

Nghiên cứu một số tính chất và sử dụng hoá chất gây đột biến NTG để nâng cao hoạt độ phân giải protein của protease ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus* sp

Nguyễn Quỳnh Uyên^{1,*}, Nguyễn Xuân Trường¹,
Phan Thị Hà¹, Nguyễn Huỳnh Minh Quyên¹, Trần Quốc Việt²

¹Phòng Công nghệ Protein-Enzyme, Viện Vi Sinh vật và Công nghệ Sinh học,
ĐHQGHN, 144 Xuân Thủy, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Chăn nuôi, Xuân Phương, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 9 tháng 7 năm 2009

Tóm tắt. Trong bài báo này, một số tính chất của protease ngoại bào được sinh tổng hợp từ chủng vi khuẩn *Bacillus* sp như nhiệt độ tối ưu (55°C), pH tối ưu (7-8) và độ bền nhiệt đã được công bố. Bên cạnh đó, protease ngoại bào này cũng được tinh sạch bước đầu qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G-50. Hơn nữa, lần đầu tiên tại Việt Nam, việc sử dụng hoá chất gây đột biến NTG trên đối tượng vi khuẩn được công bố trên tạp chí khoa học. Các thông số của quá trình gây đột biến như nồng độ NTG (0,5 mg/ml), thời điểm tác động vào vi sinh vật (giữa pha log) và thời gian tác động của NTG vào vi khuẩn (6 giờ) đã được tối ưu hoá. Sau khi gây đột biến bằng NTG và sàng lọc, hai chủng vi khuẩn đột biến có hoạt độ phân giải protein cao hơn 1,5 lần và 2 lần so với hoạt độ của chủng gốc đã thu được.

Từ khóa: Đột biến, hoạt độ phân giải, NTG, protease, sắc ký.

1. Mở đầu

Protease là enzyme có tác dụng thuỷ phân protein. Đây là enzyme đã được nghiên cứu từ lâu do những tác dụng quan trọng của nó trong nhiều quá trình cần thiết của cơ thể sống và những ứng dụng to lớn của nó trong các ngành công nghiệp. Hiện nay, hàng năm có khoảng 600 tấn protease tinh khiết (trên tổng số 300000 tấn enzyme) được sản xuất tại các nước phát triển. Trong số protease đó, khoảng 500 tấn

được sản xuất từ vi khuẩn và 100 tấn được sản xuất từ nấm mốc [1].

Kể từ những năm 1990, các nghiên cứu sản xuất và sử dụng các chế phẩm enzyme phục vụ cho chăn nuôi mới được phát triển mạnh và chủ yếu là các chế phẩm enzyme dùng để bổ sung vào khẩu phần thức ăn cho các loài động vật dạ dày đơn (lợn và gia cầm) [2-4]. Trong số các enzyme dùng trong thức ăn chăn nuôi, protease là một trong những enzyme được đề cập đến đầu tiên và cũng được sử dụng nhiều nhất. Chính vì những nguyên nhân nêu trên mà rất nhiều phương pháp đã được áp dụng nhằm nâng cao hiệu suất sản xuất protease sinh

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-4-37547694
E-mail: uyennq@vnu.edu.vn

tổng hợp từ vi sinh vật. Có thể kể đến những phương pháp sử dụng các tác nhân vật lý như UV, tia X, tia α , β , γ ... hay các tác nhân hoá học như NTG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine), ethylmethanesulphonate (EMS), HNO_2 ... Trong số các tác nhân hoá học nêu trên, NTG cho thấy có hiệu quả nhất trong việc gây đột biến vi sinh vật [5,6]. Sự thành công của vi sinh vật được gây đột biến phụ thuộc vào quá trình tối ưu hóa phát sinh đột biến kết hợp song song với hệ thống sàng lọc có hiệu quả để chọn lọc được chủng vi sinh vật đột biến có tính chất mong muốn cao nhất.

Trong bài báo này, sau quá trình tuyển chọn chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh tổng hợp protease ngoại bào, chúng tôi đã sơ bộ tinh sạch và xác định một số tính chất của protease ngoại bào thu được từ quá trình lên men của vi khuẩn UL12. Ngoài ra, chúng tôi cũng đã bước đầu sử dụng NTG với hy vọng nâng cao khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào này trong vi khuẩn UL12.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Các chủng vi sinh vật hiện được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Hoá chất: của hãng VWR và hãng Sigma, đạt độ tinh sạch cần thiết dùng cho nghiên cứu phân tích.

