

KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA HAI LOẠI PROTEASE NGOẠI BÀO TỪ *Streptomyces*

DƯƠNG THẢO VI¹, HỨA TRƯỜNG CHINH^{2,3}, NGUYỄN NGỌC AN¹, NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH¹, PHẠM TÂN VIỆT^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.

²Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên.

³Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

*Tác giả liên hệ: phamtanviet@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v62i02.4784>

Tóm tắt: Các protease có nguồn gốc từ xạ khuẩn thường được chứng minh có nhiều đặc tính sinh học nổi bật. Trong nghiên cứu này, 24/30 chủng xạ khuẩn được phân lập từ đất có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào đã được ghi nhận. Trong các chủng xạ khuẩn đó, *Streptomyces* sp. CNXK72 và *Streptomyces* sp. CNXK100 thể hiện khả năng sản xuất protease mạnh nhất với độ lớn vòng phân giải lần lượt là 27,0±0,8 mm và 23,3±0,5 mm. Kết quả phân tích đặc điểm đại thể, vi thể và trình tự vùng gen mã hóa cho 16S rRNA cho thấy hai chủng này có mối quan hệ gần gũi lần lượt với *Streptomyces odorifer* (99,65%) và *Streptomyces ginkgonis* (99,86%). Protease được thu nhận từ CNXK72 có khả năng hoạt động trong khoảng 30-80°C, pH 4,0-10,0, hoạt tính tốt nhất ở 55°C, pH 7,0 trong đệm Tris-base. Bên cạnh đó, protease có nguồn gốc từ CNXK100 có phổ hoạt động trong khoảng 30-100°C, pH 4,0-10,0 và thể hiện hoạt tính tốt nhất ở 75°C, pH 6,0-9,0 trong đệm Phosphate và Tris-base. Hoạt tính protease của chủng này cao gấp 5,6 lần khi so với protease được sinh tổng hợp bởi CNXK72. Khả năng thủy phân cơ chất tốt ở nhiệt độ cao và khoảng pH rộng cho thấy tiềm năng ứng dụng trong các ngành công nghiệp chất tẩy rửa và công nghiệp thuộc da của hai protease này.

Từ khóa: Enzyme ngoại bào, protease chịu nhiệt, protease ưa nhiệt, xạ khuẩn, *Streptomyces*

1. GIỚI THIỆU

Cùng với sự phát triển của nền công nghiệp trên thế giới là sự gia tăng không ngừng của việc sử dụng các hóa chất công nghiệp. Chính vì vậy, những sản phẩm thân thiện với môi trường đã và đang dần thay thế những hóa chất độc hại, nhằm mục đích giảm thiểu tác động xấu của chúng đến môi trường, đồng thời cải thiện chất lượng cuộc sống của con người [1, 2]. Protease hay peptide hydrolase là enzyme xúc tác sự thủy phân liên kết peptide (-CO-NH-) trong phân tử protein và các chuỗi peptide. Theo phân loại của Ủy ban Enzyme, protease thuộc phân lớp 4 của lớp thứ 3 (E.C.3.4). Protease là một trong ba nhóm enzyme công nghiệp lớn nhất, chiếm khoảng 60% tổng lượng enzyme thương mại trên toàn thế giới, chúng được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau, chẳng hạn như dệt may, chất tẩy rửa, da, thức ăn chăn nuôi, chất thải và các lĩnh vực khác [3-6]. Thị trường protease toàn cầu đạt 2,76 tỷ USD vào năm 2019. Với tốc độ tăng trưởng kép hàng năm (CAGR) là 6,1% thì thị trường protease trên toàn thế giới được dự đoán sẽ đạt 3 tỷ đô la Mỹ trước năm 2024 [7].

Gần hai phần ba protease thương mại được sản xuất từ nấm mốc, nấm men và xạ khuẩn. Trong đó, xạ khuẩn là một trong những nguồn quan trọng nhất được sử dụng để sản xuất protease, do có các đặc tính đáng chú ý như ổn định ở nhiệt độ cao, bền pH, bền trong dung môi hữu cơ, chất tẩy rửa và các hợp chất oxy hóa. Việc tìm kiếm các nguồn protease mới đã và đang không ngừng nhận được sự quan tâm của các nhà nghiên cứu do khả năng ứng dụng rộng rãi của chúng. Trong một nghiên cứu của Gargi Sarkar và cộng sự (2020) đã chỉ ra rằng, protease được thu nhận từ chủng *Streptomyces* sp. GS-1 thể hiện hoạt tính xúc tác cao nhất ở 45°C và có khả năng hoạt động tốt ở pH kiềm (8,0-10,0), đặc biệt nó còn được chứng minh có hiệu quả tẩy lông trong quá trình sản xuất da [8]. Năm 2020, M. Parthasarathy và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu về việc tinh sạch và xác định đặc điểm của một protease kiềm ngoại bào của *Streptomyces* sp. LCJ12A được phân lập tại rừng ngập mặn Pichavaram (Ấn Độ), kết quả cho thấy protease này hoạt động tối ưu ở 35°C, pH 10,0 và có khoảng pH hoạt động khá rộng (pH 3,0-11,5), có tiềm năng ứng dụng trong ngành công nghiệp tẩy rửa [9]. Năm 2021, một protease có nguồn gốc từ *Streptomyces parvulus* đã được báo cáo trong công trình nghiên cứu của Alencar và cộng sự với một số đặc tính như hoạt động tối ưu ở 40°C trong dung dịch đệm Citrate Phosphate (pH 7,0), ổn định trong khoảng nhiệt độ từ 30-60°C và pH 7,0-8,5. Với

