

NGHIÊN CỨU, LỰA CHỌN ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY VÀ LÊN MEN CHŨNG VI KHUẨN *PSEUDOMONAS PUTIDA* ĐỂ THU NHẬN ENZYME URICASE

Phạm Thanh Hà*, Trần Đình Mẫn, Trần Thị Hoa

Viện Công nghệ sinh học, Viện HLKHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: ptha04@yahoo.com

Đến Tòa soạn: 20/3/2012; Chấp nhận đăng: 30/11/2013

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này những điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp uricase của chủng *Pseudomonas putida* CN3 đã được đánh giá. Kết quả chỉ ra rằng nhiệt độ 30 °C, pH môi trường ban đầu 8, tốc độ lắc 250 vòng/phút, thời gian nuôi cấy 48 giờ là cần thiết cho chủng CN3 sinh uricase tối đa. Axit uric 0,5 % là cơ chất cảm ứng tốt nhất, glucose 0,5 % và cao nấm men 0,3 % là nguồn cacbon và nitơ tốt nhất cho sản sinh uricase từ *P. putida* CN3. Chủng *P. putida* CN3 lên men trong điều kiện nuôi cấy tối ưu trên thiết bị lên men 5 L sản sinh uricase có hoạt độ tổng 1,21 U/ml, hoạt độ riêng 1,33 U/mg trong thời gian ngắn chỉ 30 giờ, vì vậy chủng này có tiềm năng ứng dụng cao.

Từ khoá: điều kiện nuôi cấy, lên men, *Pseudomonas putida*, uricase.

1. MỞ ĐẦU

Uricase là một enzyme oxy hoá được ứng dụng chủ yếu cho hóa sinh lâm sàng như một chỉ thị chẩn đoán để xác định hàm lượng axit uric trong máu và nước tiểu. Ngoài ra nó còn được dùng như thuốc để ngăn ngừa và điều trị bệnh gout, hội chứng li giải khối u và một số bệnh rối loạn tăng cao axit uric máu. Uricase có khả năng làm giảm 50 % axit uric máu ở người trong vòng chưa đến 24 giờ và bảo vệ tốt hơn cho thận chống lại sỏi thận so với những thuốc khác như allopurinol. Trước đây uricase được sản xuất từ nội tạng của động vật có vú. Tuy nhiên do sự phức tạp trong quá trình chiết rút và tinh sạch uricase từ động thực vật đã thúc đẩy sự phát triển những nghiên cứu và sản xuất uricase từ các vi sinh vật (VSV) như vi khuẩn (VK), nấm men, nấm mốc.

Ở những VSV khác nhau, tổng hợp uricase được điều hòa bởi thành phần của môi trường sinh trưởng, khả năng phân hủy axit uric, cũng như việc sử dụng axit uric cho sinh trưởng và làm chất cảm ứng. Sự tạo thành uricase được điều khiển bởi cơ chế kiểm soát từ cả hai nguồn nitơ và cacbon. Ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ lên sự tạo thành uricase VSV đã được nghiên cứu bởi một số tác giả [1, 2, 3]. Yazdi, Lotfy đã nghiên cứu xác định nhiệt độ và pH tối ưu cho sản sinh uricase ở VSV [2, 3].

Pseudomonas putida CN3 là chủng VK có khả năng sản sinh mức độ cao enzyme uricase ngoại bào trong thời gian ngắn nên đã được tuyển chọn. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành tìm điều kiện nuôi cấy tối ưu cho *P. putida* CN3 sản sinh uricase tối đa.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vi sinh vật và môi trường nuôi cấy

Chủng VK *P. putida* CN3 có hoạt tính sinh tổng hợp enzyme uricase cao được phân lập từ đất.

Môi trường nuôi cấy chứa (g/L): pepton 5, glucose 10, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5; NaCl 0,5; axit uric 5; pH 7 [1].

Nuôi cấy tìm điều kiện tối ưu: 1 % giống VK từ nuôi cấy dịch thể 24 giờ được chuyển sang bình tam giác 500 ml chứa 100 ml môi trường. Nuôi lắc 200 rpm/ 30°C/ 48 giờ. Sau thời gian nuôi cấy đo hoạt độ uricase ngoại bào.

2.2. Đánh giá sinh trưởng của VK bằng phương pháp pha loãng xác định mật độ tế bào VK trong dịch nuôi trên môi trường thạch đĩa.