2.2. Phương pháp

- Xác định hoạt độ phân giải protein theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (có casein 0,1%) và theo phương pháp Anson cải tiến [7].

- Xác định pH thích hợp theo phương pháp Anson cải tiến nhưng ở các pH khác nhau.

- Xác định độ bền với nhiệt: mẫu enzyme được xử lý ở 60°C trong các khoảng thời gian nhất định và sau đó xác định hoạt độ phân giải protein theo phương pháp Anson cải tiến [7].

- Xác định nhiệt độ thích hợp theo phương pháp Anson cải tiến nhưng tại các nhiệt độ khác nhau.

- Xác định nồng độ protein theo phương pháp Bradford [8].

- Sắc ký lọc gel: mẫu enzyme (1,5 ml) được dùng để chạy sắc ký với điều kiện như sau: cột nhồi gel Sephadex G-50 có kích thước: $80 \times 1,2$ cm; đệm phosphat 20 mM pH 7,0; tốc độ chảy 18 ml/h; phân đoạn: 2 ml.

- Xác định điều kiện tối ưu gây đột biến bằng NTG: NTG với các nồng độ khác nhau tác động vào giữa pha log của quá trình phát triển của vi khuẩn trong các khoảng thời gian khác nhau; dựa trên phần trăm các tế bào sống sót thu được sau xử lý ($\leq 10\%$) so với các tế bào không xử lý để xác định các thông số tối ưu [5, 6]; so sánh hoạt độ phân giải protein các chủng đột biến thu được theo phương pháp Anson cải tiến [7].

- Điện di phát hiện hoạt tính protease: thực hiện các bước như được mô tả trong phương pháp Laemmli nhưng có bổ sung cơ chất casein 0,1% vào bản gel polyacrylamide [9].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn sinh protease ngoại bào

Từ một số chủng vi khuẩn hiện đang được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, chúng tôi đã tiến hành

tuyển chọn những chủng có khả năng sinh protease ngoại bào (bảng 1).

Bảng 1. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn sinh protease

TT	Tên chủng	Ký hiệu	Nguồn gốc	Hoạt tính (D-d) (mm)
1	<i>Streptomyces</i> sp	VTCC A211	Việt Nam	1,7
2	<i>Streptomyces</i> sp	H23	Việt Nam	1,2
3	<i>Bacillus</i> sp	VTCC A-485	Việt Nam	1,4
4	<i>Bacillus</i> sp	VTCC A-489	Việt Nam	1,7
5	<i>Bacillus</i> sp	JCM-9154	Nhật Bản	1,3
6	<i>Bacillus</i> sp	JCM-9161	Nhật Bản	1,1
7	<i>Bacillus</i> sp	UL-12	Việt Nam	2,8
8	<i>Bacillus</i> sp	VTCC B-714	Việt Nam	1,9
9	<i>Bacillus</i> sp	VTCC B-877	Việt Nam	1,8

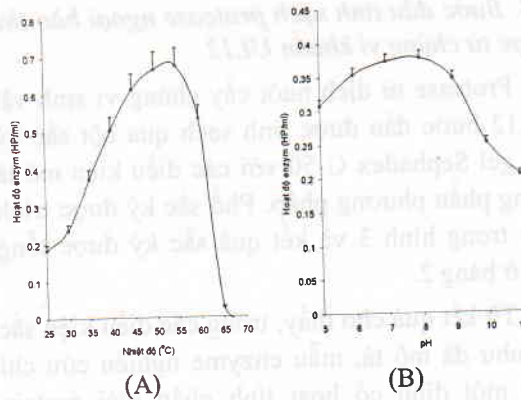
Ghi chú: D: đường kính phòng phân giải; d: đường kính giếng thạch.

Với kết quả sơ bộ này chúng tôi đã nghiên cứu điều kiện sinh trưởng, tối ưu hóa điều kiện lên men chủng vi khuẩn *Bacillus* sp (UL12). Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi không nêu các nghiên cứu liên quan đến tối ưu hóa điều kiện sinh trưởng và lên men mà chỉ trình bày các nghiên cứu liên quan đến các tính chất của enzyme ngoại bào thu được bằng các điều kiện lên men đã được tối ưu hoá.