khả năng làm tiêu sợi huyết, protease này là một giải pháp đầy hứa hẹn trong việc điều trị các bệnh tim mạch, đặc biệt là bệnh huyết khối [10]. Vì vậy nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tìm kiếm các protease có nguồn gốc từ xạ khuẩn có các đặc tính tốt để ứng dụng vào các ngành công nghiệp khác nhau.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Giống xạ khuẩn và điều kiện nuôi cấy

Giống xạ khuẩn từ bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh được cấy ria trên môi trường Gause I cải tiến với các thành phần hóa chất được mua từ Merck và Trung Quốc (Casein 10,0 g; K_2HPO_4 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g; KNO_3 1,0 g; NaCl 0,5 g; $FeSO_4$ 0,01 g; agar 20,0 g; nước cất đủ 1000 ml; pH 7,2-7,4) để kiểm tra độ thuần chủng. Giống được hoạt hóa bằng cách cho sinh khối khuẩn lạc vào 5 ml môi trường Gause I cải tiến, lắc 150 vòng/phút ở 37°C trong 72 giờ.

2.2 Đánh giá khả năng sinh protease

Khả năng sinh tổng hợp protease của 2 chủng xạ khuẩn được đánh giá thông qua vòng phân giải cơ chất trên môi trường thạch Gause I cải tiến. Xạ khuẩn được cấy điểm vào đĩa thạch và ủ ở 37°C. Sau 5 ngày nuôi cấy, casein còn dư được tủa bằng dung dịch TCA 10% (trichloroacetic acid). Khả năng sinh protease được đánh giá bằng độ lớn của vòng phân giải cơ chất $A = D - d$ (mm). Trong đó, D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính khuẩn lạc (mm) và A là kích thước thực của vòng phân giải cơ chất [11].

2.3. Xác định đặc điểm đại thể và vi thể của xạ khuẩn

Xạ khuẩn được cấy ria trên môi trường Gause I cải tiến, quan sát và nhận diện các khuẩn lạc đặc trưng của xạ khuẩn sau 5 ngày cấy như kích thước khuẩn lạc, đặc điểm của bề mặt, rìa, màu sắc khuẩn lạc mặt trên, mặt dưới, sắc tố xạ khuẩn tiết ra môi trường nuôi cấy. Hình thái vi thể của các chủng xạ khuẩn được kiểm tra sau khi nuôi cấy trên môi trường Gause I trong 3-5 ngày ở 37°C. Cấu trúc cuống sinh bào tử được quan sát trên tiêu bản phòng ẩm bằng kính hiển vi quang học ở vật kính 100X [12, 13]. Các chủng xạ khuẩn được bảo quản ở 4°C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

2.4 Định danh xạ khuẩn bằng sinh học phân tử

Trình tự đoạn gene mã hóa cho 16S rRNA của hai chủng xạ khuẩn CNXK 72 và CNXK 100 được khuếch đại bằng phương pháp PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1540R (5'-AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3') với chu trình PCR như sau: 95°C - 5 phút, 30 chu kỳ (95°C - 30 giây; 55°C - 40 giây; 72°C - 90 giây) và 72°C - 5 phút. Sản phẩm khuếch đại được giải trình tự theo phương pháp Sanger bởi Công ty Trách nhiệm Hữu hạn Thương mại và Dịch vụ Nam Khoa. Kết quả giải trình tự được so sánh với các trình tự tương đồng trên ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center of Biotechnology Information) bằng công cụ BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 5.0 dựa trên thuật toán Neighbor-Joining với bootstrap 1000 lần lặp lại.

2.5 Khảo sát nhiệt độ phản ứng của protease ngoại bào

Sau 72 giờ nuôi cấy trong môi trường Gause I cải tiến, dịch enzyme được thu nhận bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ tế bào xạ khuẩn. Hoạt tính protease được xác định dựa theo phương pháp Anson cải tiến như sau: 100 μ L dịch enzyme ủ với 500 μ L dung dịch 1% casein (pha trong dung dịch đệm Tris-base; pH 8,0) trong 30 phút ở các nhiệt độ khác nhau từ 30°C đến 100°C. Sau 30 phút, 500 μ L dung dịch 10% TCA (trichloroacetic acid) được thêm vào để ngừng phản ứng, hỗn hợp trên được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C và thu phần dịch nổi bên trên để thực hiện phản ứng màu. Phản ứng màu gồm có 1000 μ L NaOH, 500 μ L dịch nổi và 300 μ L thuốc thử Folin. Lắc đều, để yên trong 10 phút, sau đó tiến hành đo OD ở bước sóng 660 nm để xác định hoạt tính enzyme [14]. Hoạt độ của protease được biểu thị là số micromole tyrosine sinh ra từ phản ứng thủy phân casein bởi 1ml dung dịch chứa protease trong thời gian 1 phút ở 35°C, pH 7,0.

