

## MỘT SỐ TÍNH CHẤT HÓA LÝ CỦA PROTEASE NGOẠI BÀO CHỪNG VI SINH VẬT BIỂN *ACINETOBACTER* SP. QN6

Quyền Đình Thi, Trần Thị Quỳnh Anh

Viện Công nghệ Sinh học

### TÓM TẮT

Trong công bố trước, chủng QN6 sinh tổng hợp protease cao nhất trong số các chủng vi sinh vật phân lập từ nước biển đã được chọn để tối ưu các điều kiện sinh tổng hợp protease. Trình tự phân đoạn 16S rRNA của chủng QN6 cho thấy chủng này thuộc chi *Acinetobacter*, và được đăng ký GenBank với mã số DQ640274 (*Acinetobacter* sp. QN6). Để có thể áp dụng protease trong công nghiệp, một số tính chất hóa lý của protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6 đã được xác định. Protease được tinh sạch sơ bộ bằng 90% ethanol với hiệu suất thu hồi protease đạt cao nhất (85%). Nhiệt độ và pH tối ưu của protease này trong phản ứng thủy phân 1% casein lần lượt là 50°C và 7,5. Enzyme có độ bền nhiệt và pH ở các dải nhiệt độ tương đối thấp 30 - 50°C và dải pH trung tính 6 - 7. Các ion  $K^+$ ,  $Na^+$  và  $Mg^{2+}$  kích thích nhẹ protease còn  $Ca^{2+}$  không ảnh hưởng đáng kể. Ion  $Zn^{2+}$  chỉ ức chế protease ở nồng độ cao 10 - 20 mM. Các ion kim loại khác  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  và  $Hg^{2+}$  ức chế protease ngay ở nồng độ thấp 2 mM và ức chế hoàn toàn ở nồng độ cao đối với  $Pb^{2+}$  và  $Hg^{2+}$ . Chất tạo gọng kìm EDTA kìm hãm protease hoàn toàn ở mọi nồng độ, cho thấy protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6 thuộc nhóm metalloprotease. Đây là protease ngoại bào đầu tiên được nghiên cứu tính chất hóa lý.

**Từ khóa:** *Acinetobacter* sp. QN6, chất tẩy rửa, ion kim loại, nhiệt độ tối ưu, pH tối ưu, protease, tính chất hóa lý

### MỞ ĐẦU

Protease là một nhóm enzyme thủy phân protein được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực. Trong công nghiệp thực phẩm (Phạm Thị Trân Châu *et al.*, 1991; Braudo *et al.*, 2001; Kaul *et al.*, 2002) và thức ăn gia súc (Hoffman, 1974; Ghazi *et al.*, 2003), protease được sử dụng để sản xuất phomat 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), sản xuất bia, nước mắm (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; 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.

Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã thông báo kết quả phân lập chủng vi sinh vật biển QN6 có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào (Quyền Đình Thi *et al.*, 2007). Sau khi phân tích trình tự của phân đoạn gen 16S rRNA, chủng QN6 được xếp vào chi *Acinetobacter* với mã số GenBank DQ640274. Chủng *Acinetobacter* sp. QN6 sinh tổng hợp protease tối thích sau 28 h nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung 20% nước biển, ở 30°C, pH 7,0 (Quyền Đình Thi *et al.*, 2007). Nguồn carbon và nitrogen tốt nhất trong các nguồn được khảo sát là cao nấm men và peptone. Casein kích thích sinh tổng hợp protease cao nhất với nồng độ 1% (w/v). Trong

nghiên cứu này chúng tôi đánh giá một số tính chất lý hóa cơ bản của protease này.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng vi sinh vật và nuôi cấy

Chủng QN6 được phân lập từ mẫu nước biển ở Hạ Long như đã thông báo trong nghiên cứu trước (Quyền Đình Thi *et al.*, 2007). Môi trường nuôi cấy chủng *Acinetobacter* sp. QN6 là LBS bao gồm 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) cao nấm men; 1% (w/v) peptone, 20% (v/v) nước biển, pH 7, khử trùng.