3.2. Một số tính chất hóa sinh của protease ngoại bào sinh tổng hợp từ vi khuẩn UL12

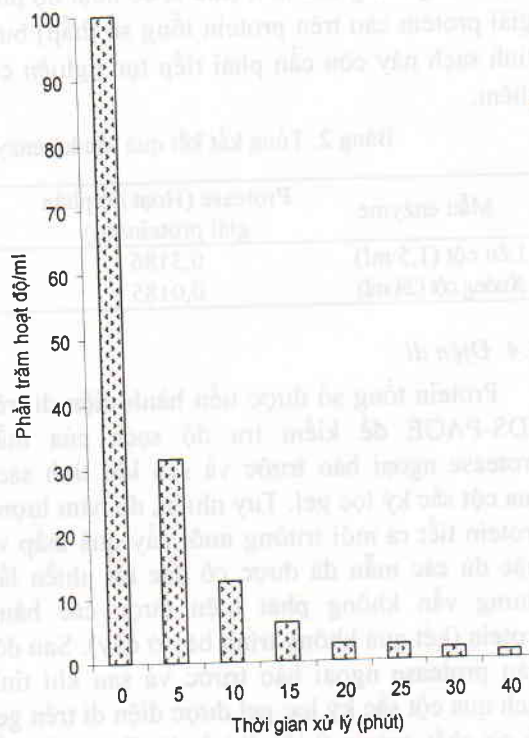
Dịch enzyme ngoại bào đã được nghiên cứu một số tính chất: pH, nhiệt độ tối ưu và độ bền với nhiệt.

Như vậy, pH tối ưu của của protease ngoại bào thu được từ chủng vi khuẩn UL12 là 7-8 (hình 1, B) và nhiệt độ tối ưu để enzyme này đạt hoạt độ cực đại là 55°C (hình 1, A).



Hình 1. Nhiệt độ (A) và pH (B) tối ưu của enzyme ngoại bào sinh ra từ chủng vi khuẩn UL12.

Enzyme nghiên cứu được xử lý ở 60°C trong các thời gian khác nhau để xác định độ bền với nhiệt (hình 2). Kết quả cho thấy, enzyme này kém bền với nhiệt (sau 5 phút xử lý ở 60°C, enzyme đã mất gần 70% hoạt độ).

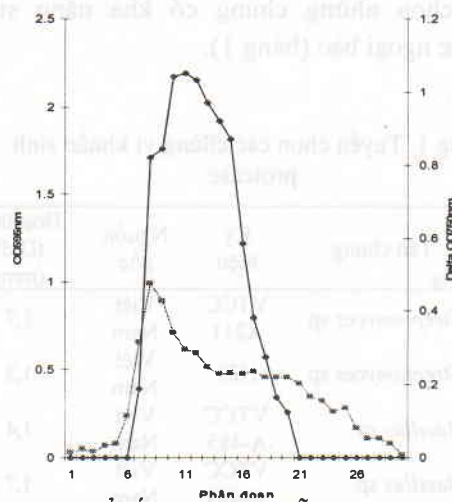


Hình 2. Độ bền với nhiệt của protease ngoại bào của vi khuẩn UL12.

3.3. Bước đầu tinh sạch protease ngoại bào thu được từ chủng vi khuẩn UL12

Protease từ dịch nuôi cấy chủng vi sinh vật UL12 bước đầu được tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G-50 với các điều kiện mô tả trong phần phương pháp. Phổ sắc ký được trình bày trong hình 3 và kết quả sắc ký được tổng kết ở bảng 2.

Từ kết quả cho thấy, trong các điều kiện sắc ký như đã mô tả, mẫu enzyme nghiên cứu chỉ cho một đỉnh có hoạt tính phân giải protein (phân đoạn thứ 13 của mẫu vi khuẩn) và đỉnh hoạt động đó cũng trùng với đỉnh protein chính của mẫu phân tích (hình 3). Hiệu suất enzyme thu được sau sắc ký là 93% và đã loại bỏ được khoảng 60% protein tạp. Như vậy, qua sắc ký độ sạch của enzyme vi khuẩn đã tăng lên khoảng 2,4 lần (bảng 2). Để có được enzyme có hoạt động riêng cao hơn (tức là có hoạt độ phân giải protein cao trên protein tổng số thấp) bước tinh sạch này còn cần phải tiếp tục nghiên cứu thêm.