2.3. Xác định hoạt tính enzyme

Sau khi nuôi cấy kết thúc, li tâm (12 000 vòng/ 15 phút/ 4 °C) loại xác tế bào thu enzyme ngoại bào. Phân tích hoạt tính enzyme bằng kit (Invitrogen, Mỹ): Hút 50 µl dung dịch uricase chuẩn ở các độ pha loãng khác nhau (0 - 100 mU/ml), đối chứng (đệm 1X) và mẫu nhỏ vào từng giếng của đĩa ELISA 96 giếng. Bắt đầu phản ứng bằng bổ sung 50 µl dung dịch chứa chỉ thị màu Amplex Red/ dung dịch HRP (Horse radish peroxidase)/ 5 mM axit uric và đệm phản ứng 1X vào mỗi giếng chứa mẫu và đối chứng. Đĩa được ủ trong 30 phút ở 37 °C, tránh ánh sáng. Đo độ hấp phụ tối ưu trên máy đọc đĩa ELISA (BioTek, Mỹ) ở bước sóng 560 nm. Tính toán nồng độ uricase trong mẫu dựa trên đường chuẩn uricase.

2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy khác nhau lên sinh trưởng và sinh tổng hợp uricase

Khi nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy, các yếu tố cần khảo sát được thay đổi, các yếu tố còn lại vẫn giữ nguyên.

2.4.1. Ảnh hưởng của các nguồn dinh dưỡng

Cơ chất cảm ứng: axit uric, allantoin, xanthine và hypoxanthine (ở những nồng độ khác nhau 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 %).

Nguồn cacbon (1 %): glucose, sucrose, fructose, lactose, xylose hoặc glycerol. Nguồn cacbon được chọn nghiên cứu ở các nồng độ: 1; 3; 5; 7; 10 g/L.

Nguồn nitơ (0,5 %): pepton, tryptone, nước chiết ngô, cao men, acetate amôn, NH_4NO_3 hoặc KNO_3 . Nguồn nitơ được chọn nghiên cứu ở các nồng độ 1, 2, 3, 4, 5 g/L.

2.4.2. Ảnh hưởng của các chế độ nuôi cấy

Nhiệt độ nuôi: 20, 25, 30, 35 và 40 °C.

pH môi trường ban đầu: 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9 (Chỉnh độ pH môi trường bằng HCl 0,1 N và NaOH 1 N trước và sau khi khử trùng).

Tốc độ lắc: 50, 100, 150, 200, 250 vòng/phút.

Các mẫu thí nghiệm đều được phân tích sau 48 giờ nuôi cấy so với đối chứng không cấy VK có nguồn dinh dưỡng và chế độ nuôi tương ứng. (Thí nghiệm lặp lại 3 lần).

2.4.3. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung chất cảm ứng vào môi trường nuôi cấy

Chủng nghiên cứu sinh trưởng trên môi trường có nguồn dinh dưỡng tối ưu được điều chỉnh pH tối ưu, nuôi ở nhiệt độ và tốc độ lắc tối ưu. Ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau (0, 6, 12, 18, 24, 30 giờ) bổ sung cơ chất cảm ứng vào môi trường. Dịch chiết enzyme ngoại bào được đo ở cuối giai đoạn nuôi cấy (48 giờ).

2.5. Xác định hàm lượng protein

Chuẩn bị dung dịch A: 4 g NaOH và 20 g Na₂CO₃/ 1L nước khử iôn. Dung dịch B: 0,5 g CuSO₄.5H₂O và 0,5 g dung dịch Citrat Natri /100 mL nước khử iôn. Dung dịch C: 49A/ 1B. Lấy 0,5 mL dịch chứa protein cho vào ống nghiệm, thêm 2 mL dung dịch C, lắc đều để yên trong 10 phút. Thêm 0,25 mL thuốc thử Folin đã pha loãng 2 X, lắc đều và để yên trong 30 phút, màu vàng của hỗn hợp chuyển sang màu xanh da trời và đạt đến cường độ màu cực đại. Tiến hành so màu trên máy đo quang phổ ở 660 nm. Hàm lượng protein trong mẫu được xác định dựa trên đường chuẩn bovine serum albumin (BSA).[4]

