 36 giờ nuôi cấy [11] và chủng *B. tequilensis* ZMS-2 sản xuất protease mạnh nhất sau 72 giờ nuôi cấy [12]. Sự khác biệt về nguồn mẫu phân lập có thể là nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt về thời gian sản xuất enzyme của các chủng *Bacillus* khác nhau.



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh protease của chủng *B. tequilensis* ON1. Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình của ba lần lặp lại và được xử lý với sai số chuẩn.

### 3.3 Điện di SDS-PAGE và zymogram

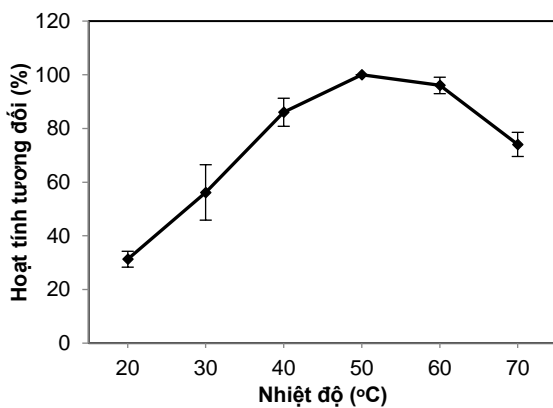
Khối lượng phân tử của protease đã được xác định bằng điện di SDS-PAGE và điện di cơ chất. Protease từ chủng ON1 có khối lượng phân tử khoảng 130 kDa (Hình 4). Điện di hoạt tính protease cho thấy một vùng sáng rõ ràng xuất hiện tại vị trí tương ứng trong gel.



**Hình 4.** Hình ảnh điện di SDS – PAGE và zymogram của enzyme protease từ *B. tequilensis* ON1. M. PageRuler™ Prestained Protein (Thermo Scientific), 1–2: Protease điện di trên gel sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide, 3–4: Zymogram của protease.

### 3.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt tính protease

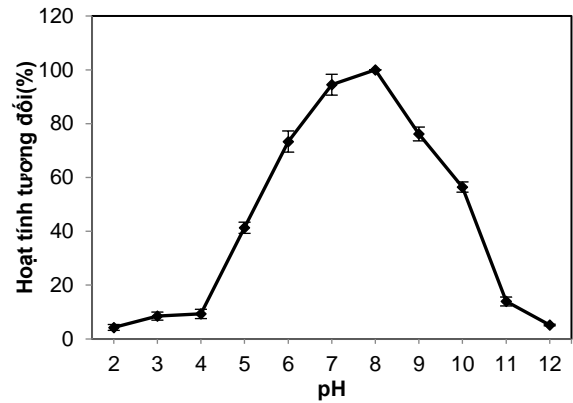
Mỗi enzyme chỉ hoạt động mạnh ở một khoảng nhiệt độ và pH thích hợp; tại đó, phản ứng xảy ra nhanh nhất. Kết quả khảo sát mức độ ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt tính của protease sản xuất từ *B. tequilensis* ON1 được trình bày ở Hình 5 và Hình 6.



**Hình 5.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính protease ngoại bào. Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình của ba lần lặp lại và được xử lý với sai số chuẩn.

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme. Nhiệt độ càng tăng, hoạt lực của enzyme cũng tăng theo, nhưng đến một mức nhiệt độ giới hạn thì hoạt lực enzyme lại giảm xuống. Điều này được minh

chứng khá rõ ràng ở Hình 5: hoạt tính enzyme của chủng ON1 đạt mức cao nhất ở 50 °C. Khi tăng nhiệt độ lên 60 và 70 °C, hoạt tính enzyme giảm dần chỉ còn 74,04% so với hoạt tính ở 50 °C.



**Hình 6.** Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính protease ngoại bào. Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình của ba lần lặp lại và được xử lý với sai số chuẩn.

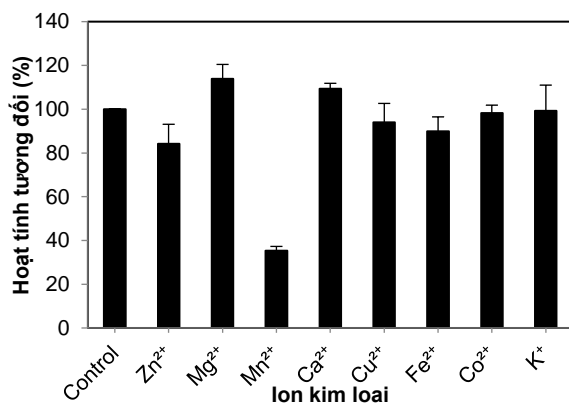
Ngoài ảnh hưởng của nhiệt độ, enzyme cũng rất nhạy cảm với sự thay đổi pH của môi trường. Hoạt tính protease thay đổi theo các giá trị pH đã khảo sát và hoạt tính cao nhất đạt được ở pH 8 (Hình 6). Trong điều kiện khảo sát, khi pH của môi trường tăng từ 5 đến 7, hoạt tính protease có xu hướng tăng dần với hoạt tính tương đối tăng từ 40,34 đến 94,48% so với hoạt tính enzyme ở pH 8. Ở khoảng pH cao hơn pH tối ưu, hoạt tính enzyme giảm rất đáng kể. Hoạt tính tương đối chỉ còn 76,17% ở pH 9 và 13,94% ở pH 11 so với hoạt tính của protease ở pH tối ưu. Protease từ chủng *B. flexus* APCMST và *Bacillus* sp. APCMST-RS7 cũng thể hiện hoạt tính mạnh nhất ở pH 8 và 50 °C [13].

