

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ TÍNH CHẤT PROTEINAZ NGOẠI BÀO CỦA *BACILLUS SUBTILIS* BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI TRÊN GEL POLYACRILAMIT

Đỗ Thị Bích Thủy⁽¹⁾, Phạm Thị Trân Châu⁽²⁾

⁽¹⁾Trường Đại học Nông lâm Huế, ⁽²⁾Đại học Quốc gia Hà Nội

1. Mở đầu

Bacillus subtilis có khả năng sinh tổng hợp một số proteinaz có các đặc tính khác nhau về pH, nhiệt độ hoạt động thích hợp, tính đặc hiệu v.v... Tỷ lệ giữa các emzim này phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy. Vì vậy tùy mục đích ứng dụng, cần lựa chọn điều kiện nuôi cấy sao cho emzim có các tính chất mong muốn chiếm tỉ lệ lớn trong các proteinaz được tổng hợp.

Chúng tôi đã phân lập được chủng *B. subtilis* từ phế liệu đầu tôm [1] và đã nghiên cứu sơ bộ ảnh hưởng của một số yếu tố đến hoạt độ phân giải protein (PA) tổng số của dịch môi trường nuôi cấy [2]. Tuy nhiên các kết quả này mới có tính chất định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo. Công trình này nhằm tìm hiểu đầy đủ hơn “bộ” proteinaz của chủng *B. subtilis* đã phân lập được và góp phần định hướng khai thác có hiệu quả hơn các proteinaz của chúng. Để đạt được mục đích này đã sử dụng phương pháp điện di trên gel polyacrilamit có cơ chất để phát hiện trực tiếp các băng proteinaz.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

- Chủng *B.subtilis* phân lập từ đầu tôm.

- *Hoá chất*: Các hoá chất dùng cho điện di như: acrylamide, Amonium persulfat, Sodium sulfate, Tris, TEMED, Coomassie brilliant blue... của hãng Merck và Bio-rad. Các chất kìm hãm đặc hiệu: 1,10-phenanthroline, Trypsin inhibitor from Soybean type I-S (STI), p-chloro-mercuribenzoic acid (PCMB) của hãng Sigma. Các ion kim loại đạt độ sạch phân tích

2.2. Phương pháp

- Nuôi *B. subtilis* đã phân lập được để thu nhận chế phẩm proteinaz: môi trường lỏng có thành phần như sau: pepton 1%, cao thịt 0,3%, tinh bột hoà tan 1,75%, cao nấm

Chữ viết tắt: PA, hoạt độ của proteinaz. SDS-PAGE, điện di trên gel polyacrilamide có sodium dodecylsulfate.

0,1%, NaCl 0,5% với pH ban đầu của môi trường bằng 6. Nuôi trong 24 giờ ở nhiệt độ 35°C.

- Thu nhận chế phẩm proteinaz từ môi trường nuôi cấy: ly tâm dịch môi trường nuôi vi khuẩn để loại bỏ tế bào, thêm 2 thể tích cồn 96° vào dịch trong nhận được để kết tủa enzym. Thu kết tủa, hoà tan trong đệm Tris-HCl 0,05M, pH 7,6 (chế phẩm ETC).

- Sắc ký qua cột Sephadex G-100: gel sau khi đã trương nước, loại bột, được cân bằng với dung dịch đệm Tris-HCl 0,005M, pH 7,6, nhồi vào cột và tiếp tục cân bằng với dung dịch đệm này.

- Xác định protein theo phương pháp Lowry [5].

- Điện di phát hiện protein theo phương pháp Laemmli [10].

- Xác định hoạt độ proteolytic (PA) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, phương pháp Anson cải tiến [8].

- Điện di phát hiện proteinaz (PA) theo phương pháp Heusen và Dowdle [6] với gel 12,5%, nồng độ casein trong gel là 0,1%, mẫu không xử lý nhiệt. Tiến hành điện di ở 4°C với cường độ dòng 20mA. Kết thúc điện di tẩy SDS trong gel bằng dung dịch Triton X-100 2,5% trong 30 phút, rửa sạch Triton bằng nước cất, ủ gel trong dung dịch đệm ở 35°C trong 3 giờ. Nhuộm gel bằng dung dịch Comasie brilliant blue 0,1% trong dung dịch methanol: axit axetic: nước theo tỉ lệ 4:1:5. Tẩy màu bằng hỗn hợp dung môi trên. Băng PA không bắt màu trên nền gel tím.

