

NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY VÀ TẠO CHẾ PHẨM PROTEASE TỪ CHỦNG BACILLUS SUBTILIS

NGUYỄN VĂN RỤ,
NGUYỄN THỊ LOAN, NGUYỄN THỊ BÌNH YÊN
Đại học Dược Hà Nội
NGUYỄN THỊ THANH NHÀI
Trường Cao Đẳng Dược Trung ương Hải Dương

ĐẶT VẤN ĐỀ

Protease động vật, thực vật và protease vi sinh vật đang được sử dụng có hiệu quả trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp chế biến thực phẩm, nông nghiệp và y dược học... Việt Nam đang có nhiều công trình nghiên cứu về protease từ các nguồn để ứng dụng làm thuốc và thực phẩm chức năng. Để góp phần nghiên cứu về protease vi sinh vật, đặc biệt là từ chủng vi khuẩn Bacillus subtilis nhằm ứng dụng vào thực tế, chúng tôi thực hiện đề tài với mục tiêu là lựa chọn được môi trường thích hợp nuôi cấy chủng Bacillus subtilis để sinh tổng hợp protease cao. Thu nhận, tinh chế và xác định được hoạt độ protease ở một số giai đoạn nuôi cấy và của các chế phẩm có độ tinh sạch khác nhau.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu.

Vi sinh vật: chủng Bacillus subtilis

Hóa chất: hóa chất sử dụng trong thí nghiệm ở dạng tinh khiết

Thiết bị: Máy đông khô Jouan LP3, tủ lạnh sâu, lamiar, nồi hấp autoclave, máy đo quang phổ UV-VIS, Ly tâm lạnh 15R, máy đo pH, cân phân tích, dụng cụ và thiết bị nghiên cứu thông dụng tại labo Hóa sinh.

2. Phương pháp nghiên cứu.

- Phương pháp phân lập, nuôi cấy vi sinh vật

+ Cấy truyền giống ra agarose nghiêng:

Pha 100 ml môi trường thạch nghiêng theo công thức: Pepton 1g, Cao thịt 1g, agarose 2g, mangan sulphat ($MnSO_4$) 0,005g, magnesi sulphat ($MgSO_4.7H_2O$): 0,001g, kalimonohydrophosphat (K_2HPO_4):0,02g, nước cất vừa đủ: 100ml, đun tan agarose, phân phối môi trường agarose vào mỗi ống 5-6 ml đã khử trùng ở 115°C trong 30 phút.

+ Cấy vi sinh vật vào các môi trường nuôi cấy khác nhau:

Cho vào bình nón 500ml mỗi bình 100ml môi trường dinh dưỡng, khử trùng. Cấy vi sinh vật vào môi trường nuôi cấy, đặt trong tủ ấm nuôi cấy tinh ở 30°C. Tiến hành nuôi cấy trong 3 môi trường dinh dưỡng như ở bảng 1:

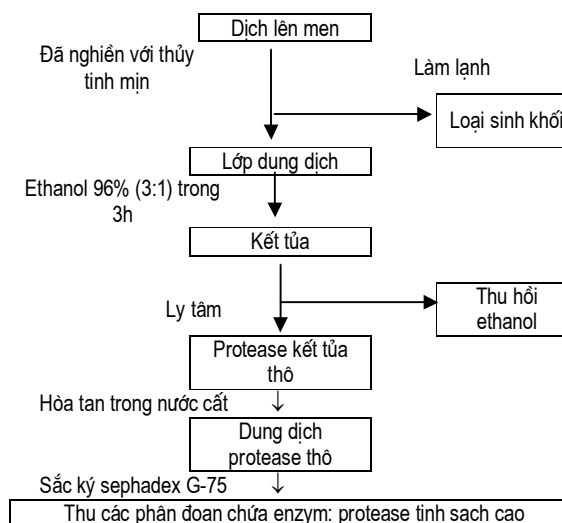
Bảng 1: Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Môi trường	MH1	MH2	MH3
Thành phần và số lượng	Pepton 1,0g	Cao thịt: 0,2g	Bột đậu tương 2,0g
	Pepton 1,0g	Cao ngô 2,0g	Đường 2,0g
	NaCl 0,5g	NaCl 0,5g	(NH_4) ₂ HPO ₄ 0,09g
	Dung dịch A 0,5ml	Saccarose 0,5g	CaCl ₂ 0,01g
	Saccarose 1,0g	(NH_4) ₂ SO ₄ 0,1g	Nước cất vđ 100ml
	Nước vừa đủ 100ml	Nước cất vđ 100ml	pH =7,0
	pH = 7,0	pH =7,0	