2.6. Nghiên cứu động học sinh trưởng và sinh uricase trên thiết bị lên men 5L

Từ một khuẩn lạc của giống thuần khiết nhân giống trên thạch nghiêng. Nuôi cấy tiền lên men được tiếp giống từ nuôi cấy thạch nghiêng. Nhân giống cấp II trong bình tam giác 500 ml chứa 125 mL môi trường, nuôi ở 30 °C/ 250 rpm/16 giờ. Nuôi cấy lên men được tiếp 5 % giống từ bình nuôi cấy cấp II. Quá trình lên men được thực hiện trong bình lên men 5 L chứa 1,5 L môi trường với nguồn cacbon là glucose 5 g/L, nguồn nitơ là cao men 3 g/L, axit uric 5 g/L, nhiệt độ được duy trì ở 30 °C, tốc độ khuấy 250 rpm, dòng thổi khí 1,0 vvm, pH được điều khiển tự động 8,0 ± 0,1.

Theo dõi động thái sinh trưởng của VK, xác định hoạt tính uricase ngoại bào, đo hàm lượng protein tổng trong dịch nuôi đã loại xác tế bào ở các thời điểm 0, 6, 12, 24, 30, 36, 42, 48 giờ lên men.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

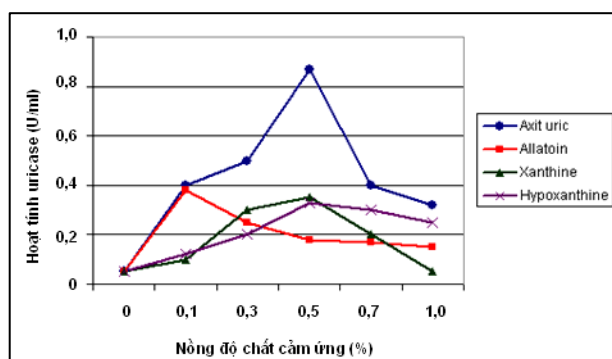
3.1. Ảnh hưởng của cơ chất cảm ứng lên sinh tổng hợp uricase ngoại bào của chủng *P. putida* CN3

Uricase là enzyme cảm ứng và sự có mặt của một số chất cảm ứng khác nhau trong môi trường như axit uric, adenine, guanine, xanthine, hypoxanthine, 6,8-dihydroxypurine ... là cần thiết cho sự tạo thành enzyme [5, 6]. Yukiko & cs. chứng minh rằng việc bổ sung axit uric,

xanthine, guanine, adenine và hypoxanthine là hiệu quả cho cảm ứng uricase ở *Candida tropicalis* [7].

Những nồng độ chất cảm ứng uricase khác nhau (0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0 %) của axit uric, allantoin, xanthine và hypoxanthine được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chủng *P. putida* CN3. Kết quả thu được cho thấy với các chất cảm ứng được sử dụng, hàm lượng enzyme cảm ứng ngoại bào tăng cùng với sự tăng nồng độ lên tới điểm tối ưu, sau đó giảm (hình 1). So sánh các cơ chất cảm ứng khác nhau nhận thấy axit uric là chất cảm ứng tốt nhất cho sinh uricase ngoại bào từ *P. putida* CN3. Hàm lượng uricase từ *P. putida* CN3 cao nhất thu được khi dùng 5 g/L axit uric.

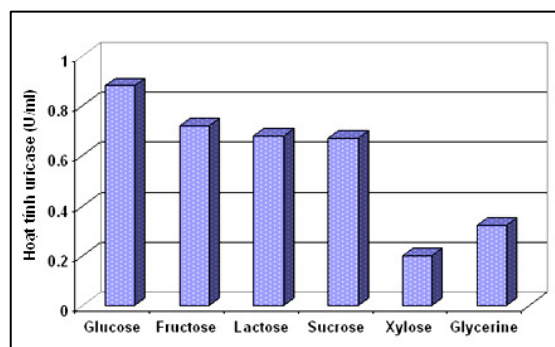
Bongaerts và cs. Phát hiện hàm lượng cao uricase trong dịch chiết thô của tế bào VK sinh trưởng trên môi trường chứa axit uric [5]. Yukiko & cs. quan sát thấy sự tăng hoạt tính uricase ở *Alcaligenes eutrophus* (*Hydrogenomonas* H16), *P. aeruginosa* và *Micrococcus denitrificans* sau khi được chuyển vào môi trường chứa axit uric. Uricase của *Bacillus fastidious* và *Aspergillus nidulans* cũng được tổng hợp cảm ứng bởi axit uric. Các nghiên cứu khác cũng chứng minh axit uric là chất cảm ứng tốt nhất cho VSV thể hiện hoạt tính sinh enzyme uricase [1, 5, 7, 8].