- Xác định ảnh hưởng của các chất kìm hãm: trộn chất kìm hãm với enzym để đạt nồng độ cuối cùng là $10^{-3}M$, ủ ở 37°C trong 30 phút, tiến hành điện di như trên.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến phản ứng enzym: trước hết sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch để xác định sơ bộ, sau đó tiến hành điện di như trên. Sau khi điện di, và loại SDS, cắt dọc bản gel, ủ gel trong dung dịch đệm thích hợp ở 35°C trong 3 giờ, nhuộm gel bằng dung dịch Commasie brilliant blue 0,1% trong hỗn hợp methanol: axit axetic: nước (4:1:5), tẩy gel bằng dung dịch pha Coomassie brilliant blue

- Xác định ảnh hưởng của các chất kìm hãm đặc hiệu, ion kim loại: trộn chất cần xác định với enzym để đạt nồng độ cuối cùng là $10^{-3}M$, ủ ở 37°C trong 30 phút, tiến hành điện di như trên.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến phản ứng enzym: sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, phương pháp Anson cải tiến và phương pháp điện di.

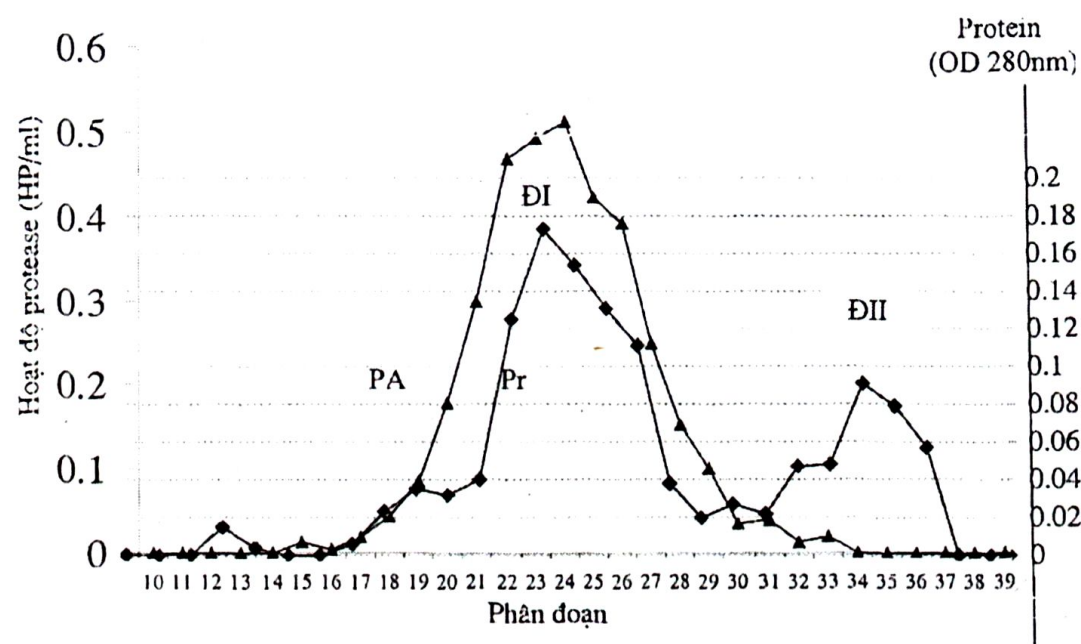
3. Kết quả và thảo luận

3.1. *Thu nhận chế phẩm proteinaz từ môi trường nuôi Bacillus subtilis và tinh sạch sơ bộ*: Để thu nhận chế phẩm proteinaz từ dịch môi trường nuôi vi khuẩn để loại

bỏ tế bào, thu dịch trong, kết tủa bằng 2 thể tích etanol 96°. Thu kết tủa, hoà tan trong đệm Tris-HCl 0,05M, pH 7,6 (chế phẩm ETC).

Tiến hành sắc ký qua cột Sephadex G-100 đã được cân bằng với đệm Tris-HCl 0,005M, pH 7,6, tốc độ dòng 17ml/giờ, thể tích phân đoạn 2ml, xác định protein và PA của các phân đoạn. Kết quả trên hình 1 cho thấy có 2 đỉnh protein nhưng chỉ có một đỉnh PA ứng với đỉnh protein chính (đỉnh 1). Dồn các phân đoạn có PA, đông khô, được chế phẩm ESG. Chế phẩm có nồng độ protein là: 1,067mg/ml. Kết quả quá trình tinh sạch sơ bộ được tóm tắt trong bảng 1.

Kết quả trên bảng 1 cho thấy hoạt độ thu được sau khi kết tủa bằng cồn lại tăng lên so với ban đầu, đạt được 125,25%. Điều này có thể do trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn có các chất kìm hãm enzym phân tử thấp (ví dụ các ion kim loại) không bị kết tủa bởi cồn và đã bị loại.