2.6 Khảo sát pH phản ứng của protease ngoại bào

Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH đến hoạt tính protease của 2 chủng xạ khuẩn CNXK72 và CNXK100 được thực hiện để xác định khoảng pH hoạt động cũng như giá trị pH thích hợp cho khả năng xúc tác của enzyme. Các đệm pH khác nhau được chuẩn bị có giá trị từ pH 4,0-10,0 gồm đệm Citrate-Phosphate (pH 4,0-6,0), đệm Phosphate (pH 6,0-8,0), đệm Tris-base (pH 8,0-9,0), đệm Glycine-NaOH (pH 9,0-10,0) với

nồng độ cuối là 30 mM. Sự ảnh hưởng của pH lên hoạt tính protease được khảo sát bằng cách cho protease phản ứng với cơ chất trong các dung dịch đệm có giá trị pH khác nhau. Sau đó, hoạt tính của protease được xác định bằng phương pháp Anson cải tiến.

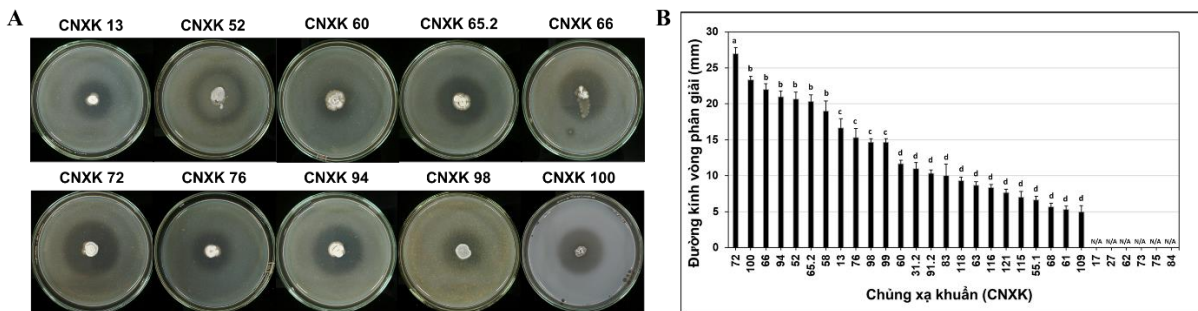
2.7 Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sử dụng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) bằng phần mềm thống kê Statgraphics để đánh giá sự khác biệt giữa các yếu tố và điều kiện khảo sát. Số liệu thu thập được tính giá trị trung bình các lần lặp lại và độ lệch chuẩn. Tất cả các số liệu được xử lý trên Excel và thống kê bằng phần mềm Statgraphics XVIII, so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phương pháp ANOVA.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào

Nhằm mục đích sàng lọc và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn thể hiện hoạt tính protease ngoại bào, 30 chủng xạ khuẩn từ bộ sưu tập giống của phòng Công nghệ Vi sinh - Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm - Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh đã được nuôi cấy trên môi trường Gause I cải tiến. Trong đó, có 24 chủng xạ khuẩn thể hiện hoạt tính protease sau 5 ngày nuôi ủ ở 37°C với kích thước vòng phân giải casein từ 5,0-27,0 mm (Hình 1A).



Hình 1. Vòng phân giải casein của một số chủng xạ khuẩn (A) và Biểu đồ thể hiện đường kính vòng phân giải cơ chất của 30 chủng xạ khuẩn (B). Error bar thể hiện độ lệch chuẩn của giá trị trung bình (n=3). Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, P < 0,05

Với đường kính vòng phân giải casein là $27,0 \pm 0,8$ mm, CNXK72 được đánh giá là chủng có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào cao nhất. Trong khi đó, chủng CNXK100, CNXK66, CNXK94, CNXK52, CNXK65.2 và CNXK58 thể hiện khả năng sản xuất protease ngoại bào tương tự nhau với đường kính vòng phân giải cơ chất từ 19,0-23,0 mm. Ngược lại, các chủng xạ khuẩn CNXK17, CNXK27, CNXK62, CNXK73, CNXK75 và CNXK84 được đánh giá là không có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào khi không thấy xuất hiện vùng sáng xung quanh khuẩn lạc (Hình 1B). Protease có nguồn gốc từ hai chủng xạ khuẩn CNXK72 và CNXK100 được đánh giá có hoạt tính cao khi so sánh đường kính vòng phân giải casein với chủng *Streptomyces* sp. AGA-10 (21,0 mm) trong nghiên cứu của Cantillo và cộng sự (2019) [15], và chủng *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 (27,0 mm) trong nghiên cứu của Al-Dhabi và cộng sự (2020) [16]. Vì vậy, CNXK72 và CNXK100 được lựa chọn để thực hiện một số thí nghiệm tiếp theo.