Hình 3. Phổ sắc ký lọc gel mẫu enzyme ngoại bào thu được từ chủng vi khuẩn UL12.

Điều kiện sắc ký: Kích thước cột: 80 x 1,2 cm; vận tốc chảy: 18ml/l; phân đoạn: 2ml; thể tích mẫu: 1,5 ml; —◆— hoạt độ phân giải protein: OD 750nm (xác định theo phương pháp Anson cải tiến); —■— protein: OD 595nm (xác định theo Bradford).

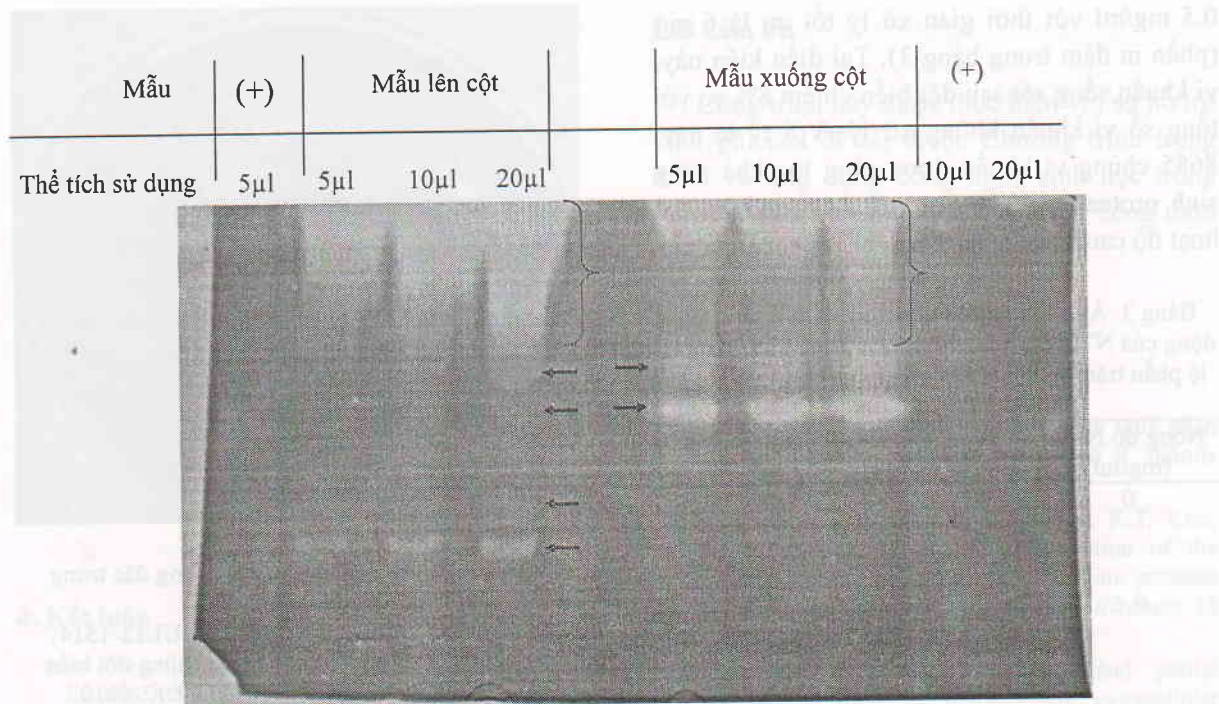
Bảng 2. Tổng kết kết quả sắc ký enzyme ngoại bào thu được từ chủng vi khuẩn UL12.