### 3.5 Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính protease

Sự có mặt của ion kim loại ảnh hưởng đến enzyme theo nhiều cơ chế khác nhau. Kim loại có thể làm tăng hay giảm khả năng xúc tác của enzyme. Nếu không tham gia vào việc hình thành cấu trúc của enzyme thì ion kim loại ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme ở mức độ giữ vững cấu hình không gian, hay làm tăng tốc độ phản ứng thông

qua việc tạo phức với cơ chất hoặc tham gia làm cầu nối kết hợp cơ chất với trung tâm hoạt động của enzyme [14].

Mg<sup>2+</sup> và Ca<sup>2+</sup> kích hoạt hoạt động của protease lên đến 113,86 và 109,38%, còn Mn<sup>2+</sup> lại ức chế mạnh, làm cho hoạt độ tương đối giảm xuống còn 35,36% (Hình 7). Khi có mặt của các ion kim loại Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> và K<sup>+</sup>, protease vẫn giữ được hoạt tính lần lượt là 84,13, 93,99, 89,9, 98,22 và 99,3% so với mẫu đối chứng. Nói chung, sự có mặt của Ca<sup>2+</sup> và Mg<sup>2+</sup> thường thúc đẩy hoạt động của enzyme. Có thể sự thay đổi cấu trúc đã làm cho enzyme có hoạt tính xúc tác mạnh hơn. Tuy nhiên, các ion kim loại có ảnh hưởng khác nhau đến hoạt động của các loại protease khác nhau. Hoạt tính protease từ *B. mojavensis* SA và *B. licheniformis* A10 tăng lên khi có mặt của Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> và Mn<sup>2+</sup> [15, 16]. Hoạt động của protease từ *B. circulans* DZ100 tăng lên khi có mặt của Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> và Cu<sup>2+</sup>. Ngược lại, hoạt tính của *B. subtilis* HQS-3 protease lại giảm khi có mặt Zn<sup>2+</sup> và Cu<sup>2+</sup> [17, 18].



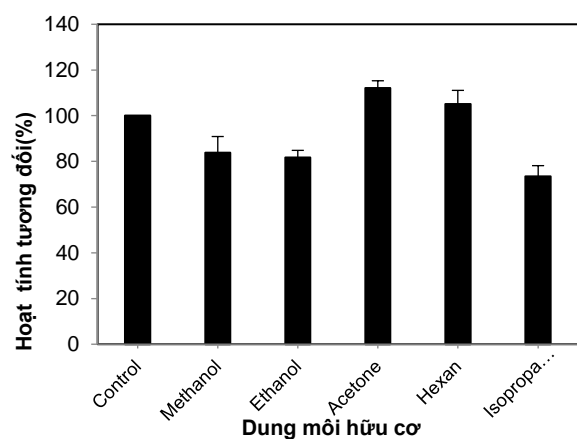
**Hình 7.** Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính protease. Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình của ba lần lặp lại và được xử lý với sai số chuẩn.

Protease *B. tequilensis* ON1 hoạt động tối ưu ở pH 8. Bên cạnh đó, hoạt độ tương đối của protease tăng lên (108,42%) khi có mặt EDTA, một chất ức chế đối với metalloprotease.  $\beta$ -Mercaptoethanol, một chất ức chế đối với nhóm cysteine protease, không ảnh hưởng lớn đến hoạt độ tương đối của enzyme (93,23%). Điều này cho

thấy protease *B. tequilensis* ON1 thuộc nhóm alkaline protease [19, 20].

### 3.6 Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ đến hoạt tính protease

Protease có hoạt tính tăng lên 112,15 và 105,17% với 30% (v/v) dung môi acetone và hexane. Còn các dung môi như methanol, ethanol và isopropanol làm giảm hoạt tính protease xuống còn lần lượt là 83,79, 81,74 và 73,38% (Hình 8). Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ đến hoạt động của protease thay đổi tùy theo các loại protease và dung môi. Thông thường, protease hoạt động và ổn định hơn trong các dung môi kỵ nước. Hoạt tính enzyme của protease từ *B. pumilus* 115b và 146 tăng lên khi có mặt các dung môi kỵ nước như hexane, 1-decanol, isooctane và n-dodecane (25%, v/v) [21].



**Hình 8.** Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ đến hoạt tính protease. Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình của ba lần lặp lại và được xử lý với sai số chuẩn.