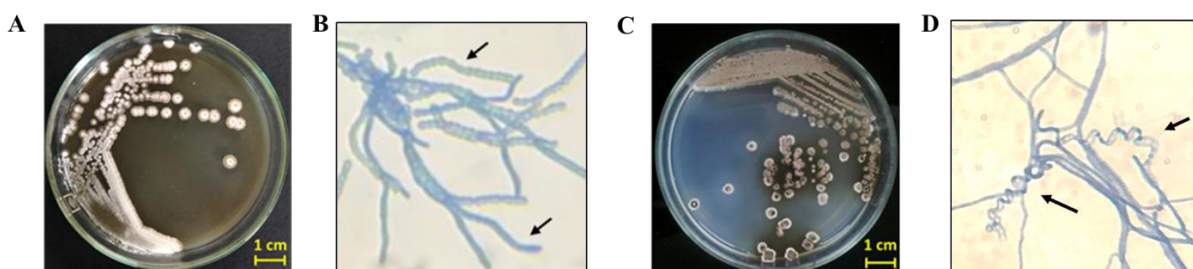
3.2 Hình thái đại thể, vi thể của CNXK72 và CNXK100

Kích thước, hình dạng khuẩn lạc, màu sắc của khuẩn ty cơ chất, khuẩn ty khí sinh cũng như sắc tố khuếch tán ra môi trường nuôi cấy là những đặc trưng để phân biệt xạ khuẩn. Khuẩn lạc của hai chủng CNXK72 và CNXK100 có kích thước từ 3,0-5,0 mm khi được nuôi cấy môi trường Gause I cải tiến trong 5 ngày ở 37°C, pH $7,2 \pm 0,2$, đồng thời biểu hiện một số đặc điểm khác nhau về hình thái đại thể. Chủng CNXK72 có khuẩn lạc rắn chắc, bề mặt chia thùy, lõm phần tâm, rìa đều, khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất có màu trắng đục và không có khả năng tiết sắc tố ra môi trường nuôi cấy (Hình 2A). Ngược lại, khuẩn lạc của chủng CNXK100 có dạng vôi, bề mặt không chia thùy, phần tâm nhô cao có màu xám đến đen, rìa đều, khuẩn ty cơ chất màu trắng, khuẩn ty khí sinh màu trắng đến xám, tiết sắc tố màu nâu (Hình 2C).

Các đặc điểm của khuẩn ty cơ chất, khuẩn ty khí sinh, cuống sinh bào tử và sự sắp xếp bào tử của xạ khuẩn cũng được quan sát dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại 1000X. Sau 72 giờ nuôi ủ ở 37°C, khuẩn

KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA HAI LOẠI PROTEASE ...

ty cơ chất và khuẩn ty khí sinh của hai chủng xạ khuẩn CNXK72 và CNXK100 không có vách ngăn nhưng có sự phân nhánh mạnh mẽ. Cuống sinh bào tử của chủng CNXK72 có dạng thẳng, hình hành vách ngăn tạo nên chuỗi bào tử đỉnh (Hình 2B). Mặc khác, cuống sinh bào tử của chủng CNXK100 có dạng móc câu đến xoắn lò xo (4-7 vòng xoắn), bào tử hình cầu dính với nhau dọc theo cuống sinh bào tử (Hình 2D).