Mẫu enzyme	Protease (Hoạt độ phân giải protein/ml)	Protein (mg/ml)	Hoạt động riêng	Hiệu suất thu protease (%)	Độ sạch (lần)
Lên cột (1,5 ml)	0,3186	3,2281	0,0987	100	1
Xuống cột (24 ml)	0,0185	0,0786	0,2360	93,12	2,39

3.4. Điện di

Protein tổng số được tiến hành điện di trên SDS-PAGE để kiểm tra độ sạch của mẫu protease ngoại bào trước và sau khi tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel. Tuy nhiên, do hàm lượng protein tiết ra môi trường nuôi cấy quá thấp và mặc dù các mẫu đã được cô đặc rất nhiều lần nhưng vẫn không phát hiện được các băng protein (kết quả không trình bày ở đây). Sau đó, mẫu protease ngoại bào trước và sau khi tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel được điện di trên gel có cơ chất casein 0,1% (hình 4). Dựa trên kết quả hình 4, mẫu trước khi qua cột có 3 băng khá rõ, 1 băng mờ (các băng này được chỉ bằng mũi tên) và một vùng các băng với trọng lượng

phân tử lớn; còn mẫu xuống cột vẫn có một vùng các băng với trọng lượng phân tử lớn (độ sáng của vùng này không bằng độ sáng của mẫu lên cột) và hai băng khá rõ (được chỉ bằng mũi tên). Hai băng có trọng lượng phân tử thấp hơn trong mẫu lên cột bị mất ở mẫu xuống cột. Có lẽ do protease ngoại bào này không bền với nhiệt, nên trong quá trình sắc ký, một số protease ngoại bào của mẫu trước khi tinh sạch qua cột đã không phát hiện được hoạt tính sau khi qua cột. Tuy nhiên, số enzyme này chỉ nằm trong khoảng 7% hoạt tính enzyme bị mất đi khi sắc ký. Chúng tôi cũng tiến hành điện di song song với mẫu protease thương phẩm của hãng Novozyme [các giếng chú thích (+)] với vai trò là đối chứng dương.



Hình 4. Phổ điện di protease của mẫu enzyme ngoại bào UL12.

3.5. Gây đột biến chủng vi khuẩn UL12 bằng NTG

Như đã trình bày, với mục tiêu nghiên cứu hiệu quả của việc xử lý đột biến đối với hoạt tính sinh protease ngoại bào của vi khuẩn UL12, chúng tôi đã sử dụng tác nhân hoá học NTG - một tác nhân được cho là có hiệu quả gây đột biến cao nhất đối với vi sinh vật. Khoảng 90% các đột biến do NTG gây ra là các đột biến điểm, thay thế cặp GC thành cặp AT, một số rất ít các trường hợp dẫn đến dịch chuyển khung đọc hoặc mất đoạn [5, 6].

Để tiến hành xử lý đột biến trước hết chúng tôi phải lựa chọn nồng độ NTG cũng như thời gian xử lý đột biến thích hợp nhất. Sau đó sẽ là bước sàng lọc để đánh giá hiệu quả gây đột biến.

3.5.1. Tối ưu hóa nồng độ NTG và thời gian gây đột biến

Các tế bào của chủng UL12 tại thời điểm giữa pha log được xử lý với các nồng độ NTG khác nhau (0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml và 1 mg/ml) và trong các khoảng thời gian khác nhau (1 giờ, 2 giờ, 4 giờ và 6 giờ cho mỗi nồng độ). Thời điểm giữa pha log trong chu trình phát triển của chủng UL12 được chọn làm thời điểm gây đột biến. Tại thời điểm này, DNA của vi khuẩn được nhân đôi rất nhanh nên NTG sẽ tác dụng có hiệu quả nhất.

Sau khi được xử lý với NTG, vi sinh vật được trải trên đĩa thạch để xác định tỷ lệ sống sót của các tế bào bị gây đột biến so với tổng số các tế bào ban đầu. Tốt nhất là, giá trị này nằm trong khoảng từ 5% đến 10% để có thể thu được nhiều đột biến mong muốn nhất. Kết quả xử lý với các thời gian và nồng độ NTG khác nhau (bảng 3) cho thấy, nồng độ NTG tối ưu là