Hình 1. Sắc ký đồ của chế phẩm ETC qua cột Sephadex G-100

Cột có kích thước 80 x 1,5cm, tốc độ chảy 17ml/giờ, thể tích mỗi phân đoạn là 2ml. Dung dịch đệm Tris_HCl 0,005M, pH 7,6; PA: Hoạt độ proteinaz ; Pr: hàm lượng protein ĐI: đỉnh protein I ; ĐII: đỉnh protein II

Bảng 1. Tóm tắt quá trình tinh sạch sơ bộ chế phẩm proteinaz

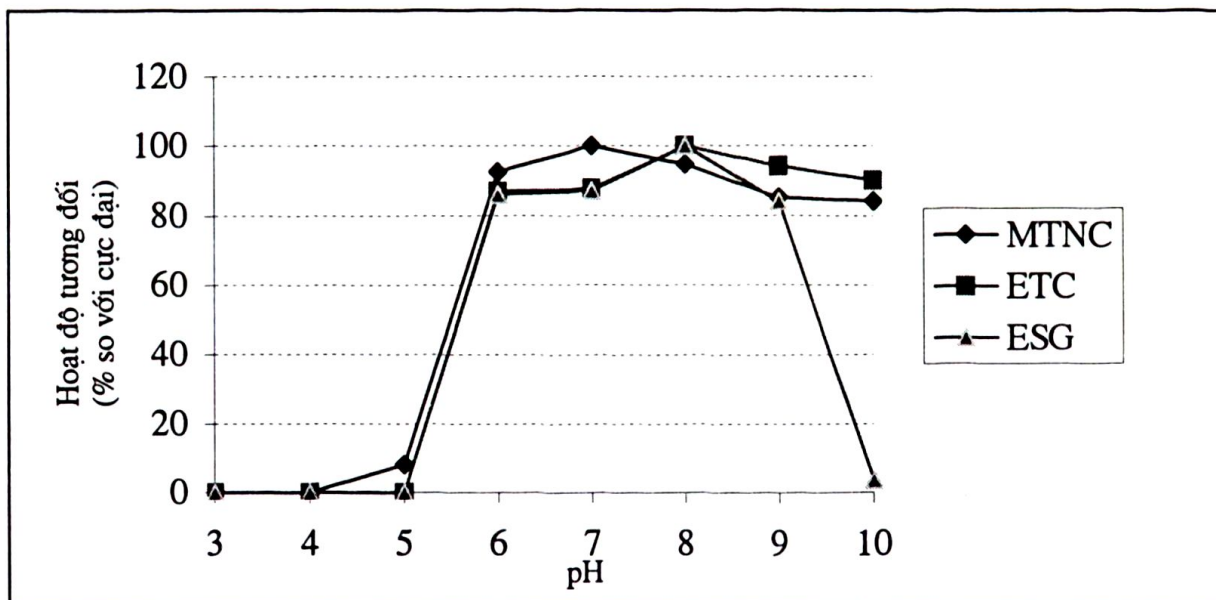
| Bước tinh chế | Hoạt độ tổng (HP) | Protein tổng (mg) | Hoạt độ riêng (HP/mg) | Độ sạch (lần) | Hiệu suất thu hồi enzym (%) |
|---------------|-------------------|-------------------|-----------------------|---------------|-----------------------------|
| Dịch MTNC | 8,91 | 104,713 | 0,080 | 1,00 | 100,00 |
| ETC | 11,16 | 47,121 | 0,237 | 2,22 | 125,25 |
| ESG | 7,080 | 0,993 | 7,132 | 89,15 | 79,46 |

Sau khi tinh sạch sơ bộ qua Sephadex G-100, đã tách được một phần protein không có hoạt tính (đỉnh protein 2) nên độ sạch tăng lên đáng kể so với ban đầu, tuy nhiên hoạt độ tổng số bị giảm hơn 20%. Vì vậy tùy mục đích sử dụng, có thể chuẩn bị chế phẩm có độ sạch khác nhau. Chế phẩm ETC có lẽ thích hợp để sử dụng trong chế biến thực phẩm.