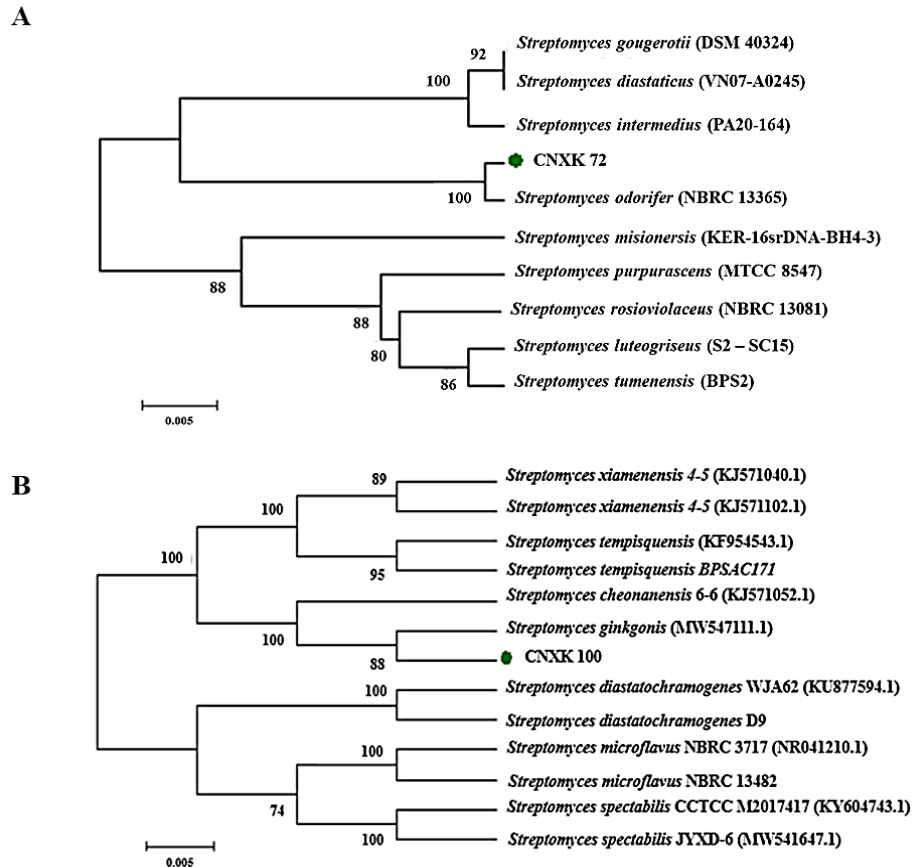


Hình 2. Đặc điểm hình thái của xạ khuẩn. Đại thể CNXK72 (A), vi thể CNXK72 (B), đại thể CNXK100 (C), vi thể CNXK100 (D)

3.3 Định danh xạ khuẩn

Việc định danh xạ khuẩn ở cấp độ phân tử được thực hiện bằng cách khuếch đại một đoạn trình tự gene mã hóa cho 16S rRNA với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả phân tích và so sánh trình tự đoạn gene này của chủng CNXK72 (1444 nucleotides) và chủng CNXK100 (1431 nucleotides) với các trình tự gene có sẵn trong ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BLASTn cho thấy cả hai chủng xạ khuẩn này đều thuộc chi *Streptomyces* với mức độ tương đồng > 99%. Trong đó, CNXK72 tương đồng 99,65% với chủng *Streptomyces odorifer*, và CNXK100 tương đồng 99,86% với chủng *Streptomyces ginkgonis*. Bên cạnh đó, cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm Mega 5.0 với thuật toán Neighbor-Joining đã cho thấy chủng xạ khuẩn CNXK72 và CNXK100 được phân bố vào chung nhánh xác định lần lượt với *Streptomyces odorifer* (NBRC 13365) (Hình 3A) và *Streptomyces ginkgonis* (MW547111.1) (Hình 3B). Dựa trên kết quả thu được, CNXK72 và CNXK100 được xác định thuộc chi *Streptomyces* và được đặt tên là *Streptomyces* sp. CNXK72 và *Streptomyces* sp. CNXK100.

Trong nghiên cứu của Wyszowska và cộng sự (2008), *S. odorifer* là một trong những chủng xạ khuẩn được ứng dụng để xử lý đất nhiễm dầu diesel thông qua khả năng sản xuất urease, phosphatase và dehydrogenase [17]. Ngoài ra, Schoenian và cộng sự (2012) cũng đã sử dụng chủng *S. odorifer* cho mục đích sản xuất antimycins ức chế nấm gây trên cây trồng [18]. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào về khả năng sản xuất cũng như đánh giá đặc tính của các protease ngoại bào của loài này. Thêm vào đó, chủng xạ khuẩn *S. ginkgonis* nội sinh thực vật đã được phân lập và định danh đầu tiên bởi Yan và cộng sự (2018) và những đặc tính về protease ngoại bào của loài này cho đến nay vẫn chưa được khai thác [19]. Vì vậy, việc mở rộng nghiên cứu để khai thác tiềm năng của protease từ hai chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. CNXK72 và *Streptomyces* sp. CNXK100 có ý nghĩa thiết thực cho nghiên cứu sau này.



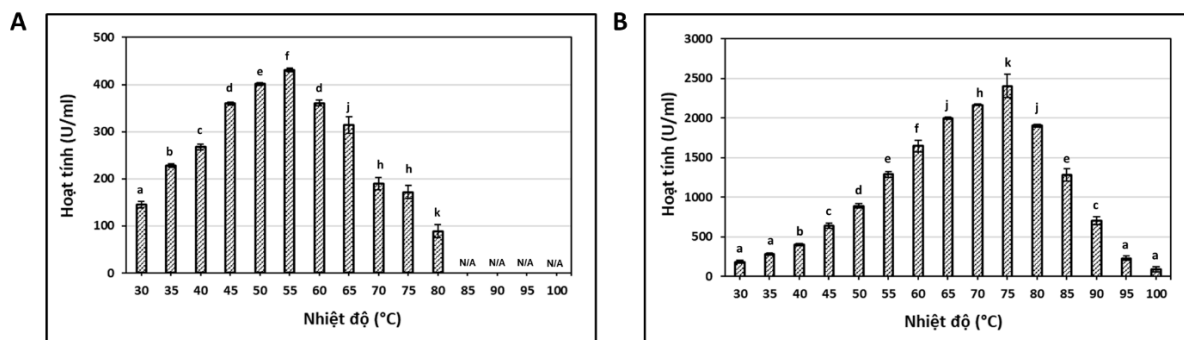
Hình 3. Cây phát sinh loài dựa trên gene mã hóa 16S rRNA của CNXK72 (A) và CNXK100 (B) bằng thuật toán Neighbor-Joining với bootstrap 1000 lần lặp lại

3.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính xúc tác của protease từ *Streptomyces* sp. CNXK72 và *Streptomyces* sp. CNXK100

Mỗi loại protease sẽ có một khoảng nhiệt độ tối ưu để hoạt động. Để tìm ra nhiệt độ hoạt động thích hợp cho protease ngoại bào được sản xuất bởi CNXK72 và CNXK100, dịch protease thô từ hai chủng xạ khuẩn được cho phản ứng với cơ chất ở các mốc nhiệt độ từ 30°C đến 100°C và hoạt tính protease được xác định theo phương pháp Anson cải tiến. Kết quả từ Hình 4 cho thấy protease thô được thu nhận từ hai chủng xạ khuẩn này có khả năng hoạt động trong phổ nhiệt độ rộng.