### Hóa chất

Các hóa chất dùng trong thí nghiệm được cung cấp từ các hãng hóa chất khác nhau: tryptone (Án độ); cao nấm men (Biorad, Mỹ); casein (Sigma, Mỹ). Các muối ion kim loại, tyrosine, Folin-Ciocalteu và các loại hóa chất khác đều ở dạng tinh khiết.

### Xác định hoạt tính protease

Hoạt tính protease được xác định theo phương pháp Anson cải tiến như 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). Phosphomolipidic acid và phosphowolframic acid trong thuốc thử Folin-Ciocalteu phản ứng với gốc tyrosine (Tyr) và tryptophan (Trp) trong phân 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  $\mu$ M tyrosine.

### Tinh sạch sơ bộ

Chủng QN6 được nuôi lắc ở 30°C, 200 vòng/phút trong môi trường LBS. Sau 48 h nuôi cấy, dịch tế bào được ly tâm. Dịch nổi được tủa bằng ethanol với nồng độ từ 10 - 90%. Sau khi ly tâm, tủa được hòa vào đệm phosphate pH 7. Dịch enzyme này được sử dụng để xác định một số tính chất hóa lý.

### Xác định nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt

Để xác định nhiệt độ tối thích cho protease

chủng *Acinetobacter* sp. QN6, dịch enzyme được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 - 70°C, pH 7,0 trong 5 - 10 phút để ổn định, sau đó ủ với 1% (w/v) cơ chất casein ở nhiệt độ tương ứng trong 10 phút rồi xác định hoạt tính. Để xác định độ bền nhiệt của protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6, dịch enzyme được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 - 60°C trong 1 h, sau đó được đo hoạt tính.

### Xác định pH tối ưu và độ bền pH

Để xác định pH tối thích cho protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6, các phản ứng được thực hiện ở pH 6 - 10 ở nhiệt độ 45°C (phosphate: 6,0 - 8,0; Tris-HCl: 9,0 - 10,0). Để xác định độ bền pH, dịch protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6 được ủ với đệm nồng độ 100 mM ở các pH khác nhau (acetate: 4,0 - 5,0; phosphate: 6,0 - 8,0; Tris-HCl: 9,0) ở 30°C trong 12 h, sau đó dịch enzyme được xác định hoạt tính như trên.

### Xác định ảnh hưởng ion kim loại lên hoạt tính

Để đánh giá ảnh hưởng của các ion kim loại lên hoạt tính protease của chủng *Acinetobacter* sp. QN6, dịch enzyme được ủ cùng với muối của các ion kim loại:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  và EDTA ở 30°C trong 3 h với các nồng độ khác nhau 2 - 20 mM, sau đó hoạt tính còn lại của enzyme được xác định.

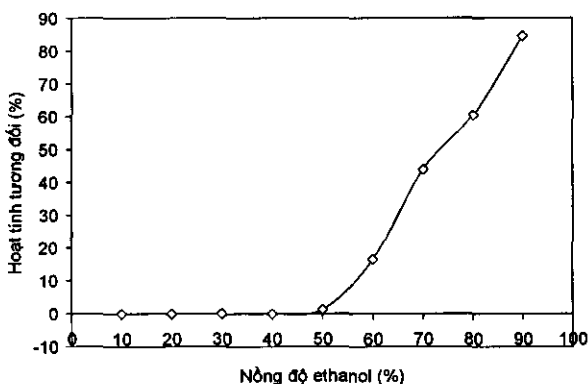
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tinh sạch sơ bộ protease

Tinh sạch enzyme là một quá trình bao gồm nhiều công đoạn, rất phức tạp, có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau như sắc ký, điện di, tủa bằng muối, ethanol hoặc acetone. Trong đề tài này, chủng *Acinetobacter* sp. QN6 được nuôi cấy, ly tâm loại cặn tế bào, thu dịch nổi và tủa bằng ethanol ở các nồng độ khác nhau từ 10 - 90% (v/v). Sau đó hòa tan tủa trong đệm phosphate pH 7 và xác định hoạt tính.