## 4 Kết luận

Đã phân lập được chủng *B. tequilensis* ON1 có khả năng sản xuất protease mạnh từ bùn thải ao nuôi tôm tại Thừa Thiên Huế. Protease của chủng ON1 có khối lượng phân tử 130 kDa. Enzyme này hoạt động tối ưu ở 50 °C và pH 8. Hoạt tính protease tăng lên khi có mặt ion Ca<sup>2+</sup> và Mg<sup>2+</sup>, còn Mn<sup>2+</sup> ức chế hoạt động của protease. Khi có mặt các ion kim loại Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> và K<sup>+</sup>, protease vẫn duy trì được hoạt tính trên 80%. Hoạt tính

protease tăng lên khi có mặt acetone và hexan. Protease của *B. tequilensis* ON1 hoạt động ổn định trong môi trường có nhiều ion kim loại và các dung môi hữu cơ và có tiềm năng được sử dụng để xử lý bùn thải ao nuôi tôm.

### Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được tài trợ từ Bộ Giáo dục và Đào tạo qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ mã số: B2020-DHH-18.

### Tài liệu tham khảo

1. Fatma Syahirah M, Nazaitulshila R. The Utilization of Pineapples Waste Enzyme for the Improvement of Hydrolysis Solubility in Aquaculture Sludge. *Journal of Energy and Safety Technology*. 2019;1(2-2):35-41.
2. Koyama M, Nagao N, Syukri F, Rahim AA, Kamarudin MS, Toda T, et al. Effect of temperature on thermophilic composting of aquaculture sludge: NH<sub>3</sub> recovery, nitrogen mass balance, and microbial community dynamics. *Bioresource technology*. 2018;265:207-13.
3. Hopkins JS, Sandifer PA, Browdy CL. Sludge management in intensive pond culture of shrimp: Effect of management regime on water quality, sludge characteristics, nitrogen extinction, and shrimp production. *Aquacultural Engineering*. 1994;13(1):11-30.
4. Domingues RF, Sanches T, Silva GS, Bueno BE, Ribeiro R, Kamimura ES, et al. Effect of Enzymatic Pre-Treatment On The Anaerobic Digestion Of Milk Fat For Biogas Production. *Food Research International*. 2015;73:26-30.
5. Contesini FJ, Melo RR, Sato HH. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical reviews in biotechnology*. 2018;38(3):321-34.
6. Sambrook J, Maccallum P, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd, editor. Cold Spring Harbor Press: NY; 2001.
7. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35:1547-9
8. Cupp-Enyard C. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *Journal of Visualized Experiments*. 2008;19:899.
9. Wang Q, Ji F, Wang J, Jiang B, Li L, An L, et al. Characterization of a salt-activated protease with temperature dependent secretion in *Stenotrophomonas maltophilia* FF11 isolated from frozen Antarctic krill. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2017;43(6):829-40.
10. Karray A, Alonazi M, Horchani H, Ben Bacha, Novel AA. Thermostable and Alkaline Protease Produced from *Bacillus stearothermophilus* Isolated from Olive Oil Mill Sols Suitable to Industrial Biotechnology. *Molecules*. 2021;26:1-15.
11. Panta G, Prakasha A, Beraa JVPPS, Panchpuri GVNSD, Kumara A, Panchpuri M, et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*. 2015;9(1):50-5.
12. Khan Z, Shafique M, Nawaz HR, Jabeen N, Naz SA. *Bacillus tequilensis* ZMS-2: A novel source of alkaline protease with antimicrobial, anti-coagulant, fibrinolytic and dehairing potentials *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;23(4):1913-8.
13. Maruthiah T, Immanuel G, Palavesam A. Purification and Characterization of Halophilic Organic Solvent Tolerant Protease from Marine *Bacillus* sp. APCMST-RS7 and Its Antioxidant Potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2015;87(1):207-16.
14. Robinson, PK. *Enzymes: principles and biotechnological applications*. *Essays in biochemistry*. 2015;59:1-41.
15. Hammami A, Fakhfakh N, Abdelhedi O, Nasri M, Bayoudh A. Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: Characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;108:56-68.
16. Yilmaz B, Baltaci MO, Sisecioglu M, Adiguzel A. Thermotolerant alkaline protease enzyme from *Bacillus licheniformis* A10: purification, characterization, effects of surfactants and organic solvents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2015;31(6):1241-7.
17. Benkiar A, Nadia Z, Badis A, Rezbani F, Soraya B, Rekek H, et al. *Biochemical and molecular*



- characterization of a thermo- and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2013;83:129-38.
18. Huang S, Pan S, Chen G, Huang S, Zhang Z, Li Y, et al. Biochemical characteristics of a fibrinolytic enzyme purified from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* HQS-3. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;62:124-30.
19. Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017; 15(1):115-126.
20. Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, Ashraf M. Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7:110.
21. Abd Rahman RNZR, Mahamad S, Salleh AB, Basri M. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2007;34(7):509-17.