Protease từ chủng CNXK72 có khả năng hoạt động trong điều kiện từ 30°C đến 80°C với hoạt tính tăng dần trong khoảng 30°C (145,56±6,85 U/ml) đến 55°C (430,62±3,70 U/ml). Đồng thời, 55°C là giá trị nhiệt độ được ghi nhận cho protease thể hiện hoạt tính tối đa. Mặt khác, hoạt tính protease giảm dần trong khoảng 60°C (360,49±6,08 U/ml) đến 80°C (88,89±13,47 U/ml), và protease bị mất hoạt tính trong khoảng nhiệt độ từ 85°C đến 100°C (Hình 4A). Nhìn chung, với khả năng hoạt động trong khoảng nhiệt độ rộng và thể hiện hoạt tính cao nhất ở 55°C, nên protease được sinh tổng hợp từ CNXK 72 được xem là protease chịu nhiệt. Một loại protease có khả năng kháng nấm mốc được thu nhận từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. A6 trong nghiên cứu của Singh và cộng sự (2011) có khả năng hoạt động trong khoảng nhiệt từ 30-80°C, và thể hiện hoạt tính tối đa ở 55°C [20]. Bên cạnh đó, protease được sinh tổng hợp từ chủng xạ khuẩn *Norcardiopsis dasonvillei* subsp. *albirubida* OK-14 trong nghiên cứu của Dwivedi và cộng sự (2021) có phổ nhiệt độ hoạt động từ 30°C đến 90°C với nhiệt độ hoạt động thích hợp nhất cho protease này là 60°C. Điều này cũng khá tương đồng với phổ hoạt động của protease có nguồn gốc từ CNXK 72 [21].

Trong khi đó, dịch protease thô được thu nhận từ chủng CNXK100 có khả năng hoạt động trong khoảng nhiệt độ từ 30°C đến 100°C với hoạt tính tối ưu được ghi nhận ở 75°C. Hoạt tính protease tăng gấp 12,9 lần trong khoảng 30°C (186,67±14,14 U/ml) đến 75°C (2404,94±145,77 U/ml), hoạt tính giảm dần khi phản ứng với cơ chất trong điều kiện nhiệt độ từ 80°C (1904,20±19,40 U/ml) đến 100°C (88,89±31,45 U/ml), và vẫn giữ được 30% hoạt tính ở 90°C (Hình 4B).



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của protease thô được thu nhận từ CNXK72 (A) và CNXK100 (B). Error bar thể hiện độ lệch chuẩn của giá trị trung bình (n=3). Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$

Một loại protease được sản xuất từ *Streptomyces* sp. AB trong nghiên cứu của Jaouadi và cộng sự (2010) cũng có nhiệt độ hoạt động giống với protease được sinh tổng hợp từ chủng CNXK100 là 75°C [22]. Trong nghiên cứu của Touiou và cộng (2015), hệ serine protease ưa kiềm được sinh tổng hợp từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. AH4 có khả năng hoạt động trong phổ nhiệt từ 45°C đến 75°C và đạt hoạt tính tối ưu ở 70°C [23].

Mặt khác ở mức nhiệt độ thích hợp, protease được thu nhận từ chủng CNXK100 thể hiện hoạt tính gấp 5,6 lần hoạt tính protease được thu nhận từ chủng CNXK72. Điều này cho thấy protease có nguồn gốc từ CNXK100 có khả năng hoạt động tốt trong khoảng nhiệt độ rộng và được xác định là protease ưa nhiệt khi hoạt tính thể hiện tối ưu ở 75°C. Sau khi phân tích thống kê ANOVA với độ tin cậy 95% và so sánh giá trị $P_{value} < 0,05$ nhận thấy có sự khác biệt đáng kể về hoạt tính protease ở 55°C và 75°C của xạ khuẩn CNXK72 và CNXK100 khi so với các mức nhiệt độ khảo sát. Từ kết quả thu được, 55°C là mức nhiệt độ được lựa chọn để thực hiện phản ứng giữa enzyme và cơ chất đối với protease được sản xuất từ chủng CNXK72, và 75°C mức nhiệt được lựa chọn để thực hiện phản ứng xúc tác thủy phân cơ chất của protease được sinh tổng hợp từ CNXK100.

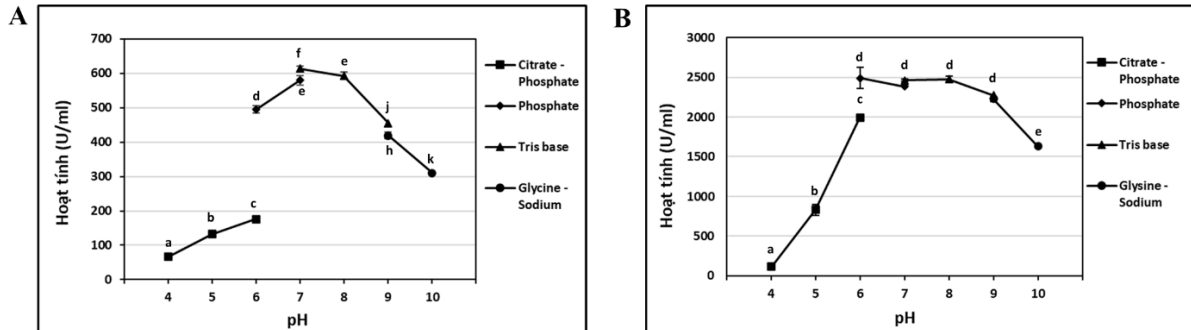
3.5 pH phản ứng của protease được thu nhận từ *Streptomyces* sp. CNXK72 và *Streptomyces* sp. CNXK100

Để tìm ra giá trị pH phản ứng thích hợp, dịch protease thô được cho tác dụng với cơ chất trong các dung dịch đệm có giá trị pH 4,0-10,0 ở 55°C đối với protease có nguồn gốc từ CNXK72 và 75°C đối với protease được sản xuất từ CNXK100. Kết quả ghi nhận từ Hình 5 cho thấy, dịch protease thô từ hai chủng xạ khuẩn có khả năng hoạt động trong khoảng pH rộng.

Protease từ chủng CNXK72 có khả năng hoạt động tốt nhất ở pH 7,0 trong đệm Tris-base với hoạt tính $613,33 \pm 6,40$ U/ml được ghi nhận. Hoạt tính của protease giảm dần khi giá trị pH phản ứng càng acid hay càng base. Tuy nhiên, ở pH 4,0 và 10,0, protease vẫn có khả năng xúc tác thủy phân cơ chất với giá trị hoạt tính được ghi nhận lần lượt là $66,67 \pm 7,20$ U/ml và $310,12 \pm 9,78$ U/ml. Bên cạnh phụ thuộc vào giá trị pH, hoạt tính protease còn phụ thuộc khá nhiều vào loại đệm sử dụng. Điều này được thể hiện rõ ràng nhất ở pH 6,0 với giá trị hoạt tính của protease được ghi nhận là $175,80 \pm 6,09$ U/ml trong đệm Citrate-Phosphate và hoạt tính tăng gấp 2,81 lần ($494,82 \pm 12,57$ U/ml) khi sử dụng đệm Phosphate. Song song đó, ở cùng giá trị pH 9,0 nhưng protease thể hiện hoạt tính trong đệm Tris-base là $455,31 \pm 10,10$ U/ml, và hoạt tính giảm 1,1 lần trong đệm Glycine-NaOH ($418,77 \pm 10,07$ U/ml) (Hình 5A). Kết quả nghiên cứu cũng khá tương đồng với một loại protease có nguồn gốc từ *Streptomyces* sp. M30 theo nghiên cứu của Yan Xin với cộng sự (2015) khi chúng có khả năng hoạt động trong phổ pH từ 5,0 đến 11,0 và hoạt tính của enzyme cũng phụ thuộc vào loại đệm sử dụng [24]. Theo Jignasha và Satya, hầu hết các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* là những sinh vật có khả năng sản xuất nhiều loại protease trung tính, điều này phù hợp với protease từ *Streptomyces* sp. SS trong nghiên cứu của Boughachiche và cộng sự (2021) [25], cũng như protease có nguồn gốc từ CNXK72. Như vậy, đệm Tris-base có giá trị pH 7,0 được lựa chọn làm điều kiện phản ứng thích hợp cho khả năng xúc tác thủy phân cơ chất của protease được thu nhận từ CNXK72.

Bên cạnh đó, dịch protease thô được thu nhận từ chủng CNXK100 có khả năng hoạt động trong khoảng pH tương tự như protease có nguồn gốc từ CNXK72, và thể hiện hoạt tính cao nhất ở pH 6,0, 7,0, 8,0 và 9,0

với giá trị ghi nhận lần lượt là $2488,89 \pm 62,49$ U/ml, $2385,19 \pm 131,50$ U/ml (đệm Phosphate), $2462,96 \pm 62,49$ U/ml, $2477,78 \pm 13,86$ U/ml và $2275,31 \pm 39,93$ (đệm Tris-base). Trong khi ở pH 10,0 protease vẫn thể hiện được 65% hoạt tính khi so sánh với với đối chứng (pH 8,0). Môi trường acid thấp là điều kiện bất lợi để protease hoạt động, mặc dù vẫn có khả năng xúc tác thủy phân cơ chất nhưng hoạt tính ghi nhận không cao ($114,82 \pm 28,85$ U/ml, pH 4,0) (Hình 5B).



Hình 5. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của protease thô được thu nhận từ CNXK72 (A) và CNXK100 (B). Error bar thể hiện độ lệch chuẩn của giá trị trung bình (n=3). Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$

Khoảng pH hoạt động của protease từ CNXK100 khá tương đồng với protease ura kiềm được sinh tổng hợp từ chủng *Streptomyces griseorubens* E44G trong nghiên cứu của Al-Askar và cộng sự (2015) khi chúng có khả năng hoạt động trong khoảng pH từ 6,0 đến 11,0, và hoạt tính thể hiện cao nhất ở pH 8,5 [26]. Mặt khác, hoạt tính của protease từ chủng xạ khuẩn CNXK100 còn phụ thuộc vào loại đệm pH sử dụng. Ở cùng giá trị pH 6,0, giá trị hoạt tính của protease được ghi nhận là $1991,36 \pm 70,94$ U/ml khi sử dụng đệm Citrate-Phosphate, và hoạt tính tăng gấp 1,25 lần khi sử dụng đệm Phosphate ($2488,89 \pm 62,45$ U/ml). Theo Tran và cộng sự (2022), hệ protease có nguồn gốc từ *Streptomyces spiebonei* cũng phụ thuộc vào loại đệm pH khi giá trị hoạt tính protease được ghi nhận là khác nhau trong đệm Tris-HCl (65%) và đệm Bicarbonate (30%) khi so với đối chứng ở cùng giá trị pH 9,0 [27]. Sau khi phân tích thống kê ANOVA với độ tin cậy 95% và so sánh giá trị $P_{value} < 0,05$, hoạt tính protease từ CNXK100 thể hiện ở giá trị pH 6,0, 7,0, 8,0 và 9,0 trong đệm Phosphate và Tris-base không có sự khác biệt, tuy nhiên có sự khác biệt ý nghĩa đối với các giá trị pH còn lại. Từ kết quả thực nghiệm, giá trị pH từ 6,0-7,0 trong đệm Phosphate và pH 7,0-9,0 trong đệm Tris-base được chọn làm giá trị pH và loại đệm phù hợp để thực hiện phản ứng giữa enzyme và cơ chất.

4. KẾT LUẬN

Có 24/30 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào khi được sàng lọc trên môi trường Gause I cải tiến. Trong đó, CNXK72 và CNXK100 là hai chủng sản sinh protease tiềm năng. Kết quả quan sát đặc điểm hình thái đại thể, vi thể và định danh đến mức độ phân tử đã xác định cả hai chủng xạ khuẩn này đều thuộc chi *Streptomyces*. Trong đó, chủng CNXK72 thể hiện mối quan hệ gần gũi với loài *Streptomyces odorifer* và chủng CNXK100 thể hiện mối quan hệ gần gũi với loài *Streptomyces ginkgonis*. Các thí nghiệm về đặc tính hóa sinh cho thấy protease của cả hai chủng xạ khuẩn này đều có khả năng hoạt động trong khoảng nhiệt độ và pH rộng, protease có nguồn gốc từ CNXK100 thể hiện hoạt tính cao gấp 5,6 lần khi so với hoạt tính của protease được sản xuất từ CNXK72 và được đánh giá là protease kiềm ưa nhiệt. Protease có khả năng hoạt động trong khoảng nhiệt độ cao và khoảng pH rộng mang lại nhiều lợi ích khác nhau so với quá trình biến đổi và phân hủy bởi chất hóa học thông thường. Với khả năng hoạt động tối ưu ở 55°C , pH 7,0 đối với protease từ CNXK72, và 75°C , pH 6,0-9,0 đối với protease từ CNXK100 nên cả hai loại protease này rất có tiềm năng thay thế các hóa chất độc hại để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng về chất xúc tác sinh học thân thiện với môi trường, dễ dàng và kinh tế.

LỜI CẢM ƠN: Chúng tôi chân thành cảm ơn Trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí để thực hiện đề tài nghiên cứu có mã số 22/1SVSHTP04. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu và Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm đã tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. Arunachalam and K. Saritha, "Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry," *Indian Journal of Science and Technology*, vol. 2, no. 12, pp. 29-32, 2009.
- [2] T. A. Hamza, "Bacterial protease enzyme: safe and good alternative for industrial and commercial use," *Int J Chem Biomol Sci*, vol. 3, no. 1, pp. 1-0, 2017.
- [3] F. J. Contesini, R. R. D. Melo, and H. H. Sato, "An overview of *Bacillus* proteases: from production to application," *Critical reviews in biotechnology*, vol. 38, no. 3, pp. 321-334, 2018. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>.
- [4] R. Gupta, Q. Beg, and P. Lorenz, "Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 59, no. 1, pp. 15-32, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0975>.
- [5] S. Gürkök, "Microbial enzymes in detergents: a review," *International Journal of Scientific and Engineering Research*, vol. 10, no. 9, pp. 75-81, 2019.
- [6] S. Raveendran, B. Parameswaran, S. Beevi, and A. