

TỐI ƯU MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHỦNG VI SINH VẬT BIỂN *ACINETOBACTER* SP. QN6 SINH TỔNG HỢP PROTEASE

Quyền Đình Thi, Trần Thị Quỳnh Anh, Nguyễn Thị Thảo

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Từ các mẫu nước biển tại các vùng khác nhau, 35 chủng có hoạt tính protease đã được phân lập, trong đó chủng có ký hiệu QN6 sinh tổng hợp protease cao nhất (0,633 U/ml). Trình tự phân đoạn 16S rDNA của chủng QN6 cho thấy chủng này thuộc chi *Acinetobacter*, và được đăng ký GenBank DQ640274 (*Acinetobacter* sp. QN6). Một số điều kiện thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của *Acinetobacter* sp. QN6 đã được xác định. Sinh trưởng của chủng QN6 đạt tối thích ($OD_{600\text{ nm}}$: 3,9) sau 48 h nuôi cấy ở 30°C trong môi trường LB pH 7,0 bổ sung 20% (v/v) nước biển. Protease ngoại bào được sinh tổng hợp cao nhất sau 28 h nuôi cấy (0,51 U/ml). Lactose và cao nấm men là các nguồn carbon tốt nhất cho cả sinh trưởng lẫn sinh tổng hợp protease ($OD_{600\text{ nm}}$: 3,2 và 0,433 U/ml, và $OD_{600\text{ nm}}$: 3,6 và 0,509 U/ml, tương ứng). Nguồn nitrogen tốt nhất để sinh trưởng và sinh tổng hợp protease là peptone, $OD_{600\text{ nm}}$: 3,5 và 0,359 U/ml. Nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng và sinh tổng hợp protease là 30°C với $OD_{600\text{ nm}}$: 3,3 và 0,387 U/ml. pH tối thích cho sinh trưởng là 6,5 trong khi cho sinh tổng hợp protease là 7,0 (0,441 U/ml). Bổ sung 4% (w/v) casein là tốt nhất cho sinh trưởng ($OD_{600\text{ nm}}$: 4,8) trong khi 1% (w/v) casein là tối thích cho sinh tổng hợp protease (0,613 U/ml).

Từ khóa: *Acinetobacter* sp. QN6, các yếu tố môi trường, protease, sinh tổng hợp, sinh trưởng

MỞ ĐẦU

Protease là một nhóm enzyme thủy phân protein được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực. Trong công nghiệp thực phẩm và thức ăn gia súc, protease được sử dụng để sản xuất pho mát từ sữa (Mohanty *et al.*, 1999), nước giải khát giàu protein (Rao *et al.*, 1998), chế biến thịt cá (Phạm Thị Trân Châu, 1993), sản xuất thức ăn gia súc giàu đạm (Hoffman, 1974; Ghazi *et al.*, 2003), sản xuất bia, nước mắm (Phạm Thị Trân Châu *et al.*, 1991; Kristinsson, Rasco, 2000). Trên thế giới, ngành công nghiệp sản xuất xà phòng và các chất tẩy rửa sử dụng tới 50 - 60 ngàn tấn protease mỗi năm (chủ yếu là protease kiềm). Ngoài ra, protease cũng được sử dụng nhiều trong công nghiệp thuộc da (Riffel, Brandelli, 2002), sản xuất mỹ phẩm, y học và công nghiệp xử lý rác thải. Protease được coi là một trong ba nhóm enzyme công nghiệp lớn nhất, chiếm 60% tổng lượng enzyme trên toàn thế giới (Rao *et al.*, 1998).

Protease còn tham gia vào nhiều quá trình sinh lý phức tạp của tế bào, mô, cơ quan đến cơ thể. Chúng được phân bố rộng rãi trên nhiều đối tượng từ động vật (Sielecki *et al.*, 1991; Mohanty *et al.*, 1999), thực vật (Schechler, Berger, 1967; Lê Đức Ngọc *et al.*, 1996; Braudo *et al.*, 2001; Kaul *et al.*, 2002) cho tới vi sinh vật (Rao *et al.*, 1998). Trong đó,

protease từ vi sinh vật được nghiên cứu nhiều nhất để sản xuất ở quy mô thương mại. Việc sử dụng protease từ vi sinh vật có nhiều lợi ích như tốc độ sinh sản nhanh, dễ nuôi cấy, sinh trưởng được trên nhiều nguồn cơ chất rẻ tiền, dễ kiếm như các phế liệu, phế phẩm (Nguyễn Thị Thảo, Quyền Đình Thi, 2004). Đồng thời, quá trình tách chiết, chế biến các enzyme từ vi sinh vật khá dễ dàng, hiệu suất thu hồi và lợi nhuận cao.

Việt Nam là một nước có khí hậu nhiệt đới với bờ biển dài hơn 3000 km, đây là một tiềm năng rất lớn để khai thác và sử dụng các vi sinh vật biển. Tuy nhiên, cho tới nay những nghiên cứu về protease từ vi sinh vật biển còn rất hạn chế và ít được quan tâm. Xuất phát từ thực tế này, chúng tôi đã phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp protease mới và nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh tổng hợp protease và đánh giá tính chất lý hóa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Mẫu nước biển được lấy từ các vùng biển khác nhau: Đồ Sơn (Hải Phòng); Hạ Long, Bãi Cháy, Trà Cổ

(Quảng Ninh); Nha Trang; Cửa Lò (Nghệ An); Tiền Hải (Hà Tĩnh) và Vũng Tàu.