Sử dụng ethanol với nồng độ từ 10% đến 50% (v/v) không tủa được protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6 (Hình 1). Với dãy nồng độ 10 - 50% (v/v), hoạt tính thu hồi của protease đạt rất thấp, không quá 1%. Khi nồng độ ethanol tăng lên từ 60 - 90% (v/v) thì hoạt tính còn lại của tủa protease tăng tuyến tính với nồng độ. Ở nồng độ 90% (v/v) ethanol, hiệu suất thu hồi protease ngoại bào chủng *Acinetobacter* sp.

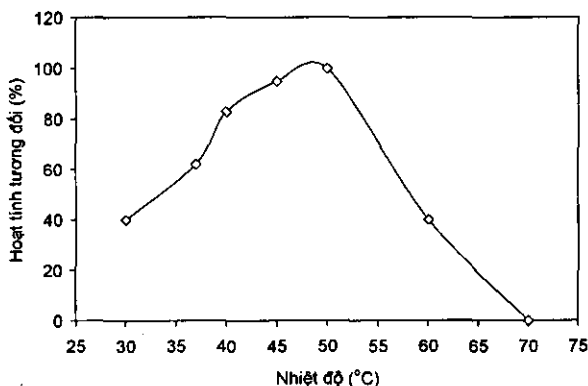
QN6 đạt cao nhất 85%. Tủa này được sử dụng để xác định các tính chất hóa lý.



Hình 1. Hoạt tính còn lại của protease sau khi tủa bằng ethanol ở các nồng độ khác nhau.

### Nhiệt độ tối ưu

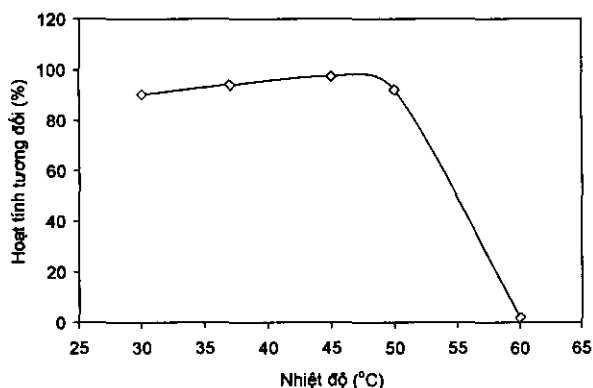
Để xác định protease từ *Acinetobacter* sp. QN6 hoạt động tốt nhất ở nhiệt độ nào, dịch enzyme được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 - 70°C trong 5 - 10 phút để ổn định, sau đó ủ với cơ chất casein ở nhiệt độ tương ứng trong 10 phút rồi xác định hoạt tính. Kết quả cho thấy khi tăng nhiệt độ phản ứng từ 30 - 50°C hoạt tính protease tăng tuyến tính với nhiệt độ, và đạt tối ưu ở 50°C (0,63 U/ml) (Hình 2). Ở 45°C hoạt tính cũng đạt rất cao, 90% so với hoạt tính ở nhiệt độ 50°C. Khi nhiệt độ tăng lên 60°C hoạt tính protease chủng QN6 giảm mạnh xuống còn 40% so với hoạt tính protease ở nhiệt độ tối ưu. Ở 70°C, protease hoàn toàn bị biến tính. Protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6 hoạt động tối ưu trong khoảng nhiệt độ khá cao 45 - 50°C, thích hợp cho nhiều ứng dụng trong công nghiệp.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt tính protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6.

### Độ bền nhiệt

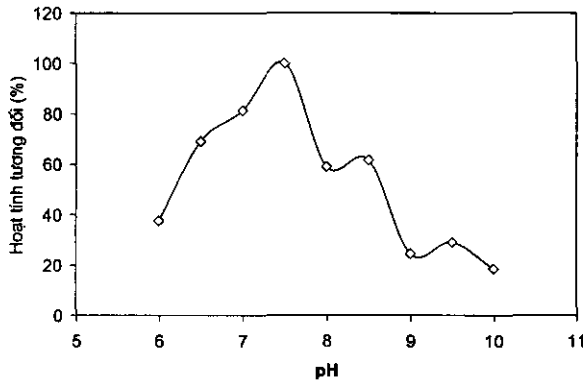
Tính bền nhiệt rất quan trọng cho việc ứng dụng enzyme trong công nghiệp. Để nghiên cứu tính bền nhiệt của protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6, dịch enzyme được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 - 60°C trong 1 h, sau đó được đo hoạt tính. Protease có độ bền nhiệt cao ở dải nhiệt độ 30 - 50°C (Hình 3). Sau 1 h ủ ở nhiệt độ từ 30 - 50°C, hoạt tính protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6 khá ổn định, hầu như không giảm đáng kể so với hoạt tính protease của dịch enzyme ban đầu được bảo quản lạnh (0,66 U/ml) (Hình 3). Khi ủ dịch enzyme ở 60°C trong 1 h, protease gần như bị biến tính hoàn toàn, hoạt tính protease giảm mạnh chỉ còn 2% so với hoạt tính enzyme được bảo quản lạnh. Như vậy protease của chủng *Acinetobacter* sp. QN6 khá bền trong khoảng nhiệt độ từ 30 đến 50°C. Enzyme này có thể thích hợp cho những ứng dụng của nó trong công nghiệp.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên độ bền của protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6.

### pH tối ưu

Mỗi enzyme hoạt động tối ưu ở một dải pH nhất định, để khảo sát pH môi trường phản ứng tối ưu, hỗn hợp phản ứng enzyme - cơ chất được thực hiện ở các pH khác nhau từ 6 - 10. Khi tăng dần pH từ 6 lên 7,5 hoạt tính protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6 tăng rất mạnh và tuyến tính cùng với pH môi trường phản ứng từ 38% lên cực đại 100% ở pH 7,5 (0,58 U/ml) (Hình 4). Sau đỉnh pH tối thích, hoạt tính protease lại giảm mạnh, ở pH 9 hoạt tính chỉ còn 25% so với hoạt tính protease ở pH tối thích. Hoạt tính protease tiếp tục giảm khi pH tăng và đến pH 10 chỉ còn 19%. Protease ngoại bào chủng *Acinetobacter* sp. QN6 hoạt động tốt nhất ở dải pH trung tính 7 - 7,5 (Hình 4).



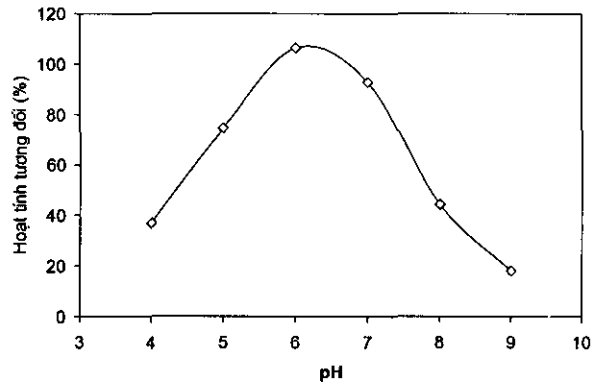
Hình 4. Ảnh hưởng của pH phản ứng tới hoạt tính protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6.

#### Độ bền pH

pH môi trường phản ứng là một yếu tố ảnh hưởng lớn tới độ bền của enzyme. Để tìm được khoảng pH thích hợp cho việc bảo quản protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6, dịch enzyme được ủ với đệm nồng độ 100 mM ở các pH khác nhau (acetate: 4,0 - 5,0; phosphate: 6,0 - 8,0; Tris-HCl: 9,0) ở 30°C trong 12 h, sau đó dịch ủ được xác định hoạt tính.

Khi ủ protease ở pH 4 - 5, hoạt tính protease giảm mạnh. Ở pH 4 hoạt tính protease còn lại chỉ đạt 36%, và ở pH 5 đạt 75% (Hình 5) so với hoạt tính protease của dịch không ủ. Ở pH 6 - 7 hoạt tính protease khá ổn định không thay đổi đáng kể so với hoạt tính protease của dịch enzyme không ủ với đệm

(106 - 93%). Ở pH 8 - 9 hoạt tính protease giảm mạnh xuống còn 18 - 44% so với hoạt tính protease ban đầu. Protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6 có độ bền cao trong môi trường pH trung tính và acid yếu, không bền trong môi trường quá acid và kiềm.



Hình 5. Ảnh hưởng của pH lên độ bền của protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6.

#### Ảnh hưởng của ion kim loại

Ion kim loại cũng là một yếu tố ảnh hưởng lớn tới hoạt tính của enzyme, nó có thể đóng vai trò là các chất kim hãm làm giảm hoạt tính của enzyme, làm enzyme bị biến tính. Ngược lại, ion kim loại cũng có thể kích hoạt, làm tăng hoạt tính xúc tác của enzyme. Tuy nhiên, tác dụng kích hoạt chỉ giới hạn ở nồng độ nhất định, vượt quá giới hạn này có thể làm giảm hoạt tính của enzyme.

Bảng 1. Ảnh hưởng của ion kim loại lên hoạt tính của protease.

| Ion kim loại     | Hoạt tính protease còn lại (%) ở nồng độ kim loại |      |       |       |
|------------------|---------------------------------------------------|------|-------|-------|
|                  | 2 mM                                              | 4 mM | 10 mM | 20 mM |
| K <sup>+</sup>   | 93                                                | 120  | 110   | 122   |
| Na <sup>+</sup>  | 106                                               | 113  | 98    | 99    |
| Mg <sup>2+</sup> | 100                                               | 113  | 115   | 97    |
| Ca <sup>2+</sup> | 97                                                | 98   | 92    | 95    |
| Zn <sup>2+</sup> | 97                                                | 98   | 74    | 75    |
| Cu <sup>2+</sup> | 83                                                | 70   | 50    | 24    |
| Co <sup>2+</sup> | 54                                                | 47   | 36    | 30    |
| Pb <sup>2+</sup> | 45                                                | 11   | 2     | 0     |
| Hg <sup>2+</sup> | 17                                                | 2    | 0     | 0     |
| EDTA             | 0                                                 | 0    | 0     | 0     |

Để đánh giá ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt tính protease của chủng *Acinetobacter* sp. QN6, dịch enzyme được ủ cùng với muối của các ion kim loại:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  và EDTA ở 30°C trong 3 h với các nồng độ khác nhau 2 - 20 mM, sau đó hoạt tính còn lại của enzyme được xác định. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Các ion  $K^+$ ,  $Na^+$  và  $Mg^{2+}$  kích thích protease và làm tăng nhẹ hoạt tính protease, lên tới 22% đối với  $K^+$ . Còn  $Ca^{2+}$  không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính protease của chủng *Acinetobacter* sp. QN6. (Bảng 1). Ion  $Zn^{2+}$  không ảnh hưởng tới hoạt tính enzyme ở nồng độ 2 - 4 mM, khi tăng nồng độ lên 10 - 20 mM hoạt tính protease của chủng QN6 giảm xuống còn 74% so với dịch enzyme không ủ với ion kim loại.

Khi tăng dần nồng độ ion  $Cu^{2+}$  từ 2 - 20 mM hoạt tính enzyme cũng giảm dần, ở 20 mM hoạt tính giảm xuống còn 24%. Các ion  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  kìm hãm hoạt tính protease ngay ở nồng độ thấp 2 mM, khi tăng nồng độ lên 20 mM làm mất hoàn toàn hoạt tính protease đối với  $Pb^{2+}$  và  $Hg^{2+}$ .

EDTA, chất kim kìm đặc trưng của các metalloprotease, ức chế hoàn toàn protease ngay ở nồng độ thấp 2 mM. Như vậy, có thể khẳng định protease của chủng QN6 thuộc nhóm metalloprotease. Thực tế này đã khẳng định lại những nghiên cứu về protease từ *Acinetobacter* chủ yếu là metalloprotease bị kìm hãm bởi EDTA (Fricke, Aurich, 1989; 1992).