Ghi chú: Dung dịch A : $MgSO_4.7H_2O$: 1,15g, $MnSO_4.4H_2O$: 0,28g, nước cất vđ 100ml

- Phương pháp tách chiết và tinh chế:

Theo sơ đồ sau:



Hình 1: Sơ đồ quy trình chiết và tinh chế enzyme

- Phương pháp xác định hoạt tính protease: phương pháp Ancon cải tiến

+ Nguyên tắc: Xác định hoạt độ phân giải protein (casein) của protease trên cơ sở định lượng sản phẩm

tạo thành trong phản ứng bằng phương pháp đo độ hấp thụ phân tử ở bước sóng 280nm. Dựa vào đồ thị tiêu chuẩn tyrosin để xác định lượng tyrosin tương ứng với lượng sản phẩm thủy phân dưới tác dụng của enzyme.

Hoạt động của chế phẩm được biểu diễn bằng đơn vị hoạt động proteolytic (PAU). PAU là lượng enzyme trong 1 phút ở 37°C có khả năng phân giải protein tạo thành sản phẩm hòa tan trong acid tricloacetic, có độ hấp thụ quang ở bước sóng 280nm tương đương 1μmol tyrosin.

+ Cách tiến hành:

Pha dung dịch cơ chất: dung dịch casein 2%: Cân chính xác 2g casein cho vào cốc 100ml, thêm 30ml dung dịch NaOH 0,1N, đun cách thủy và khuấy đều cho đến khi hòa tan hoàn toàn, để nguội thêm dung dịch HCL 0,1N (cho thật từ từ và khuấy liên tục) để điều chỉnh đến pH xác định, rồi cho vào bình định mức 100ml thêm đệm phosphate 1/15M pH=7.5 cho đến vạch, kiểm tra lại pH.

Bảng 2: Cách tiến hành phản ứng enzyme

Thuốc thử (ml)	Ống trắng	Ống thử
Dung dịch casein 2% ở 37°C, 10 phút	2 ml	2ml
Dịch men ở 37°C trong 10 phút	0 ml	0,2 ml
Để 10 phút ở 37°C		
Dung dịch acid tricloacetic 5%	7.5 ml	7.5 ml
Lắc đều để ở nhiệt độ phòng 10 phút		
Lọc lấy dịch, đo độ hấp thụ phân tử ở bước sóng 280nm, cuvet agarose anh 1cm.		

Tính kết quả hoạt độ protease:

Tính số đơn vị hoạt động protease (PAU/ml) của 1 ml dịch enzyme đã lấy để xác định hoạt độ theo công thức:

PAU/ml **Error!**

t : thời gian ủ enzyme với cơ chất

Tính hoạt độ (PAU/g) của mỗi gam chế phẩm:

PAU/g = (HP/ml x 1000)/a

a: số mg chế phẩm lấy để xác định

Xây dựng đường chuẩn tyrosin: sử dụng phương pháp bình phương tối thiểu để xác định đường hồi quy tuyến tính hay đường chuẩn $y = ax + b$ là đường thẳng gần nhất đi qua các điểm thực nghiệm (x_i ; y_i). trong đó a,b là hệ số hồi quy tuyến tính.

$A = S_{xy}/S_{xx}$

$S_{xx} = \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2/N$

$S_{xy} = \sum x_i y_i - \sum x_i y_i/N$

N : số điểm thực nghiệm

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Xây dựng đường chuẩn tyrosin.