Tế bào *E. coli* DH5 α (Invitrogen), vector pTZ57R/T (Fermentas) được sử dụng để nhân dòng.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường LB: 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) cao nấm men; 1% (w/v) peptone, pH 7, khử trùng. Môi trường LBS là môi trường LB có bổ sung 20% (v/v) nước biển. Môi trường thạch được bổ sung 2% (w/v) agar.

Hóa chất

Các hóa chất dùng trong thí nghiệm được cung cấp từ các hãng hóa chất khác nhau: tryptone (Ấn Độ); cao nấm men (Biorad, Mỹ); casein (Sigma, Mỹ), proteinase K, EDTA, sodium dodecylsulfate, chloroform:isoamyl alcohol (24:1) (Merck, Đức), Tris-base (Promega), PCR master mix, *Eco*RI, *Hind*III (Fermentas, Litva); T4-ligase (Biolabs, Mỹ); agarose (Q-biogene). Các muối ion kim loại, tyrosine, Folin-Ciocalteu và các loại hóa chất khác đều ở dạng tinh khiết.

Cặp mồi 9F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') và 926R (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3') được sử dụng để khuếch đại phân đoạn 16S rDNA của vi khuẩn.

Phân lập

Mẫu nước biển được khuấy đều, sau đó 1 ml nước biển được pha loãng 1:10¹ - 10³ với nước cất khử trùng. Một trăm μ l dịch pha loãng ở các nồng độ khác nhau được trang trên đĩa thạch LBS. Sau 24 - 48 h ủ ở 30°C, nhiều dạng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa thạch. Các khuẩn lạc mọc riêng rẽ được nuôi trong 2 ml LBS ở 30°C, lắc 200 vòng/phút trong 24 h. Một trăm μ l dịch nuôi cấy pha loãng 1:10⁸ được trang trên đĩa thạch để chọn khuẩn lạc thuần khiết không nhiễm và thí nghiệm được lặp lại cho tới khi trên đĩa thạch chỉ xuất hiện một dạng khuẩn lạc duy nhất. Cuối cùng, khuẩn lạc này được nuôi lắc trong 2 ml LBS qua đêm ở 30°C và bảo quản với 75% (w/v) glycerol ở -80°C.

Định tính protease

Sau khi nuôi lắc 200 vòng/phút 24 h ở 30°C trong môi trường LBS, dịch nổi sau ly tâm loại bỏ cặn tế bào được nhỏ lên đĩa thạch chứa 0,5% cơ chất casein và 2% agar và ủ 24 h ở 37°C. Đĩa thạch được

nhuộm hoạt tính như đã được mô tả trước đây (Nguyễn Thị Thảo, Quyền Đình Thi, 2004). Vòng phân giải protein sẽ xuất hiện màu sáng hơn so với môi trường xung quanh.

Xác định hoạt tính protease

Hoạt tính protease được xác định theo phương pháp Anson cải tiến đã mô tả trước đây (Nguyễn Thị Thảo, Quyền Đình Thi, 2004). Protease xúc tác phản ứng thủy phân cơ chất casein đã bị biến tính tạo thành các sản phẩm hòa tan trong trichloroacetic acid (TCA). Phosphomolibdic acid và phosphoolframic acid trong thuốc thử Folin-Ciocalteu phản ứng với gốc tyrosine (Tyr) và tryptophan (Trp) trong phần tử protein tạo thành phức chất màu xanh da trời hấp thụ cực đại ở bước sóng 750 nm. Qua đó, khả năng phân giải polypeptide của protease có thể được xác định thông qua hàm lượng Tyr và Trp.

Một đơn vị hoạt tính được định nghĩa là lượng enzyme trong điều kiện tiêu chuẩn, sau 1 phút phân giải protein tạo thành các sản phẩm hòa tan trong TCA cho phản ứng màu với thuốc thử Folin-Ciocalteu tương ứng với 1 μ mol tyrosine.

Nhân dòng phân đoạn 16S rDNA

Để khuếch đại phân đoạn 16S rDNA, 50 μ l hỗn hợp phản ứng PCR được pha chế bao gồm 25 μ l PCR master mix; 1 μ l DNA khuôn; 1 μ l 50 μ M mỗi xuôi (9F); 1 μ l 50 μ M mỗi ngược (926R); 22 μ l H₂O vô trùng. Phản ứng được thực hiện theo chu trình: 94°C/5'; 25 chu kỳ: (94°C/1', 47°C/1', 72°C/1'); 72°C/7'.

DNA tổng số từ chủng QN6 và plasmid từ vi khuẩn *E. coli* DH5 α được tách chiết và tinh sạch theo các phương pháp cải biến (Sambrook, Russell, 2001). Plasmid DNA được gắn dính và cắt hạn chế theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Dung dịch gắn dính được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α theo phương pháp biến nạp shock nhiệt CaCl₂ đã mô tả trước đây (Quyền Đình Thi *et al.*, 2005).

Phân tích trình tự 16S rDNA

Trình tự phân đoạn chèn 16S rDNA trong plasmid tái tổ hợp được xác định theo phương pháp Sanger sử dụng máy đọc trình tự ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Mỹ). Sau đó trình tự nucleotide của đoạn 16S rDNA được so sánh với dữ liệu trong GenBank sử dụng phần mềm DNASTar để xác định tên chủng QN6.

Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng lên sinh tổng hợp protease

Động thái sinh trưởng

Chủng QN6 được nuôi lắc ở 30°C, 200 vòng/phút trong môi trường LBS và mẫu được thu ở các thời điểm khác nhau để xác định hoạt tính protease và mật độ tế bào.

Nguồn carbon, nitrogen

Để xác định nguồn carbon thích hợp, chủng QN6 được nuôi lắc 28 h ở 30°C, 200 vòng/phút trong môi trường LBS, nhưng 0,5% (w/v) cao nấm men được thay bằng một trong các nguồn carbon: tinh bột khoai tây, lactose, glucose và sucrose.

Để khảo sát một số nguồn nitrogen, chủng QN6 được nuôi lắc 28 h ở 30°C, 200 vòng/phút trong môi trường LBS và 1% (w/v) peptone được thay bằng một trong các nguồn nitrogen: casein, cao thịt, urea và NH_4NO_3 .

Nhiệt độ, pH môi trường nuôi cấy và nồng độ cơ chất cảm ứng

Chủng QN6 được nuôi lắc 28 h ở một số nhiệt độ khác nhau 28, 30, 37°C, hoặc 40°C, 200 vòng/phút trong môi trường LBS, để xác định nhiệt độ nuôi cấy tối ưu. Để khảo sát pH nuôi cấy tối ưu, chủng QN6 được nuôi lắc 28 h ở 30°C, 200 vòng/phút trong môi trường LBS với các pH khác nhau 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8 và 8,5. Để xác định nồng độ cơ chất cảm ứng thích hợp, chủng QN6 được nuôi lắc 28 h ở 30°C, 200 vòng/phút, pH 7 trong môi trường LBS có bổ sung casein với các nồng độ khác nhau 0,2; 0,5; 1; 2; 3 và 4% (w/v).

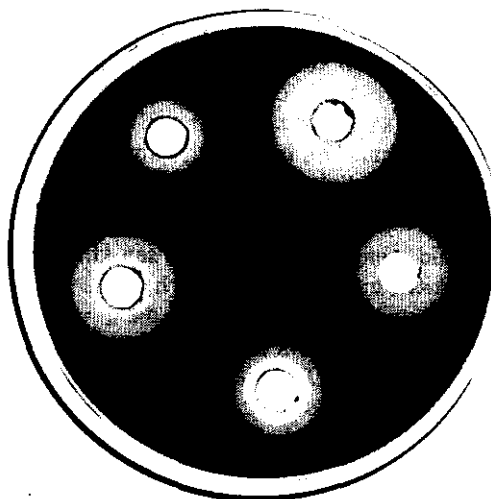
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và định tính protease

Từ các mẫu nước ở các vùng biển khác nhau, 48 chủng được phân lập trên môi trường thạch LB có bổ sung 20% (v/v) nước biển. Để khảo sát khả năng sinh tổng hợp protease, 50 μl dịch nổi của dịch nuôi cấy 48 chủng phân lập được nhỏ trên đĩa thạch chứa casein. Những chủng sinh tổng hợp protease ngoại bào sẽ xuất hiện vòng thủy phân cơ chất casein xung quanh giếng thạch chứa dịch nổi nuôi cấy sau khi nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue (Hình 1). Kết quả cho thấy có 35/48 (73%) chủng sinh tổng hợp protease ngoại bào. Trong đó, có 10/48 (21%) chủng sinh tổng

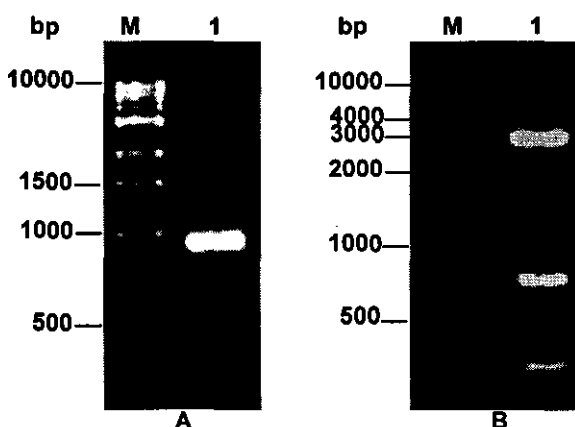
hợp protease cao (+++), 11/48 (23%) chủng ở mức trung bình (++) , 14/48 (29%) chủng có hoạt tính protease thấp (+) và 13/48 (27%) chủng không sinh tổng hợp protease ngoại bào.

Trong những chủng có hoạt tính protease cao, chủng QN6 (Hình 1) được tuyển chọn để nuôi cấy, định tên và đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố lên hoạt tính protease.



Hình 1. Hoạt tính protease của một số vi sinh vật biển QN5, QN6, QN4, FBC3 và TH1.

Phân tích trình tự 16S rDNA

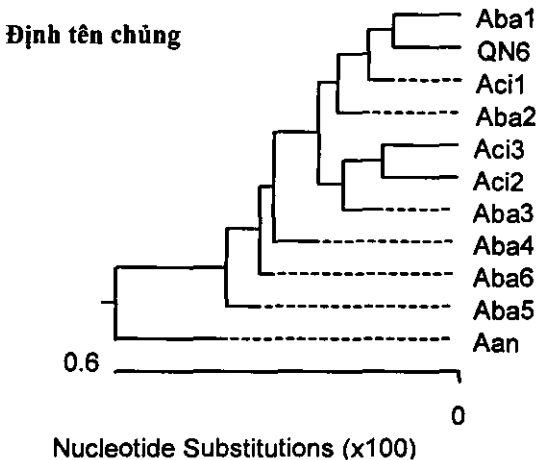


Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR với khuôn DNA tách chiết từ QN6 (1A); sản phẩm cắt kiểm tra plasmid từ khuẩn lạc bằng 2 enzyme hạn chế *EcoRI* và *HindIII* (1B); M: DNA marker 1 kb.

DNA tổng số chủng QN6 được sử dụng làm khuôn để khuếch đại phân đoạn 16S rRNA với cặp mồi 9F và 926R đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự bảo thủ ở hai đầu phân đoạn 16S rDNA vi khuẩn. Sản phẩm PCR (Hình 2A) là một băng DNA đơn, rõ nét kính thước khoảng 900 bp, phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết.

Sản phẩm PCR có đầu 3'-dA được gắn dính vào vector pTZ57R/T mở vòng có đầu 3'-dT, kích thước 2986 bp do T4-ligase xúc tác. Hỗn hợp phản ứng gắn dính được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp được nhận biết bằng phương pháp sàng lọc xanh/trắng. Sau đó, plasmid tái tổ hợp từ khuẩn lạc màu trắng được tách dựa trên nguyên tắc biến tính DNA bằng kiềm và hồi tính chọn lọc DNA plasmid sau khi trung hòa dung dịch.

Plasmid mang phân đoạn chèn sau khi tinh sạch được cắt kiểm tra bằng 2 enzyme hạn chế *Eco*RI và *Hind*III (vector pTZ57R/T chứa điểm cắt của 2 enzyme hạn chế này), và chạy trên gel agarose. Trên điện di đồ, một băng DNA kích thước khoảng 3000 bp tương đương với vector pTZ57R/T, một băng có kích thước khoảng 700 bp và một băng 200 bp xuất hiện (Hình 2B). Hai băng này tương đương với đoạn gen 16S rRNA và đoạn gen này có điểm cắt của một trong hai enzyme hạn chế trên.



Hình 3. Mối quan hệ di truyền của chủng QN6 được phân lập tại Việt Nam với các chủng đại diện GenBank qua phân tích trình tự nucleotide đoạn 16S rRNA. Aba1: *A. baumannii* AY738399; QN6: chủng đang nghiên cứu; Aci1: *Acinetobacter* Z93446; Aba2: *A. baumannii* AB109775; Aci3: *Acinetobacter* sp. J6 DQ451095; Aci2: *Acinetobacter* VHS-B3-19 DQ394933; Aba3: *A. baumannii* Ay738400; Aba4: *A. baumannii* Z93435; Aba5: *A. baumannii* X81667; Aba6: *A. baumannii* X81660; Aan: *A. anitracus* U10874.

Phân đoạn 16S rDNA của chủng QN6 trong plasmid tái tổ hợp tinh sạch được đọc trình tự theo hai chiều xuôi và ngược, từ đó suy ra trình tự phân đoạn 16S rRNA của chủng QN6. So sánh trình tự phân đoạn 16S rDNA với dữ liệu GenBank cho thấy mức độ tương đồng của chủng QN6 với các chủng thuộc chi *Acinetobacter* từ 97,0 đến 99,5%: *Acinetobacter* sp. J6 (DQ451095) 99,5%, *A. baumannii* (DQ451095) 99,5%; *Acinetobacter* sp. VHS-B3-19 (U10874) 99,1% (Hình 3). Vậy chủng QN6 thuộc chi *Acinetobacter*, trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng QN6 được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số DQ640274 và được đặt tên là *Acinetobacter* sp. QN6.

Động thái sinh trưởng

Để đánh giá tốc độ sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào, chủng QN6 được nuôi lắc 96 h ở 30°C.

Mật độ tế bào chủng QN6 tăng nhẹ trong thời gian từ 0 - 8 h (OD_{620nm} 8 h: 0,27) và gần như không sinh protease (Hình 4). Sau đó, tế bào tăng mạnh theo pha log từ 8 - 28 h, đặc trưng của pha này là số lượng tế bào tăng theo hàm log đồng thời khả năng sinh tổng hợp protease cũng tăng mạnh. Lượng tế bào tăng cực đại và đạt pha cân bằng từ 28 - 56 h, đặc trưng của pha này là số lượng tế bào gần như không tăng, không giảm. Hoạt tính enzyme cao nhất đạt được tại thời điểm 28 h (0,51 U/ml), trong khi đó mật độ tế bào cao nhất ứng với thời điểm 48 h (OD_{620nm} : 3,9). Điều này chứng tỏ hoạt tính protease chủng QN6 cao nhất ở pha cuối pha log và ổn định ở pha cân bằng. Sau 56 h nuôi cấy, số lượng tế bào giảm dần và bắt đầu đi vào pha suy vong, hoạt tính protease cũng giảm theo. Như vậy, khả năng sinh tổng hợp protease của chủng QN6 gần như song song với tốc độ sinh trưởng của tế bào.