3.2. Ảnh hưởng của pH đến PA

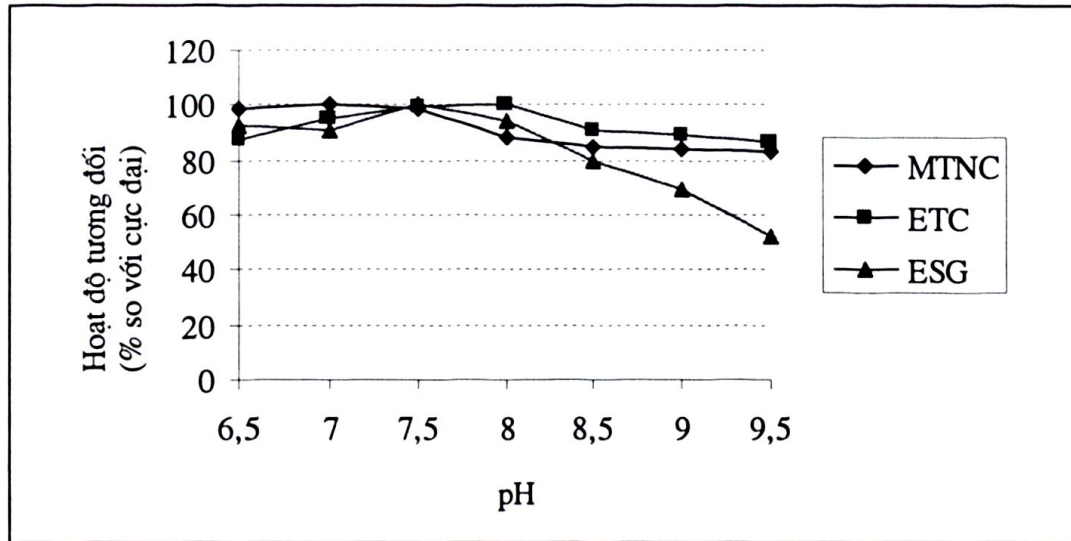
Pha dung dịch casein trong dung dịch đệm có pH khác nhau, xác định hoạt độ enzym bằng phương pháp Anson cải tiến. Kết quả nghiên cứu với 3 mẫu: dịch môi trường nuôi vi khuẩn (MTNC), chế phẩm ETC và chế phẩm ESG (hình 2a) cho thấy PA của cả 3 mẫu cao nhất ở vùng pH từ 6 –9. Ở các pH thấp hơn 6, hoạt độ giảm mạnh. Tuy nhiên ở pH 10, PA của MTNC và ETC giảm không đáng kể (còn hơn 80% hoạt độ cực đại, trong khi chế phẩm ESG hầu như bị mất hoàn toàn hoạt động. Điều này cũng phù hợp với lý thuyết là: chế phẩm có độ sạch cao thường kém bền hơn chế phẩm có độ sạch thấp.

- Tại pH 10, hoạt độ của dịch MTNC và ETC vẫn còn hơn 80%, trong khi đó, hoạt độ của ESG giảm mạnh, còn lại dưới 5% hoạt độ cực đại



Hình 2a. Ảnh hưởng của pH đến phản ứng của các chế phẩm enzym

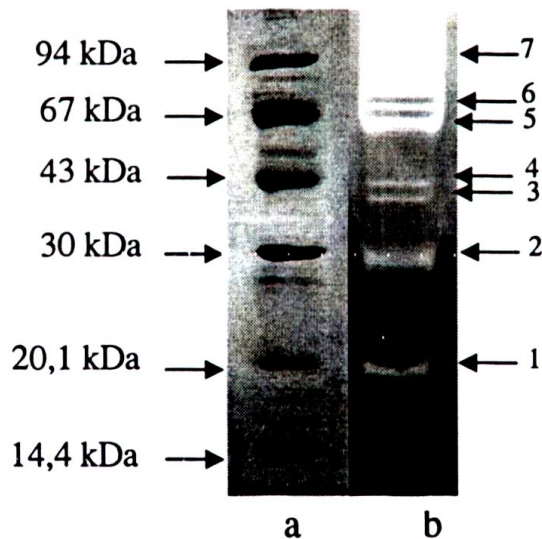
Để xác định chi tiết hơn, chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của pH trong khoảng từ 6,5 đến 9,5, cách nhau 0,5 đơn vị pH. Kết quả (hình 2b) đã khẳng định thêm các số liệu nhận được ở hình 2a và giới hạn được phạm vi pH hoạt động thích hợp của cả 3 chế phẩm là ở pH từ 6,5 đến 8,0; chế phẩm ESG bắt đầu giảm mạnh từ pH 8,5, ở pH 9,5 chỉ còn khoảng 50% hoạt độ cực đại.



Hình 2b. Ảnh hưởng của pH (6,5-9,5) đến phản ứng của các chế phẩm enzym

3.3. Điện di phát hiện PA của chế phẩm ESG trên gel poliacrilit có SDS (SDS-PAGE) có cơ chất.

Điện di chế phẩm ESG trên SDS-PAG có casein 0,1% đã phát hiện được 6 băng PA (băng sáng trên nền tím) và một vùng sáng có độ di động chậm, ký hiệu là: băng, PA-1, PA-2, PA-3, PA-4, PA-5, PA-6 và vùng PA-7.