Tiến hành pha dung dịch tyrosin 1μmol/ml: Cân chính xác 18,12 mg tyrosin tinh khiết, hòa tan trong HCl 0,2N cho vào bình định mức 100ml, thêm HCl 0,2N đến vạch

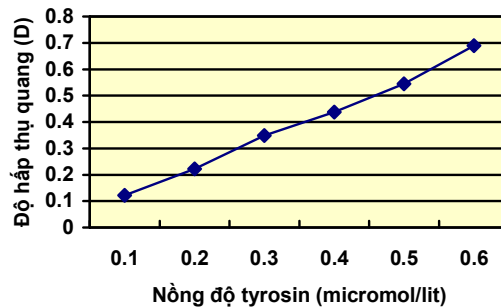
Từ dung dịch tyrosin 1μmol/ml tiếp tục pha loãng bằng HCl 0,2N để thu được các dung dịch có nồng độ

pha loãng là: 0,1 ; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 μmol/ml, đo độ hấp thụ phân tử của các dung dịch này ở bước sóng 280nm, thu được độ hấp thụ quang D như trong bảng 3:

Bảng 3: Mật độ quang D theo hàm lượng tyrosin

Nồng độ tyrosin (μmol/ml)	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60
Độ hấp thụ quang D	0,122	0,222	0,349	0,438	0,545	0,700

Thiết lập phương trình đường chuẩn tyrosin: $y = 6.144x - 2.228$



Hình 2 : Đường chuẩn độ hấp thụ quang D theo nồng độ tyrosin

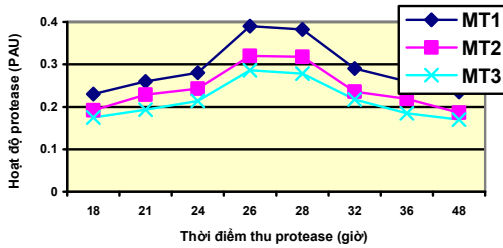
2. Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho Bacillus subtilis để sinh tổng hợp protease có hoạt tính cao nhất.

Tiến hành nuôi cấy chủng Bacillus subtilis trong 3 môi trường dinh dưỡng MT1, MT2, MT3 và tiến hành đo khả năng sinh tổng hợp protease của vi khuẩn trong các môi trường ở những thời điểm nhất định, thu được kết quả trong bảng 4:

Bảng 4: Hoạt độ protease theo thời gian nuôi cấy của 3 môi trường khác nhau

T (giờ)	18	21	24	26	28	32	36	48
PAU/ml (MT1)	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
PAU/ml (MT2)	30	60	80	90	82	90	60	35
PAU/ml (MT3)	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1
PAU/ml (MT3)	92	29	43	20	18	36	19	86
PAU/ml (MT3)	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
PAU/ml (MT3)	75	93	14	86	78	17	85	70

So sánh khả năng sinh tổng hợp protease của Bacillus subtilis trong 3 môi trường MT1, MT2, MT3 trên hình 3:



Hình 3: Khả năng sinh tổng hợp protease của *Bacillus subtilis* ở 3 môi trường

Bacillus subtilis nuôi trong môi trường MT1 có khả năng sinh tổng hợp protease luôn cao nhất ở các thời điểm nghiên cứu.

3. Thu nhận, tinh chế tạo chế phẩm protease.

Tiến hành nuôi cấy *Bacillus subtilis* nuôi trong môi trường MT1, ngừng nuôi ở thời điểm 25 – 26 giờ bằng phương pháp làm lạnh môi trường, phá vỡ tế bào và tiến hành tách chiết, tinh chế theo sơ đồ hình 1 đã thu được chế phẩm protease từ dịch nuôi cấy, xác định một số đặc điểm của chế phẩm thu được trong đó có xác định hoạt độ protease, kết quả thu được ở bảng 5:

Bảng 5: Một số đặc tính của 2 chế phẩm protease

Tên chế phẩm	Chế phẩm thô (PT)	Chế phẩm tinh sạch cao (PC)
Phương pháp thu	Kết tủa etanol lạnh	Kết tủa và Sephadex
Hình thức	Bột ngả vàng	Bột đông khô trắng
Hoạt độ protease (PAU)	3,950	29,594
Độ tan trong nước	Dễ tan, dung dịch đục lờ	Tan hoàn toàn, trong sáng

BÀN LUẬN

- Về phân lập: Đã thực hiện nuôi cấy ở các môi trường, lựa chọn được môi trường nuôi cấy cho chế phẩm có hoạt độ protease cao hơn so với chế phẩm khác đã thực hiện trước đây, hoạt độ protease của chế phẩm là: 0,390 HP/ml. Sơ bộ đã xác định được sự phụ thuộc khả năng sinh tổng hợp protease của *B. subtilis* vào môi trường nuôi cấy, mở ra hướng đi mới nghiên cứu về yếu tố ảnh hưởng khác như: nhiệt độ, pH, độ ẩm... nhằm nâng cao chất lượng chế phẩm ứng dụng trong dược phẩm, thực phẩm chức năng...

- Về xác định hoạt độ protease trong chế phẩm: Sử dụng phương pháp Anson cải tiến với ưu điểm dễ tiến hành ở labo, khá đơn giản, nhưng tốn nhiều thời gian, độ nhạy chưa cao do có nhiều loại liên kết peptid khác nhau có trong casein, cũng có thể sử dụng các phương pháp khác như Gross and Fuld, chuẩn độ formol để có độ chính xác cao hơn... tuy nhiên sử dụng phương pháp Anson cải tiến đã được

tiến hành ở labo hóa sinh của Việt Nam tương đối thuận lợi về nhiều mặt và đã tiến hành thành công.

- Về tách chiết và tinh chế: Đã sử dụng phương pháp sắc ký Sephadex G – 75 hiện đại để thu dịch enzyme tinh khiết PC cao hơn rất khoảng 7,5 lần so với chế phẩm thô PT, kết quả có thể giúp cho chế phẩm protease thu từ *B. subtilis* có nhiều triển vọng sử dụng để làm thuốc và thực phẩm chức năng, phục vụ công tác phòng và chữa bệnh.

KẾT LUẬN

- Đã lựa chọn được môi trường MT1 thích hợp để nuôi cấy chủng *Bacillus subtilis* có hoạt lực protease cao.

- Đã thu nhận được chế phẩm protease từ môi trường nuôi cấy thích hợp với hoạt độ protease cao là 0,390 PAU/ml.

- Đã tách chiết được chế phẩm PT bằng phương pháp kết tủa Ethanol 96% có hoạt độ protease 3,950 PAU/g và kết hợp với kỹ thuật sắc ký trên sephadex G – 75 đã tinh chế được chế phẩm PC đạt hoạt độ protease cao là nhất là 29,594 PAU có phẩm chất tốt có khả năng ứng dụng cao.

SUMMARY

Bacillus subtilis is one of the most studied Gram (-) positive bacteria with its proteases. They disintegrate protein and macromolecules in grown environment, easy absorption. This study shows that: Protease activity increase with content protein and macromolecule in grown environments increase. Proteases were isolated and refined by used Sephadex G - 75 from grown environment. The proteolytic activity of the production is 0.390 PAU/ml in suit grown environment and on 26 hours. Two preparations was created by the isolation and refined method which proteolytic activity of the crude was 3.950 PAU/g and the refined was 29.594 PAU/g pure more than crude 7.5 fold.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Kiểu Hữu ảnh, 1999, Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp. NXB KHKT. Hà Nội.
- Nguyễn Lâm Dũng – Đoàn Xuân Mưu – Nguyễn Phùng Tiến, 1972, Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, NXB Khoa học và kỹ thuật
- Nguyễn Đức Lượng và cộng sự, 2004, Công nghệ Enzym, NXB ĐHQG Tp Hồ Chí Minh, 216-227
- Lê Xuân Phương, 2002, Vi sinh vật công nghiệp, NXB Xây dựng. Hà Nội
- Aiba S., Hemphrey A. E. and Millis F. F., 1973, Biochemical Engineering, Second Edition. Academic Press.
- Reh, H. J. Deiana, 1994. Annales, et exercices de microbiologie ge'ne'rale, Doin Editeur, Paris
- Schlegel, H.G., 1992, Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart New York.