Hình 1. Ảnh hưởng của những nồng độ chất cảm ứng khác nhau lên hoạt tính sinh tổng hợp uricase ngoại bào của chủng CN3.

3.2. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng lên sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme

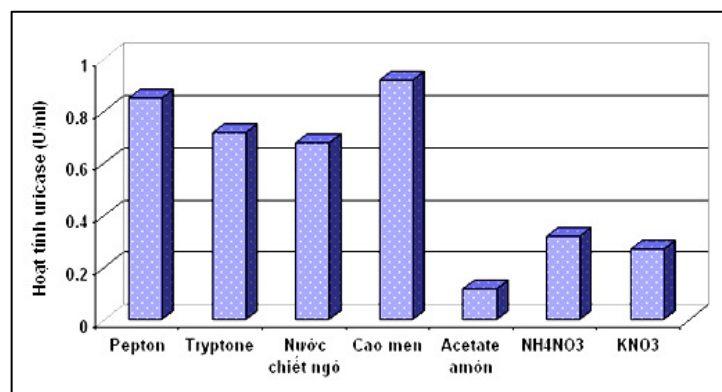
3.2.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ lên sinh tổng hợp enzyme



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon lên tổng hợp enzyme uricase của *P. putida* CN3.

Ảnh hưởng của 1 % những nguồn cacbon khác nhau lên sinh tổng hợp uricase ngoại bào của chủng CN3 đã được nghiên cứu và kết quả được trình bày ở hình 2. Kết quả chỉ ra hoạt tính enzyme uricase đạt cao nhất (0,88 U/mL) trong môi trường chứa glucose, sau đó đến fructose, lactose và sucrose. Trong khi xylose và glycerol là những nguồn cacbon không thích hợp. Abd & Abo; Atalla & cs. lại phát hiện sucrose là nguồn cacbon tốt nhất cho *P. aeruginosa* và *A. flavus* sản sinh uricase [8, 9]. Lotfy tìm thấy rỉ đường là nguồn cacbon thích hợp cho sinh uricase ở *B. thermocatenulatus* [2]. Priyabrata khi khảo sát ảnh hưởng của 6 nguồn cacbon khác nhau lên hoạt tính enzyme ngoại bào của *Comamonas* sp. BT.UA nhận thấy nguồn cacbon là không cần thiết cho sinh uricase ở chủng này [3].

Môi trường nuôi cấy có glucose như nguồn cacbon được sử dụng để nghiên cứu nguồn nitơ tối ưu. Ảnh hưởng của một số nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ được đánh giá. Kết quả hình 2 chỉ ra nước chiết ngô, NaNO_3 , KNO_3 , acetate amôn không thích hợp cho chủng CN3 sản sinh uricase. Nói chung việc sản sinh uricase đã được cải thiện nhiều khi sử dụng những nguồn nitơ hữu cơ (cao men, pepton, trypton và nước chiết ngô). Có thể do nguồn nitơ hữu cơ chứa nhiều loại axit amin mà được đồng hoá trực tiếp bởi tế bào VK, kết quả thúc đẩy sự sản sinh uricase [2]. Trong số những nguồn nitơ hữu cơ, cao nấm men đặc biệt làm tăng hoạt tính enzyme lên đến 0,92 U/mL.



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên tổng hợp uricase của *P. putida* CN3.