Hình 3. Phổ điện di PA của chế phẩm ESG
(a. Các băng protein chuẩn; b. Các băng PA của ESG)

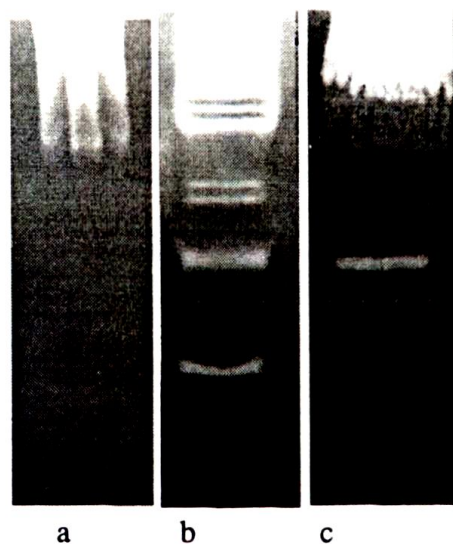
Để tìm hiểu khối lượng phân tử của các băng PA chúng tôi đã tiến hành điện di song song với protein chuẩn (cột a, hình 3). Kết quả cho thấy băng PA 1 có khối lượng phân tử (M_r) vào khoảng 20,1kD; M_r của băng 2 vào khoảng 30kD; băng 4 và 3 có M_r gần bằng nhau, vào khoảng 43kD; M_r của băng 5 và 6 vào khoảng 67kD; vùng sáng

(băng PA-7) có M_r trên 67 kD. Theo độ sáng của băng, thì vùng PA này chiếm ưu thế, cũng có thể chúng bao gồm một số băng PA không tách riêng được. Nhờ sử dụng phương pháp SDS-PAGE, nên đây là kết quả *đầu tiên phát hiện được nhiều băng PA nhất* từ chế phẩm đã tinh sạch một phần của *B. subtilis*. Trong số các băng PA phát hiện được, băng PA 2 có M_r giống với proteinaz của *Bacillus subtilis* đã được phát hiện trước đây [7]; các băng PA 4 và 3 lại có M_r giống với proteinaz của *Bacillus megaterium* [9].

3.4. Ảnh hưởng các pH khác nhau đến phổ điện di PA của chế phẩm ESG

Để tìm hiểu, so sánh tính chất các PA đã tách được từ chế phẩm ESG, sau khi điện di bản gel được ủ ở các pH khác nhau. Kết quả trên hình 3 cho thấy ở pH 9 chỉ phát hiện được băng PA-2, như vậy băng PA-2 là một proteinaz kiềm. Một lần nữa lại cho thấy PA-2 giống với proteinaz xerin như đã nói trên. Phổ điện di ở hình 3 cũng cho thấy PA-2 cũng là một trong 2 PA chiếm ưu thế đã phát hiện được (nếu không kể đến vùng PA-7). Nghiên cứu của nhiều tác giả cũng cho thấy proteinaz kiềm (subtilizin) thường chiếm ưu thế trong các proteinaz ngoại bào của *Bacillus*.

Ở pH 3 hầu như không phát hiện được băng PA nào ngoài vùng PA-7. Như vậy ở pH 7,4 đã phát hiện được nhiều băng PA nhất, vì vậy trong các thí nghiệm tiếp theo đều tiến hành ở pH này.

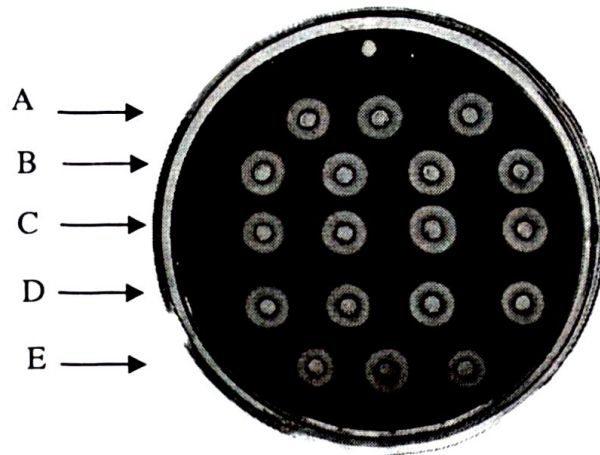


Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của các băng PA trên gel SDS-PAGE
(a. pH 3,0; b. pH 7,4; c. pH 9)

3.5. Ảnh hưởng của một số chất kìm hãm (I) đặc hiệu

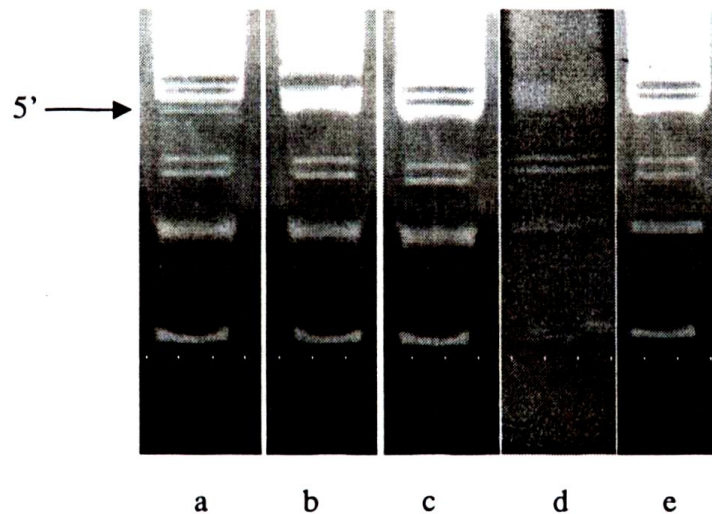
Để khảo sát sơ bộ ảnh hưởng của các I đặc hiệu đến PA chúng tôi đã sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả cho thấy chỉ EDTA có tác dụng kìm

hãm một phần hoạt độ enzym (hình 5), như vậy trong chế phẩm ESG có thể có proteinaz cần kim loại hóa trị 2.