## THẢO LUẬN

Cho tới nay, rất ít công bố về protease ngoại bào của chủng *Acinetobacter*. Năm 1986, (Fricke *et al.*, 1986) đã công bố chủng *Acinetobacter* có hoạt tính proteolytic sau khi nuôi cấy ở 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).

Đến năm 1989, (Fricke, Aurich, 1989) đã tìm thấy một proteinase hòa tan có thể phân hủy insulin trong chất bao cũng như trong tế bào chất ở *Acinetobacter calcoaceticus*, một chủng vi khuẩn Gram âm. Các enzyme tế bào chất và chất bao có cùng kiểu ức chế, pH tối thích và khối lượng phân tử. Enzyme phân hủy insulin của chủng *A. calcoaceticus* giống như các proteinase tương ứng ở *Escherichia coli*. Đây là một metalloproteinase với pH tối thích trong khoảng trung tính và có thể được tái hoạt hóa bằng các ion hóa trị hai sau khi bị ức chế EDTA,

nhưng không hoàn toàn trùng khớp với mọi proteinase đã mô tả của *E. coli* trong kiểu ức chế.

Metalloproteinase chất bao chính của tế bào chủng *A. calcoaceticus* có các tính chất tương tự như metalloproteinase chất bao của *E. coli*. Proteinase chất bao của *A. calcoaceticus* được tinh sạch từ chất bao bằng tủa ammonium sulfate, sắc ký tương tác kỵ nước và sắc ký tiêu điểm thành dạng đồng nhất của enzyme trên điện di SDS với một hiệu suất thu hồi 6,7% và hệ số tinh sạch 417 (Fricke, Aurich, 1992). Enzyme có khối lượng phân tử 108 kDa (lọc gel) hoặc 112 kDa (điện di nguyên bản), và bao gồm bốn tiểu đơn vị giống nhau với khối lượng phân tử 27 kDa (điện di SDS). Enzyme tinh sạch ưa phân hủy polypeptide như glucagon và insulin. Các protein lớn cũng được chấp nhận làm cơ chất nhưng với mức độ thấp hơn đáng kể. Tất cả các cơ chất tổng hợp với tính đặc hiệu trypsin, chymotrypsin, elastase và thermolysin đều không bị cắt. Bởi vậy enzyme mô tả được gọi là enzyme cắt insulin ICP "insulin-cleaving proteinase".

Còn alanine aminopeptidase (AAP) từ *A. calcoaceticus* là một cysteine protease phụ thuộc ion kim loại gắn vào màng tế bào (Jahreis, Aurich, 1991). Amino acid chloromethyl ketone là những chất ức chế đặc hiệu cao của enzyme. AAP bị ức chế ở pH 7,5 (pH tối thích) bởi sự ức chế dạng hỗn hợp. Một dạng ức chế cạnh tranh tạo ra nếu giá trị pH giảm xuống 6,2. Ngược lại, sự ức chế của AAP bởi chloromethyl ketone dẫn xuất từ các cơ chất là dạng không thuận nghịch ở pH 8,25.

Như vậy, có thể nói protease ngoại bào của chủng *Acinetobacter* sp. QN6 là protease ngoại bào đầu tiên thuộc chi *Acinetobacter* được nghiên cứu tính chất hóa lý. Có thể tiếp tục tinh sạch enzyme, nhân dòng, phân tích trình tự, biểu hiện gene mã hóa protease này ở *E. coli* hoặc *P. pastoris* trong các nghiên cứu tiếp theo.

## KẾT LUẬN

Protease được tinh sạch sơ bộ bằng 90% ethanol và hiệu suất thu hồi đạt cao nhất (85%).

Nhiệt độ tối thích là 50°C và enzyme bền ở 30 - 50°C.

pH tối thích là 7,5 và enzyme bền ở pH 6 - 7.

$K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  đều kích thích nhẹ protease.  $Ca^{2+}$  không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính enzyme.

Zn<sup>2+</sup> chỉ ức chế protease ở nồng độ cao 10 - 20 mM. Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> và Hg<sup>2+</sup> ức chế protease ngay ở nồng độ thấp 2 mM, trong đó Pb<sup>2+</sup> và Hg<sup>2+</sup> ức chế protease hoàn toàn ở nồng độ cao.

Chất tạo gong kim EDTA kim hãm hoàn toàn protease ở nồng độ thấp, cho thấy protease chủng *Acinetobacter* sp. QN6 thuộc nhóm metalloprotease.

Đây là protease ngoại bào chủng *Acinetobacter* đầu tiên được xác định tính chất hóa lý.

**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 subtilisin từ chủng *Bacillus* sp., biểu hiện proteinase tái tổ hợp và nghiên cứu tính chất hóa lý định hướng ứng dụng" năm 2006 - 2007.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Brando 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, Jahreis G, Sorger H, Aurich H (1986) Cell envelope-bound proteinase activities of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biomed Biochim Acta* 45(3): 257-264.

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.

Jahreis G, Aurich H (1991) Membrane-bound alanine aminopeptidase from *Acinetobacter calcoaceticus*. 4. Amino acid chloromethyl ketones as pH-dependent, substrate-derived inhibitors of cysteine protease. *Biomed Biochim Acta* 50(9): 1043-1049.

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, Phan Thị Hà, Nguyễn Tuyết Mai, Nguyễn Cẩm Vân, Nguyễn Lâm 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.

Phạm Thị Trân Châu (1993) Công nghệ enzyme và ứng dụng protease trong công nghệ chế biến. *Tạp chí Thủy sản* 1: 18-20.

Quyền Đình Thi, Trần Thị Quỳnh Anh, Nguyễn Thị Thảo (2007) Tối ưu một số điều kiện nuôi cấy chủng vi sinh vật biến *Acinetobacter* sp. QN6 sinh tổng hợp protease. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(2): 187-196.

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.

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 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 219: 671-692.

## SOME PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF AN EXTRACELLULAR PROTEASE FROM A MARINE BACTERIAL STRAIN *ACINETOBACTER* SP. QN6

Quyen Dinh Thi\*, Tran Thi Quynh Anh

*Institute of Biotechnology*

### SUMMARY

In a previous study, a microbial strain QN6 showing highest protease production among bacterial strains isolated from marine samples was chosen for optimization of some culture conditions. The partial sequence of 16S rRNA indicated that the strain belonged to the genus *Acinetobacter*, and was deposited in GenBank with an accession number DQ640274 (*Acinetobacter* sp. QN6). To be applicable in the industry, some most important physicochemical properties of the extracellular protease from the strain *Acinetobacter* sp. QN6 were determined. The protease was purified preliminarily by using 90% ethanol with a recovery yield of 85%. Optimal temperature and pH of this protease in the hydrolysis reaction of 1% (w/v) casein as the substrate was 50°C and 7.5, respectively. The enzyme had thermostability and pH stability in a relative low range of 30 - 50°C and neutral pH range 6 - 7. Metal ions  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Mg^{2+}$  slightly stimulated the protease activity. Ion  $Ca^{2+}$  showed no considerable effect on protease activity.  $Zn^{2+}$  inhibited the protease only at the high concentration of 20 mM. Other metal ions including  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Hg^{2+}$  inhibited activity of the enzyme even at the low concentration of 2 mM.  $Pb^{2+}$  and  $Hg^{2+}$  inhibited completely at high concentrations. The chelator EDTA inhibited completely the protease at the low concentration, it indicated that the extracellular protease of the strain *Acinetobacter* sp. QN6 belonged to metalloprotease. This protease was the first extracellular protease from *Acinetobacter* genus, which has been ever reported.

**Keywords:** *Acinetobacter* sp. QN6, detergents, metal ions, optimal pH, physicochemical properties, protease, solvents, optimal temperature

---

\*Author for correspondence: Tel. 84-4-7568260; Fax: 84-4-8363144; E-mail: [quyen@ibt.ac.vn](mailto:quyen@ibt.ac.vn)