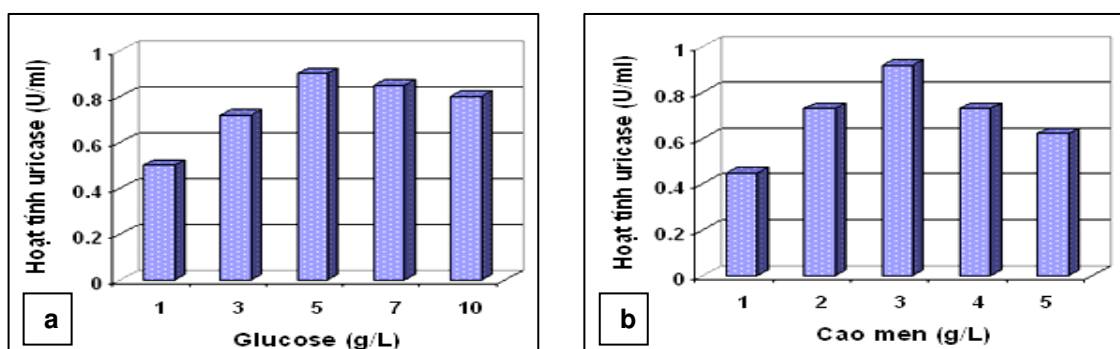
Priyabrata tìm thấy axit uric là nguồn nitơ tốt nhất cho sinh uricase ngoại bào của chủng *Comamonas* sp. BT.UA. Yazdi & cs., Abd & Abo cũng đồng ý việc sản sinh uricase là cao nhất trong môi trường chỉ chứa axit uric như nguồn nitơ duy nhất. Lotfy thấy nước chiết ngô là nguồn nitơ tốt nhất cho sinh uricase ở *B. thermocatenulatus* [3, 4, 7, 9].

3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ cacbon, nitơ lên sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme

Tiến hành nuôi cấy chủng CN3 trên các môi trường chứa nồng độ glucose: 1, 3, 5, 7, 10 g/L. Kết quả đo cho thấy hoạt độ enzyme uricase đạt tối đa khi nồng độ glucose là 5 g/L (hình 4a).

Tương tự tiến hành nuôi cấy chủng CN3 trên các môi trường chứa 5 nồng độ cao nấm men: 1, 2, 3, 4, 5 g/L. Kết quả cho thấy hoạt tính uricase của VK đạt cao nhất ở nồng độ cao nấm men là 3 g/L và thấp nhất trên môi trường chứa 1 g/L cao nấm men (hình 4b).

Như vậy môi trường chứa 0,5 % glucose và 0,3 % cao nấm men như nguồn cacbon và nitơ tốt nhất sẽ được sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo.



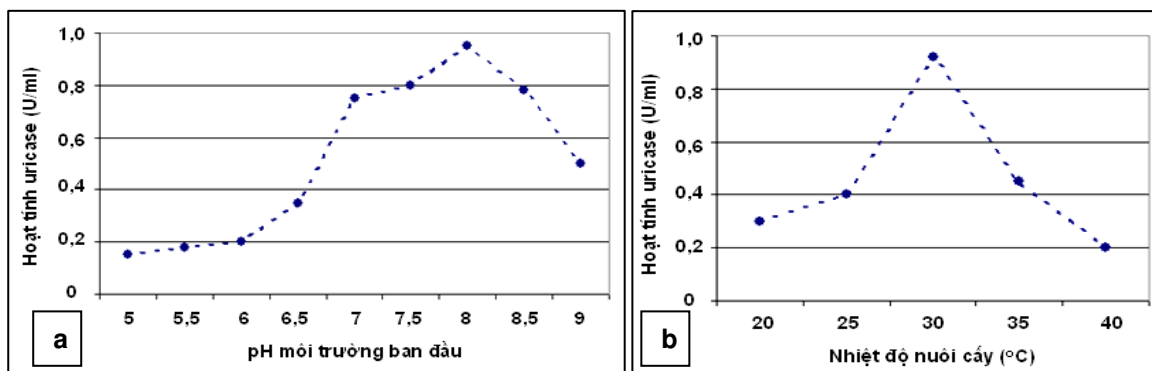
Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ glucose (a) và cao men (b) lên sinh uricase ngoại bào của *P. putida* CN3.

3.3. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy khác nhau lên sinh tổng hợp uricase

3.3.1. Ảnh hưởng của pH

Ảnh hưởng của pH ban đầu lên hoạt tính sinh uricase của CN3 đã được tiến hành ở pH ban đầu 5 - 9. Hoạt tính uricase rất thấp ở pH 5 - 6, sau đó tăng dần từ pH 6,5 đến pH 7 và đạt tối đa ở pH 8 với hoạt tính 0,95 U/mL (hình 5a). Hoạt tính enzyme giảm ở pH 8,5 - 9.

Một số nghiên cứu cho thấy *N. crassa* sản xuất uricase cao ở pH 8,8. pH 6 là tối ưu cho sản xuất uricase từ *A. flavus* và *Mucor hiemalis*. Azab & cs. tìm thấy pH ban đầu 7 là tốt nhất cho 2 chủng *P. vulgaris* 1753 và *Bacillus*-317-C sinh uricase cao. Thapar & cs. chỉ ra năng suất uricase cao nhất của *A. wentii* là ở pH 10. Trong nghiên cứu khác, pH tối ưu cho sản xuất uricase bởi *A. flavus* S.79 là ở pH 9,2 [1, 2, 5, 8, 10].