Hình 5. Ảnh hưởng của các chất kim hãm đặc hiệu đến PA

a. Đối chứng (thay dung dịch chất kim hãm bằng dung dịch đệm)
 B- PCMB; C- STI đậm tương; D- 1,10 orthophenantrolin; E- EDTA



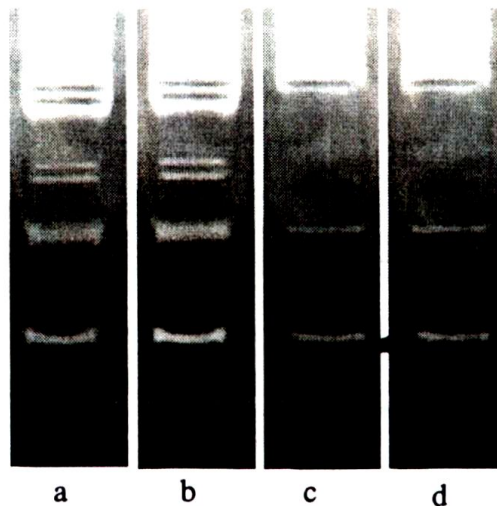
Hình 6. Ảnh hưởng của các chất kim hãm đến hoạt độ của các băng PA trên gel SDS-PAGE
 (a. EDTA; b. STI; c Đối chứng pH 7,6; d. PCMB; e. 1,10-phenanthroline)

Kết quả trên chỉ cho biết ảnh hưởng của các I đến PA tổng số của chế phẩm ESG mà chưa biết được ảnh hưởng của nó đến mỗi một băng PA đã được phát hiện. Để tìm hiểu thêm vấn đề này, chúng tôi đã tiến hành điện di PA ,cắt và ủ mỗi mẫu gel với một dung dịch có chứa một chất ức chế. Kết quả cho thấy PCMB giảm rõ rệt hoạt độ (giảm độ sáng) của tất cả các băng PA; 1,10 phenanthrolin ức chế một phần PA1, PA 2, PA3,

PA4. Cần lưu ý rằng PCMB phản ứng với nhóm -SH, 1,10-phenanthrolin phản ứng với Zn^{+2} . EDTA là một chất tạo phức càng cua, kìm hãm PA 5 và PA6 (cột a hình 6). Tuy nhiên còn chưa rõ vì sao dưới tác dụng của chất này còn phát hiện thêm được một băng 5'. STI, là chất kìm hãm đặc hiệu tripxin nhưng hầu như không có tác dụng kìm hãm đối với các băng PA kể cả PA2. Như vậy, PA2 có thể là proteinaz kiềm nhưng khác với tripxin, và có thể cần nhóm SH và Zn^{++} .

3.6. Ảnh hưởng của các ion kim loại đến PA của chế phẩm ESG

Kết quả khảo sát sơ bộ ảnh hưởng của nhiều ion kim loại hoá trị 2 đến PA của các chế phẩm bằng phương pháp khuếch tán (kết quả không trình bày ở đây) cho thấy chỉ có Ca^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} có ảnh hưởng đến hoạt độ của enzym. Vì vậy, đã tiến hành khảo sát chi tiết hơn ảnh hưởng của các ion này đến PA của chế phẩm ESG. Kết quả (hình 7) cho thấy Cu^{+2} , Zn^{+2} có tác dụng tương tự nhau, kìm hãm hầu hết các băng PA, đặc biệt là các PA-3, PA-4 và PA-5. Ngược lại Ca^{+2} hình như làm tăng PA của tất cả các băng (độ sáng của tất cả các băng PA này đều tăng). Các kết quả nghiên cứu trên đây được tóm tắt trong bảng 2.



Hình 7. Ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt độ của enzym
(nồng độ ion kim loại trong dung dịch là 10^{-3})
(a: Đối chứng; b: Ca^{2+} ; c: Cu^{2+} ; d: Zn^{2+})

Bảng 2. Tóm tắt kết quả nghiên cứu ảnh hưởng các yếu tố đến phổ PA của chế phẩm ESG

| Chế phẩm Các băng PA | Chế phẩm ESG | | | Chế phẩm ESG sau khi điện di ủ với dung dịch đệm pH 7,4 có thêm các chất kim hãm hoặc ion kim loại | | | | | | |
|-------------------------|--------------|-----------------------|-------|--|---------------|-------|---------------------|------------------|------------------|------------------|
| | pH=3 | pH=7,4 (đối chứng) | pH=9 | EDTA | STI đậu tương | PCMB | 1, 10-phenanthrolin | Ca ²⁺ | Zn ²⁺ | Cu ²⁺ |
| Vùng 7 (> 67 kDa) | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ |
| 6 (~ 67 kDa) | - | +++ | - | + | ++ | + | ++ | ++++ | | + |
| 5 (~ 67 kDa) | - | +++ | - | + | +++ | + | ++ | ++++ | | - |
| 4 (~ 43 kDa) | - | +++ | - | +++ | +++ | + | ++ | ++++ | | - |
| 3 (~ 43 kDa) | - | +++ | - | +++ | +++ | + | ++ | ++++ | | - |
| 2 (30 kDa) | - | ++++ | ++ | ++++ | ++++ | + | +++ | ++++ | | + |
| 1 (20, 1kDa) | - | ++++ | - | ++++ | ++++ | + | +++ | ++++ | | + |

(số lượng dấu "+" biểu diễn mức độ hoạt động, càng nhiều dấu "+" hoạt độ càng mạnh)

Thảo luận

Các công bố trước đây phần lớn đều cho thấy *Bacillus subtilis* có 2 loại proteinaz là proteinaz kiềm và proteinaz trung tính, với khối lượng phân tử khoảng 24 kD đến khoảng 50 kD [4, 6, 8, 9], gần đây Akinori và cộng sự đã tạo được một proteinaz kiềm tái tổ hợp có M_r 72 kD [3]. Công trình này sử dụng phương pháp SDS-PAGE đã lần đầu tiên phát hiện được nhiều proteinaz nhất từ chế phẩm proteinaz ngoại bào tinh sạch một phần của *Bacillus subtilis*: ít nhất có 6 băng proteinaz khác nhau về khối lượng phân tử. Trong số này có 2 proteinaz PA-5 và PA-6 có M_r lớn khoảng 67 kD. Tất cả các PA đều mạnh nhất ở pH 7,4 và hầu như không phát hiện được ở pH 3; ở pH 9 chỉ còn lại PA-2 và vùng PA 7. Dựa vào các tính chất đã nghiên cứu (bảng 2) có thể tạm phân các proteinaz này thành 3 nhóm: nhóm có khối lượng phân tử (M_r) thấp là PA-1 và PA-2 (khoảng 20 – 30 kD) có thể cần nhóm SH cho hoạt động xúc tác, PA-2 là proteinaz kiềm, cũng là PA chiếm ưu thế trong số 6 băng PA. Nhóm thứ hai bao gồm PA-3 và PA-4, có M_r gần giống nhau, vào khoảng 43 kD, có độ nhạy giống nhau đối với các chất đã nghiên cứu. PA-2, PA-3 và PA-4 có nhiều tính chất giống với các công bố trước đây, PA-2 có thể là proteinaz có tính kiềm tương tự proteinaz của *Bacillus polymyxa* [7]. Các PA-5 và PA-6 có khối lượng phân tử khoảng 67kD được phát hiện trong điều kiện có SDS chứng tỏ chúng là những proteinaz monomer. Ngoài khối lượng phân tử, kết quả trên bảng 2 cũng cho thấy PA-5 và PA-6 khá tương tự nhau về độ nhạy đối với các chất kìm hãm: cả 2 PA này đều bị kìm hãm bởi EDTA, PCMB, ophenanthroline, Cu, Zn, nhưng hoạt độ lại được tăng lên khi có Ca. Phải chăng đây là một endoproteinaz trung tính mới cần nhóm –SH cho hoạt động xúc tác?...

4. Kết luận

Hoạt độ phân giải casein của dịch môi trường nuôi *Bacillus subtilis* phân lập từ đầu tôm nuôi cấy trong điều kiện thí nghiệm này cao nhất ở vùng pH 7,4, giảm mạnh ở pH 3 và pH 9.

- Chế phẩm proteinaz ngoại bào tinh sạch một phần bằng cách kết tủa với etanol, sắc ký qua cột Sephadex G-100 (chế phẩm ESG) có độ sạch tăng lên 89 lần, và vẫn giữ được 79% hoạt độ ban đầu.

Chế phẩm ESG có ít nhất 6 proteinaz: PA-1, PA-2, PA-3, PA-4, PA-5 và PA-6 với khối lượng phân tử (M_r) tăng dần từ 20 đến hơn 67kD và một vùng PA có khối lượng phân tử lớn hơn. Hoạt độ của chế phẩm ESG mạnh nhất ở vùng pH từ 6-8 và bị giảm nhanh ở các pH lớn hơn 8,5 hoặc thấp hơn 5. Tuy nhiên tất cả các băng PA thể hiện hoạt động mạnh nhất ở pH 7,4; ở pH 9,0 chỉ phát hiện được băng PA-2, ở pH 3,0 không phát hiện được băng PA nào. Điều đó chứng tỏ PA-2 (có M_r vào khoảng 30kD) là một proteinaz kiềm. Vùng PA-7 ít bị thay đổi dưới tác dụng của các yếu tố đã nghiên cứu.

- Tất cả các PA đều được hoạt hóa bởi Ca^{2+} , và đều bị kìm hãm bởi Zn^{2+} và Cu^{2+} ;

EDTA kìm hãm nhẹ PA-5 và PA-6, không kìm hãm tất cả các proteinaz khác, STI đậu tương kìm hãm PA-6.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Thị Bích Thủy, Trần Thị Xô. Phân lập một số chủng vi sinh vật có khả năng sinh proteinaz cao từ vỏ tôm. *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 41(2004), tr. 611-612.
2. Đỗ Thị Bích Thủy, Trần Thị Xô. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng sinh proteinaz của *Bacillus subtilis*. *TC Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 49(2004), tr. 1667-1668.
3. Akinori Ogawa, Nobuyuki Sumitoma, Mitsuyoshi Okuda, Katsuhia Saeki, Shuji Kawai, Tohuru Kobashi, Susumu Ito, "Nucleotide and deduced amino acid sequences of a high-molecular-mass subtilisin from an alkaliphilic *Bacillus* isolate". *Biochimica and Biophysica Acta* 1624 (2003), pp. 109-114.
4. Amare Gessesse, Rajni Hatti-Kaul, Berhanu A. Gashe, Bo Mattiasson, "Novel alkaline proteinase from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather, *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003), p.519-524.
5. A.O.H.Lowry, N.J.Josebrough, A.L.Farr, R.J.Randall, "Protein measurment with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, V.193 (1951), pp 265-270.
6. Heussen, C., Dowdle, E., "Electroporetic analysis of plasminogen activator in polyacryamide gelscontaining sodium dodecylsulfate an copolymerized substrates". *Analytical Biochemistry* 102 (1980), pp. 196-202.
7. Hittu Matta, Vasu Punnj, "Isolation and partial characterization of thermostable extracellular proteinase of *Bacillus polymyxa* B-17", *International Journal of Food Microbiology* 42 (1998), p.139-145.
8. J. S. Pietrova, M.M. Wincjuajte, Opređenje proteolyticheskoi aktivnosti fermentnyk preparatow mikroorganizmovo proiskhozenia, *Priklad. Biochem. Mikrobiol.*, Vol.2(1966), p.232-237.
9. L. Keay, J. Feder, L. R. Garrett, M. H. Moseley and N. Cirulis, "*Bacillus megaterium* neutral protease, a zinc-containing metalloenzyme, *Biochimica et biophysica, Acta* 229 (1971), p.829-835.
10. Leamml U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 277 (1970), pp. 680-685.
11. Lilia M. Babé, Brian Schmidt, "Purification and biochemical analysis of WprA, a 52-kDa serine protease secreted by *B. subtilis* as an active complex with its 23-kDa proppptide" *Biochimica et biophysica Acta* 1386 (1998), pp. 211-219.

CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR PROTEINASES FROM *BACILLUS SUBTILIS* BY USING SDS-PAGE

Do Thi Bich Thuy⁽¹⁾ and Pham Thi Tran Chau⁽²⁾

⁽¹⁾ Hue University of Agriculture and Forestry,

⁽²⁾ Viet nam National University, Hanoi

Bacillus subtilis is isolated from shrimp-processing by- product.

A partly purified enzyme preparation is obtained from cell free broth culture by precipitation with ethanol (ETC) and gel filtration through Sephadex G-100 column chromatography (ESG) shows a specificity activity higher than that of the broth culture 89 folds, and the total activity is still remained 79% of the initial activity.

There are at least 6 proteolytic bands detected from ESG preparation by using SDS-PAGE method named PA-1, PA-2, PA-3, PA-4, PA-5, PA-6, with M_r of 20.1kD to 67 kD and a PA zone corresponding to a M_r higher than 67 kD.

The proteolytic activity of ESG is highest in the range of pH from 7 to 8 and decreases markedly at pH higher 8.5 and lower than 5. However, all 6 PA bands show strong activities at pH 7.4, while at pH 9 only PA-2 band is detected; at pH 3 no PA bands are observed on the gel. It indicates that PA-2 is an alkaline proteinase and may be suggested as a serine proteinase.

All PA bands seem to be activated by Ca^{++} and inhibited by Zn^{++} , Cu^{++} at different levels; EDTA slightly decreases activity of PA-5 and PA-6 but has no effect on the others. PA-6 is partly inhibited by soybean trypsin inhibitor.