Ảnh hưởng của nguồn carbon

Để xác định ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh trưởng và khả năng tổng hợp protease của chủng QN6, dịch tế bào được nuôi cấy trên môi trường LBS, trong đó cao nấm men được thay thế bằng một số nguồn carbon khác như tinh bột khoai tây, glucose, sucrose hoặc lactose. Mật độ tế bào cao nhất ở môi trường tinh bột khoai tây (OD_{620nm} : 3,6) song hoạt tính protease ở môi trường này không cao (0,30 U/ml), so với môi trường cao nấm men (0,51 U/ml) (Hình 5). Trên môi trường glucose và sucrose mật độ tế bào đạt ít nhất (OD_{620nm} : 1,9 và 2,3), tế bào vẫn phát triển nhưng hoạt tính protease gần như không có, chứng tỏ glucose và sucrose có thể đã ức chế sinh tổng hợp

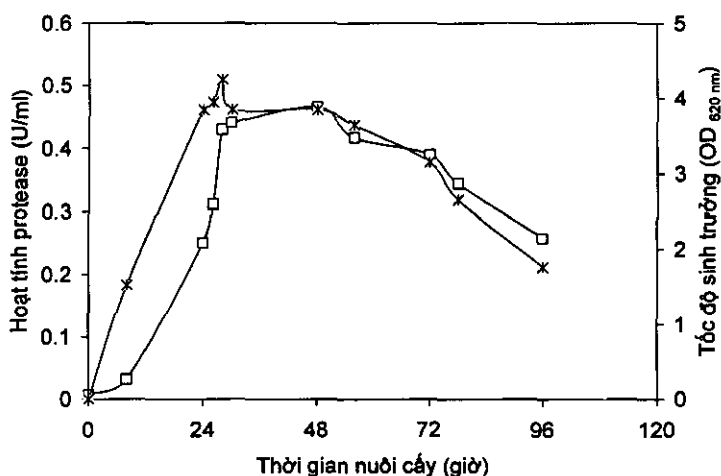
protease của chủng QN6. Ở môi trường lactose mật độ tế bào và hoạt tính gần tương đương với môi trường cao nấm men. Như vậy lactose và cao nấm men là nguồn cung cấp carbon thích hợp cho cả sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của chủng QN6.

Ảnh hưởng của nguồn nitrogen

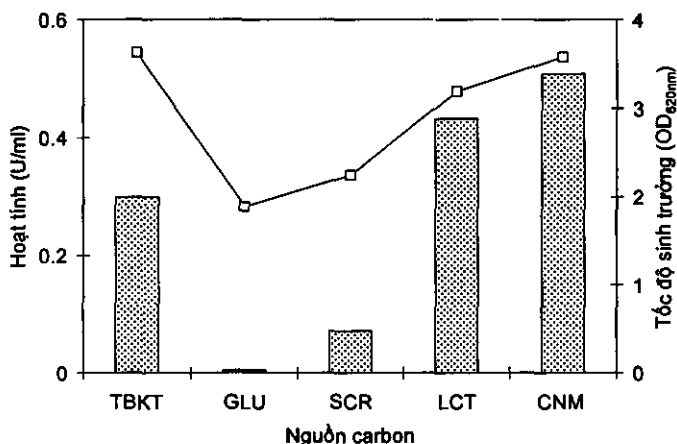
Để xác định ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp protease của chủng QN6, dịch tế bào được nuôi cấy trên môi trường LBS, trong đó peptone được thay thế bằng một số nguồn nitrogen khác như cao thịt, casein, urea và ammonium nitrate. Ở môi trường có nguồn nitrogen là peptone mật độ tế bào và hoạt tính

protease là cao nhất (Hình 6). Trong môi trường casein hoạt tính và số lượng tế bào không cao, giảm còn 40% so với peptone, đối với môi trường có nguồn nitrogen là cao thịt hoạt tính giảm còn 83% so với peptone. Nguồn nitrogen là ammonium nitrate và urea không thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp protease chủng QN6, mật độ tế bào không tăng so với tỷ lệ tiếp giống ban đầu (OD_{620nm} : 0,03) và không sinh tổng hợp protease.

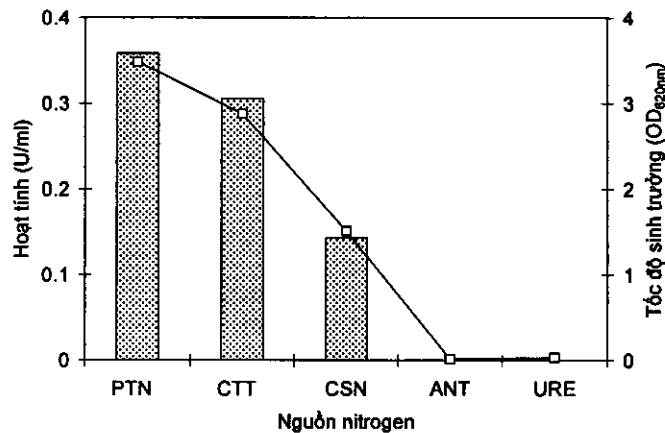
Vậy, sau khi nghiên cứu ảnh hưởng của một số nguồn nitrogen và carbon đối với chủng QN6, kết quả cho thấy môi trường LBS là thích hợp nhất đối với cả sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của chủng QN6.



Hình 4. Động thái sinh trưởng (□) và sinh tổng hợp protease (x).



Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên tốc độ sinh trưởng (□) và sinh tổng hợp protease của chủng QN6 (□). TBKT: tinh bột khoai tây; GLU: glucose; SCR: sucrose; LCT: lactate; CNM: cao nấm men.

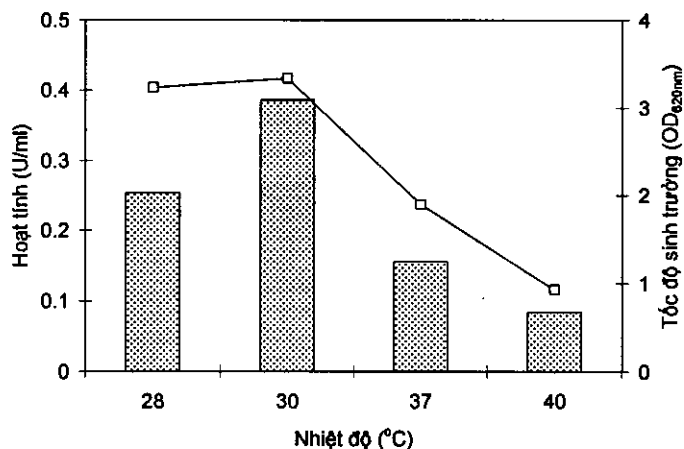


Hình 6. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên tốc độ sinh trưởng (□) và sinh tổng hợp protease của chủng QN6 (▨). PTN: peptone; CTT: cao thịt; CSN: casein; ANT: ammonium nitrate; URE: urea.

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của vi khuẩn QN6, dịch tế bào được nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau. Kết quả cho thấy, chủng phát triển tốt trong khoảng

nhiệt độ 28 - 30°C (Hình 7). Khi tăng nhiệt độ lên 37°C hoạt tính và số lượng tế bào giảm mạnh còn 56% so với ở 30°C, ở 40°C giảm còn 27%. Như vậy, giải nhiệt độ sinh trưởng của chủng QN6 hẹp, là chủng ưa ấm.



Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ (°C) nuôi cấy lên tốc độ sinh trưởng (□) và sinh tổng hợp protease của chủng QN6 (▨).

Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy ban đầu

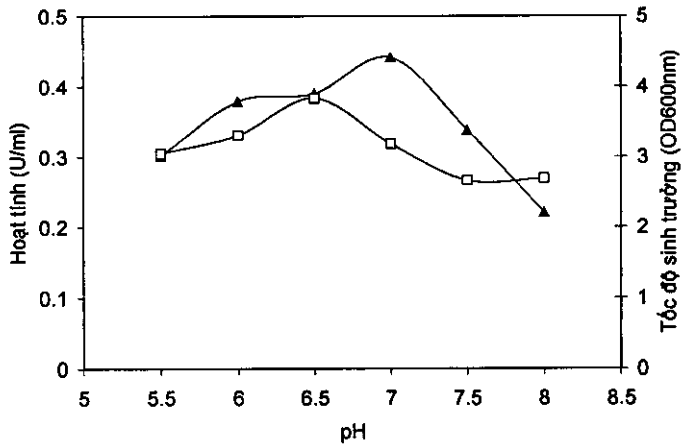
Để đánh giá ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy ban đầu lên sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của chủng QN6, dịch tế bào được nuôi cấy trên môi trường LBS ở nhiệt độ 30°C với các pH khác nhau từ 5,5 - 8.

Chủng QN6 khi nuôi trong môi trường pH 7,0 cho hoạt tính cao nhất 0,44 U/ml, nhưng mật độ tế bào cao nhất ở pH 6,5 (OD_{620 nm}: 3,8) (Hình 8). Trong khoảng pH 6 - 7 tốc độ sinh trưởng và hoạt tính protease chủng QN6 thay đổi không nhiều. Trong môi trường pH 8, hoạt tính protease giảm mạnh còn 50% so với pH tối ưu, mật độ tế bào cũng

giảm còn 85%.

Đối với pH 5,5 hoạt tính protease giảm còn 68%.
Như vậy, chủng QN6 sinh trưởng và sinh tổng hợp

protease tốt trong dải pH trung tính và hơi acid, ở môi trường kiềm chủng kém phát triển và sinh tổng hợp protease cũng giảm mạnh.



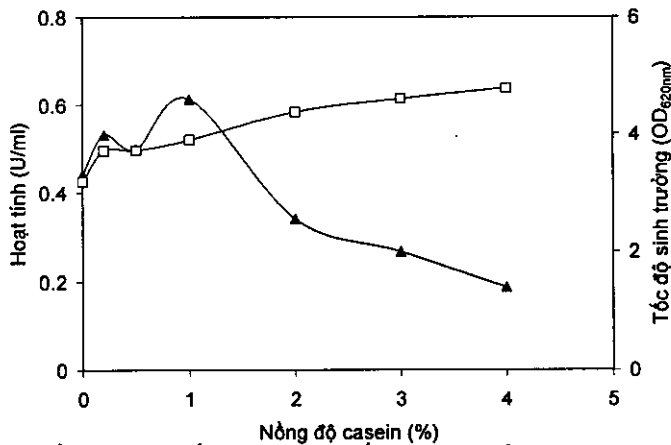
Hình 8. Ảnh hưởng của pH nuôi cấy lên sinh trưởng (□) và sinh tổng hợp protease của chủng QN6 (▲).

Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất cảm ứng

Nhiều chủng vi sinh vật chỉ sinh enzyme cảm ứng khi môi trường nuôi cấy có mặt của cơ chất cảm ứng ở nồng độ nhất định. Tuy nhiên, nếu nồng độ cơ chất cảm ứng quá cao cũng có thể ức chế sinh tổng hợp enzyme của vi sinh vật.

Để xác định nồng độ cơ chất thích hợp, chủng QN6 được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung cơ chất casein với các nồng độ từ 0,2 - 4% (w/v). Kết quả cho thấy khi bổ sung casein nồng độ từ 0,2 - 1%, hoạt tính protease tăng tuyến tính cùng với nồng độ cơ chất cảm ứng, đồng thời tốc độ sinh trưởng của tế

bào cũng tăng (Hình 9). Khả năng sinh tổng hợp protease cao nhất trong môi trường có bổ sung 1% casein, hoạt tính protease tăng 139% so với môi trường không bổ sung casein, mật độ tế bào tăng 122%. Khi tăng nồng độ cơ chất cảm ứng từ 2 - 4% mật độ tế bào vẫn tăng nhưng hoạt tính protease đã bắt đầu giảm. ở môi trường chứa 4% casein mật độ tế bào tăng lên 150% nhưng hoạt tính protease lại giảm còn 42% so với môi trường không có casein. Như vậy, bổ sung casein nồng độ 1% là thích hợp cho quá trình sinh protease cao nhất, còn với nồng độ cơ chất cao hơn nó sẽ ức chế sinh tổng hợp protease của chủng QN6.



Hình 9. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất cảm ứng lên tốc độ sinh trưởng (□) và sinh tổng hợp protease của chủng QN6 (▲).

THẢO LUẬN

Cho tới nay, rất ít công bố về protease ngoại bào chủng *Acinetobacter*. Công trình duy nhất là của Fricke et al. vào những năm 90 (Fricke et al., 1986; Fricke et al., 1987; Fricke, Aurich, 1989; Fricke, Aurich, 1992; Fricke et al., 1995) và sau đó ít ai nghiên cứu protease của chi *Acinetobacter*. Năm 1986, Fricke et al. đã công bố chủng *Acinetobacter calcoaceticus* có hoạt tính proteolytic sau khi sinh trưởng ở trong nhiều môi trường khác nhau. Hoạt tính enzyme có thể được tìm thấy ở cả tế bào chất lẫn trong thành tế bào (cũng như trong các màng nội bào chất).

Hoạt tính proteolytic cao nhất có thể được phát hiện trong quá trình chuyển từ pha sinh trưởng logarith sang pha cân bằng và trong pha cân bằng sớm, tương ứng. Trong môi trường nuôi cấy hoạt tính proteolytic chỉ có mặt ở pha cân bằng muộn. Hoạt tính này không bền và bị giải phóng bởi quá trình tự thủy phân của tế bào. Nồng độ nguồn nitrogen (NH_4^+) trong môi trường (cùng với acetate làm nguồn carbon) ảnh hưởng tới các hoạt tính proteinase của tế bào (Fricke et al., 1986). Khi nitrogen bị giới hạn, hoạt tính proteolytic tăng mạnh trong pha cân bằng. Biểu đồ pH của hoạt tính azocaseinolytic trong tế bào chất gần giống như của thành tế bào (pH tối thích nằm giữa 7 và 9). Sự ức chế từng phần của hoạt tính proteolytic trong tế bào chất cũng như trong thành tế bào có thể giành được bởi các thể ức chế serine proteinase. Các thể ức chế của thiol- và metalloproteinases không có hiệu ứng này.

Các hoạt tính protease khác nhau được tìm thấy ở phần màng của chủng *Acinetobacter calcoaceticus* nuôi trong môi trường acetate- NH_4^+ cho tới pha cân bằng sớm. Sau khi phá vỡ tế bào bằng cơ học hoặc enzyme và phân đoạn màng qua thang mật độ sucrose, hoạt tính ở màng ngoài cao hơn ở màng tế bào chất. Sử dụng azocasein và p-nitroanilide tổng hợp làm cơ chất, Fricke và đồng tác giả. (1987) tìm thấy hoạt tính protease rất thấp ở các phân đoạn khoảng giữa. Tuy nhiên, các phân đoạn này chứa một hoạt tính aminopeptidase đáng kể mà không có mặt ở các màng bao tế bào. Hoạt tính peptidolytic trong các màng khoảng giữa của các vi khuẩn gram âm chưa được nghiên cứu trước đó.

KẾT LUẬN

Từ các mẫu nước biển tại các vùng khác nhau, 35 chủng có hoạt tính protease đã được phân lập,

trong đó chủng có kí hiệu QN6 sinh tổng hợp protease cao nhất (0,633 U/ml).

Trình tự phân đoạn 16S rDNA của chủng QN6 này được xác định, định tên là *Acinetobacter* sp. QN6, được đăng ký trong GenBank với mã số DQ640274.

Một số điều kiện thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của *Acinetobacter* sp. QN6 đã được xác định: a) Môi trường LB có bổ sung 20% nước biển và 1% casein; b) Thời gian nuôi cấy 28 h, nhiệt độ 30°C, pH môi trường 7,0.

Có thể nói, đây là một trong những công trình đầu tiên nghiên cứu về hoạt tính protease ngoại bào chi *Acinetobacter*.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu cơ bản 6-098-06, "Nhân dòng, phân tích trình tự gen mã hóa subtilysin từ chủng *Bacillus* sp., biểu hiện proteinase tái tổ hợp và nghiên cứu tính chất hóa lý định hướng ứng dụng" năm 2006 - 2008.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Braudo EE, Danilenko AN, Dianova VT, Krokha NG (2001) Alternative approaches to the manufacture of plant protein products from grain legumes. *Nahrung* 45(6): 405-407.
- Fricke B, Aurich H (1989) Characterization of a periplasmic insulin-cleaving metalloproteinase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biomed Biochim Acta* 48(9): 661-671.
- Fricke B, Aurich H (1992) Purification of a periplasmic insulin-cleaving proteinase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch Microbiol* 157(5): 451-456.
- Fricke B, Betz R, Friebe S (1995) A periplasmic insulin-cleaving proteinase (ICP) from *Acinetobacter calcoaceticus* sharing properties with protease III from *Escherichia coli* and IDE from eucaryotes. *J Basic Microbiol* 35(1): 21-31.
- Fricke B, Jahreis G, Sorger H, Aurich H (1986) Cell envelope-bound proteinase activities of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biomed Biochim Acta* 45(3): 257-264.
- Fricke B, Jahreis G, Sorger H, Aurich H (1987) Proteinases in different membrane fractions of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Basic Microbiol* 27(2): 75-81.
- Ghazi S, Rooke JA, Galbraith H (2003) Improvement of

the nutritive value of soybean meal by protease and alpha-galactosidase treatment in broiler cockerels and broiler chicks. *Br Poult Sci* 44(3): 410-418.

Hoffman T (1974) Food related enzymes. *Adv Chem Ser* 136: 146-185.

Kaul P, Sathish HA, Prakash V (2002) Effect of metal ions on structure and activity of papain from *Carica papaya*. *Nahrung* 46(1): 2-6.

Kristinsson HG, Rasco BA (2000) Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40(1): 43-81.

Lê Đức Ngọc, Trịnh Thế Hùng, Võ Sỹ Hùng, Phạm Quý Hải, Vũ Anh Phương, Lê Phúc Cường (1996) Nghiên cứu protease của bí đao, khảo sát nguồn protease trong bí đao Việt Nam. *Tạp chí Hóa học* 34: 7-63.

Mohanty AK, Mukhopadhyay UK, Grover S, Batish VK (1999) Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol Adv* 17(2-3): 205-217.

Nguyễn Thị Thảo, Quyền Đình Thi (2004) Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của chủng *Serratia* sp. DT3. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(2): 205-216. Phạm Thị Trân Châu (1993) Công nghệ enzyme và ứng dụng protease trong công nghệ chế biến. *Tạp chí Thủy sản* 1: 18-20.

Phạm Thị Trân Châu, Phan Thị Hà, Nguyễn Tuyết Mai, Nguyễn Cẩm Vân, Nguyễn Lân Dũng (1991) Nghiên cứu enzyme, chất ức chế trypsin nhằm nâng cao chất lượng bột dinh dưỡng cho trẻ em. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội*: 3.

Quyền Đình Thi, Lê Thị Thu Giang, Vũ Hải Chi (2005) Biểu hiện cao lipase hoạt hóa chủng *Ralstonia* sp. M1 trong *E. coli*. In: *Báo cáo Khoa học, Hội nghị Khoa học Toàn quốc 2005. Những Vấn đề Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Sự sống*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội: 1393-1396.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 597-635.

Riffel A, Brandelli A (2002) Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29(5): 255-258.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schechler I, Berger A (1967) On the size of the active site in proteases I papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27: 157-162.

Sielecki AR, Fujinaga M, Read RJ, James MNG (1991) Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8Å resolution. *J Mol Biol* 219: 671-692.

OPTIMIZATION OF SOME CULTURE CONDITIONS FOR A MARINE BACTERIUM *ACINETOBACTER* SP. QN6 PRODUCING PROTEASE

Quyen Dinh Thi*, Tran Thi Quynh Anh, Nguyen Thi Thao

Institute of Biotechnology

SUMMARY

From seawater samples in different sea sites of Vietnam, 35 marine strains indicating protease activity were isolated. Among them, the marine strain QN6 was the best protease producer (0.633 U/ml). Nucleotide sequence of 16S rDNA of the strain QN6 showed that this strain belonged to *Acinetobacter* genus and deposited in GenBank with the accession number DQ640274 (*Acinetobacter* sp. QN6). Several culture conditions for cell growth and protease production of the strain *Acinetobacter* sp. QN6 were determined. The cell growth of the strain QN6 exhibited maximum (OD_{600 nm}: 3.9) after 48 hours of cultivation at 30°C in LB medium pH 7.0 supplemented with 20% (v/v) of seawater. The extracellular protease was produced highest after 28 hours of cultivation (0.51 U/ml). Lactose and yeast extract were the best carbon sources for both cell growth and protease production (OD_{600 nm}: 3.2 and 0.433 U/ml, and OD_{600 nm}: 3.6 and 0.509 U/ml, respectively). The best nitrogen source for cell growth and protease production was peptone, OD_{600 nm}: 3.5 and 0.359 U/ml. The optimal temperature for cell growth and

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7568260; Fax: 84-4-8363144; E-mail: quyen@ibt.ac.vn

protease production was 30°C with OD_{600 nm}: 3.3 and 0.387 U/ml. The optimal pH for cell growth was pH 6.5 while for protease production was pH 7.0 (0.441 U/ml). The addition of 4% (w/v) of casein was optimum for cell growth (OD_{600 nm}: 4.8) while 1% (w/v) of casein was the optimum for protease production (0.613 U/ml).

Keywords: *Acinetobacter* sp. QN6, cell growth, culture conditions, protease production