Hình 5. Ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu (a) và nhiệt độ lên sự sản sinh enzyme uricase ngoại bào của *P. putida* CN3.

3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Ảnh hưởng của nhiệt độ được tiến hành nghiên cứu trên máy lắc ổn nhiệt ở (20, 25, 30, 35 và 40 °C) trong 48 giờ ở pH 8.

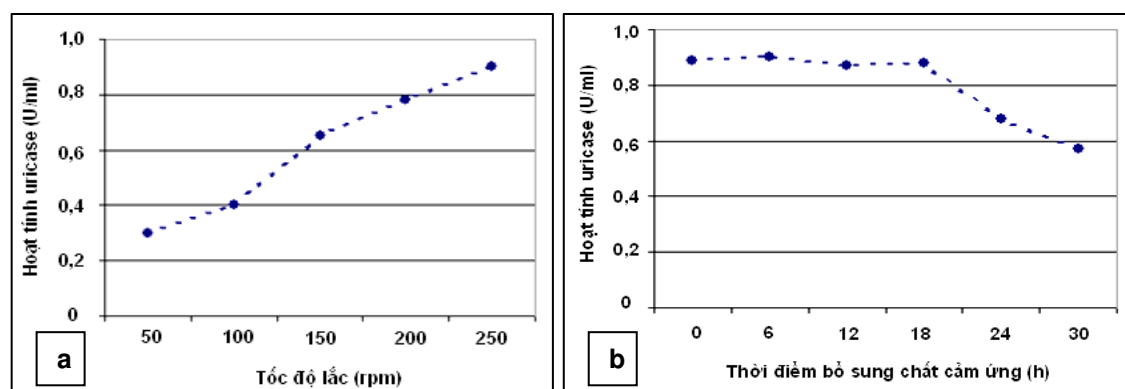
Kết quả thu được ở hình 5b chỉ ra nhiệt độ là một nhân tố chi phối rất lớn tới hoạt tính sinh uricase ngoại bào của chủng CN3. Ở các nhiệt độ được khảo sát 20 – 25 °C và 35 – 40 °C

chủng CN3 sinh uricase ngoại bào không cao < 0,45 U/ml. Sự sản sinh uricase tăng mạnh, đạt tối đa (0,92 U/mL) ở 30 °C. Những kết quả này giống với những nghiên cứu của Ammar & cs., Abd El Fattah & Abo Hamed và Yazdi & cs. cho rằng nhiệt độ tối ưu cho sinh uricase của VK là 30 °C [3, 8, 9]. Azab & cs. tìm thấy nhiệt độ nuôi cấy 37 °C là tốt nhất cho 2 chủng *P. vulgaris* 1753 và B-317-C sinh uricase cao [1].

3.3.3. Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sinh tổng hợp uricase của *P. putida* CN3

Thí nghiệm được tiến hành với nuôi cấy lắc ở các tốc độ 50, 100, 150, 200, 250 vòng/phút. Kết quả (hình 6a) cho thấy ở tốc độ lắc 250 vòng/phút hoạt độ uricase ngoại bào đạt cao nhất (0,9 U/mL). Như vậy chủng CN3 là một chủng hiếu khí mạnh, cần nhu cầu O₂ rất cao.

Atalla & cs. quan sát thấy mức độ thông khí 150 rpm là tốt nhất cho *Gliomastix gueg* sinh uricase [11]. Azab & cs lại tìm thấy tốc độ lắc 180 rpm là tốt nhất cho lên men trong bình tam giác sinh uricase bởi *P. vulgaris* [1].



Hình 6. Ảnh hưởng của độ thông khí (a) và thời điểm bổ sung chất cảm ứng (b) lên sản sinh enzyme uricase ngoại bào của *P. putida* CN3.

3.4. Xác định thời điểm bổ sung chất cảm ứng vào môi trường nuôi cấy để sinh tổng hợp enzyme

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời điểm bổ sung axit uric 0,5 % vào môi trường nuôi cấy được tiến hành trên môi trường nuôi cấy tối ưu, ở những điều kiện nuôi cấy tối ưu. Kết quả thu được (hình 6b) ở cuối giai đoạn nuôi cấy (48 giờ) cho thấy việc bổ sung axit uric vào các thời điểm nuôi cấy khác nhau 0 - 18 giờ hầu như không ảnh hưởng đến hoạt tính uricase ngoại bào, việc bổ sung chất cảm ứng sau 24 giờ nuôi cấy ảnh hưởng làm giảm hoạt tính uricase ngoại bào.

Từ các kết quả nghiên cứu ở trên đã xác định được các điều kiện tối ưu cho sinh tổng hợp uricase từ chủng *P. putida* CN3.

3.5. Nuôi cấy thu nhận enzyme trên hệ thống lên men tự động

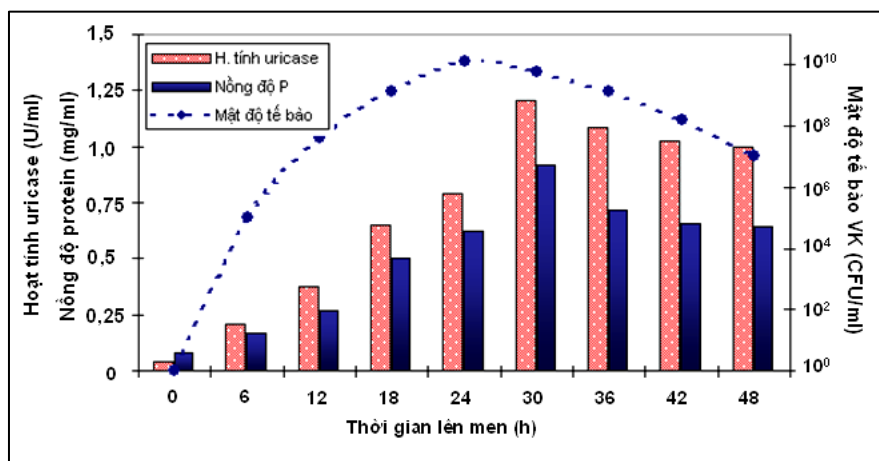
Sau nuôi cấy tiền lên men trên thạch nghiêng và nhân giống cấp II trong bình tam giác chủng *P. putida* CN3 được lên men trên hệ thống lên men sục khí có điều khiển quy mô bình lên men 5L (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific Co., Edison - Nhật) (hình 7).

Theo dõi động học sinh trưởng cũng như sinh enzyme uricase ngoại bào của chủng *P. putida* CN3.

Kết quả thu được (hình 7) cho thấy sau 24 giờ lên men trên môi trường giàu dinh dưỡng mật độ tế bào đạt cao nhất $\sim 1,2 \times 10^{10}$ CFU/ml. Sự tạo thành uricase ngoại bào và nồng độ protein tăng nhanh trong suốt 30 giờ đầu lên men, hoạt tính enzyme đạt tối đa là 1,21 U/mL và nồng độ protein tổng số trong dịch nuôi đạt tối đa 0,91 mg/mL sau 30 giờ lên men. Sau đó hoạt tính enzyme và nồng độ protein trong dịch nuôi giảm còn 1 U/mL và 0,64 mg/mL ở thời điểm kết thúc lên men (48 giờ). Trong suốt quá trình lên men, hoạt tính uricase ngoại bào và nồng độ protein tổng trong dịch nuôi có mối tương quan với nhau.

Như vậy chủng *P. putida* CN3 cần khoảng 30 giờ lên men để thu enzyme uricase tối đa. Kết quả này khác với nghiên cứu của Abd El Fattah & Abo Hamed từ *A. flavus*, *A. terreus* cần 4 ngày nuôi cấy và từ *Trichoderma* sp. cần tới 6 ngày nuôi cấy để thu uricase tối đa [9]. Yukiko & cs. sản xuất uricase tối đa bởi *Hyphomyces* sau 5 ngày nuôi cấy [7].

Dưới điều kiện nuôi cấy tối ưu trên thiết bị lên men có điều khiển pH và được cung cấp O_2 tự động, chủng *P. putida* CN3 đã cải thiện được hoạt tính sinh tổng hợp enzyme uricase ngoại bào (max đạt 1,21 U/mL) so với nuôi cấy quy mô bình tam giác (max đạt < 1 U/mL). Chủng *P. putida* CN3 có khả năng sản sinh hàm lượng enzyme cao tới 1,33 U/mg trong thời gian ngắn, vì vậy chủng này có tiềm năng ứng dụng cao.



Hình 7. Động học quá trình lên men của chủng *P. putida* CN3.

4. KẾT LUẬN

Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho *P. putida* CN3 tổng hợp uricase tối đa là nhiệt độ 30 °C, pH môi trường ban đầu 8, tốc độ lắc 250 rpm, thời gian 48 giờ. Axit uric 0,5 % là cơ chất cảm ứng tốt nhất cho *P. putida* CN3 sinh tổng hợp uricase. Glucose 0,5%, cao nấm men 0,3 % là nguồn cacbon và nitơ tốt nhất sản sinh uricase từ *P. putida* CN3. Chủng *P. putida* CN3 lên men trong điều kiện nuôi cấy tối ưu trên thiết bị lên men 5 L sản sinh uricase có hoạt độ tổng 1,21 U/mL, hoạt độ riêng 1,33 U/mg trong thời gian ngắn chỉ 30 giờ, vì vậy chủng này có tiềm năng ứng dụng cao.

Lời cảm ơn. Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam 2010-2011.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Azab E. A., Ali M. M., and Fareed M. F. - Studies on uricase induction in certain bacteria, Egyptian J. Biol. **7** (2005) 44-54.
2. Lotfy W. A. - Production of thermostable uricase by a novel *Bacillus thermocatenuatus* strain. Bioresource Technol. **99** (2008) 699-702.
3. Yazdi M. T., Zarrini G., Mohit E., Faramarzi M. A., Setayesh N., and Mohseni F. A. - *Mucorhiemalis*: a new source for uricase production, World J. Microbiol. Biotechnol. **22** (2006) 325-330.
4. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem. **193** (1951) 265 - 275.
5. Bongaerts G. P. A., Sin L. I., Peters J. L. J., Vogels D. G. - Purine degradation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas testosterone*. Biochimica Biophysica Acta. **499** (1977) 111-118.
6. Demnerová K., Králová B., Lehejčková R., Adámek V. - Production of uricase by different strains of *Streptomyces*. Biotechnol. Letters **8** (1986) 577-578.
7. Yukiko K., Yayoi D., and Hakuy K. - The characteristics of uricase production by *Hyphomycetes* II. The effectiveness of purines and pyrimidines as substrate, Yakugaku Zasshi, Japan **96** (1976) 377-382.
8. Ammar M. S., Elwan S. H., and El-Desouky E. M. - Purification and some properties of uricase from *Aspergillus flavus* S-97, Egyptian J. Microbiol. **23** (1988) 83-88.
9. Abd El Fattah M. G. and Abo-Hamed N. A. - Bioconversion of poultry waste I - Factors influencing the assay and productivity of crude uricase by three uricolytic filamentous fungi, Acta Microbiol. Immunol. Hungarica **49** (2002) 445-454.
10. Thapar V. K., Sethi R. P., and Rattan S. - Studies on fungal uricase extraction, purification and properties, Jers. Punijab Agric. Univ. **12** (1975) 62-70.
11. Atalla M. M., Eman R. H., Farag M. M., Nehad E. A. - Purification and Characterization of Uricase Enzyme Produced by *Gliomastix gueg*. www.Gate2Biotech.com. **11** (2010) 1-13.

ABSTRACT

SELECTION OF OPTIMUM CONDITIONS FOR CULTURE AND FERMENTATION OF URICASE PRODUCTION BY *PSEUDOMONAS PUTIDA* CN3

Pham Thanh Ha*, Tran Dinh Man, Tran Thi Hoa

Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi

*Email: ptha04@yahoo.com

The optimum culture conditions for uricase production by *Pseudomonas putida* CN3 in Erlenmeyer conical flasks were examined. The results showed that the optimum temperature was at 30 °C and incubation period required for maximum uricase production was 48 hours with aeration level at 250 rpm and at pH 8.0. 0.5 % uric acid proved to be the best induction substrate, 0.5 % glucose and 0.3 % yeast extract were found to be the best carbon and nitrogen sources. Production of uricase of *P. putida* CN3 was conducted in 5L fermenter under controlled conditions indicated that the uricolytic activity reached 1.21 U/ml in 30 hours and specific activity was 1.33 U/mg proteins. *P. putida* CN3 is a potential strain for uricase producing.

Keywords: *Pseudomonas putida*, culture conditions, fermentation, uricase.