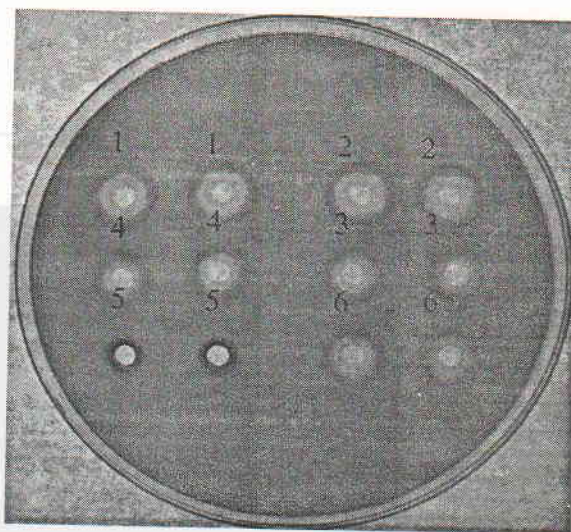
0,5 mg/ml với thời gian xử lý tối ưu là 6 giờ (phần in đậm trong bảng 3). Tại điều kiện này, vi khuẩn sống sót sau đột biến chiếm 8% so với tổng số vi khuẩn không xử lý. Với tỷ lệ này, 8685 chủng vi khuẩn được sàng lọc khả năng sinh protease với hy vọng thu được chủng có hoạt độ cao hơn chủng gốc UL12.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian tác động của NTG đối với vi sinh vật (biểu hiện bằng tỷ lệ phần trăm sống sót của chủng vi sinh vật UL12)

Nồng độ NTG (mg/ml)	Thời gian tác động (giờ)	Tỷ lệ sống sót (%)	
0	0	100 ± 0,25	
	1	93 ± 0,25	
	0,1	2	74 ± 0,37
		4	50 ± 0,29
		6	33 ± 0,25
		1	76 ± 0,24
0,5	2	60 ± 0,27	
	4	36 ± 0,28	
	6	8 ± 0,23	
	1	38 ± 0,21	
1	2	33 ± 0,24	
	4	26 ± 0,32	
	6	3 ± 0,25	

3.5.2. Kết quả sàng lọc

Các chủng thu được sau đột biến được sàng lọc sơ bộ bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Sau khi được gây đột biến với thời gian và nồng độ tối ưu như trên (0,5 mg/ml trong 6 giờ), từ 8685 chủng thu được hai chủng có hoạt độ phân giải protein lớn hơn (UL12-1514 và UL12-4623) và hai chủng có hoạt độ phân giải protein nhỏ hơn (UL12-6910 và UL12-3368) so với hoạt độ của chủng gốc. Kết quả vòng phân giải của bốn chủng này được thể hiện trên hình 5.



Hình 5. Đĩa thạch sàng lọc các chủng đặc trưng thu được sau đột biến.
Sơ đồ đĩa thạch: 1: chủng đột biến UL12-1514; 2: chủng đột biến UL12-4623; 3: chủng đột biến UL12-3368; 4: chủng đột biến UL12-6910; 5: đôi chứng âm; 6: chủng gốc UL12.

Với mục đích thu được chủng có hoạt độ phân giải protein lớn hơn chủng gốc, các hoạt độ này của các chủng đột biến UL12-1514 và UL12-4623 được xác định chính xác bằng phương pháp Anson cải tiến. Một lượng vi sinh vật bằng nhau của mỗi chủng vi sinh vật trên được cấy vào các bình tam giác 100 ml tương ứng, chứa 10 ml môi trường dịch thể LB. Sau khi nuôi 24h tại 37°C, lắc 180 vòng/phút, các mẫu được xác định mật độ tế bào và ly tâm (10000 vòng/phút) lấy dịch trong để xác định hoạt độ phân giải protein theo phương pháp Anson cải tiến. Kết quả trong bảng 4 cho thấy, sau khi gây đột biến chủng UL12-1514 và UL12-4623 có hoạt độ phân giải protein (0,556 và 0,741 đơn vị hoạt độ phân giải protein/ml tương ứng) cao hơn so với hoạt độ của chủng gốc (0,360 đơn vị hoạt độ phân giải protein/ml) là 1,54 lần và 2,05 lần.

Bảng 4. Hoạt độ phân giải protein của chủng vi khuẩn UL12 và các chủng thu được sau đột biến.

Mẫu	Protease (Hoạt độ phân giải protein/ml)	OD ₆₀₀
UL12	0,360 ± 0,005	2,122
UL12-1514	0,556 ± 0,001	2,120
UL12-4623	0,741 ± 0,001	2,136

Chúng tôi cũng tiến hành xác định một số đặc điểm như pH, nhiệt độ thích hợp và độ bền với nhiệt của hai chủng đột biến UL12-1514 và UL12-4623. Tuy nhiên các kết quả này không khác với kết quả của chủng gốc (kết quả không trình bày ở đây).

4. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1) Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp UL12 là chủng sinh protease cao nhất trong số 9 chủng vi khuẩn nghiên cứu.

2) Enzyme ngoại bào thu được từ chủng vi khuẩn UL12 có nhiệt độ thích hợp là 55°C, pH thích hợp là 7-8. Enzyme ngoại bào này không bền với nhiệt.

3) Qua sắc ký lọc gel Sephadex G-50, thu được 93% hoạt tính enzyme ngoại bào với độ sạch tăng 2,4 lần.

4) Thời điểm gây đột biến trong quá trình phát triển của vi sinh vật là giữa pha log với nồng độ NTG tối ưu để gây đột biến là 0,5 mg/ml và thời gian tối ưu để NTG tác động vào vi sinh vật là 6 giờ.

5) Chủng thu được sau đột biến (UL12-1514, UL12-4623) có hoạt độ phân giải protein tương ứng lớn hơn 1,5 lần và 2 lần hoạt độ của chủng gốc.

Lời cảm ơn

Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài thuộc Chương trình trọng điểm và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đến năm 2020.

Tài liệu tham khảo

- [1] Vũ Ngọc Bội, Nghiên cứu quá trình thủy phân protein cá bằng enzyme protease từ *B. subtilis* S5, Luận án Tiến sỹ Sinh học, 2004.
- [2] H.S. Joo, C.G. Kumar, G.C. Park, K.T. Kim, S.R. Park, C.S. Chang, Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*, *Process Biochem* 38 (2) (2002) 155.
- [3] M. Hittu, P. Vasu, Isolation and partial characterization of thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17, *Int J Food Microbiol* 42 (1998) 139.
- [4] Y. Jen-Kuo, S. Ing-Lung, T. Yew-Min, W. San-Lang, Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes, *Enzym Microb Tech* 26 (2000) 406.
- [5] S. Ajay, C.K. Ramesh, K. Manish, Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*, *Enzym Microb Tech* 17 (1995) 551.
- [6] S.J. Purohit, R.J. Putta, K.R. Nanda, R. Banerjee, Strain improvement for tanase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*, *Bioresour Technol* 97 (2006) 795.
- [7] J.S. Pietrowa, M.M. Wincjunajte, Opređenje proteolytičeskoi aktivnosti fermentnykh preparatov microbiologičeskovo proiskhozhdenie, *Priklad Biochem Mikrobiol* 2 (1996) 232 (tiếng Nga).
- [8] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248.
- [9] U.K. Leammli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680.

Study some properties and the use of mutagen NTG to enhance the proteolytic activity of extracellular protease of *Bacillus* sp

Nguyen Quynh Uyen¹, Nguyen Xuan Truong¹,
Phan Thi Ha¹, Nguyen Huynh Minh Quyen¹, Tran Quoc Viet²

¹Laboratory of Protein-Enzyme Technology, Institute of Microbiology and Biotechnology, VNU,
144 Xuan Thuy, Hanoi, Vietnam

²National Institute of Animal Husbandary, Xuan Phuong, Hanoi, Vietnam

In this article, some properties of the extracellular protease, synthesized from *Bacillus* sp, have been studied. These properties are as follows: the optimized temperature is 55°C; the optimized pH is 7-8 and the thermo-stability of this enzyme is very poor. In addition, this extracellular protease has been purified primarily through gel filtration Sephadex G-50. Moreover, this is the first time, the use of mutagen NTG on bacteria has been published in Vietnamese scientific journal. The parameters of the process for creating the mutants such as the concentration of NTG (0.5 mg/ml), the time for interaction between NTG and bacteria (mid-log phase) and the duration of this time (6 hours) have been optimized. After creating and screening the mutants, the protease activities of the mutants (UL12-1514, UL12-4623) have been increased 1.5 and 2 times respectively in comparison with that of the parent strain.

Keywords: Mutagen, proteolytic activity, NTG, protease, chromatography.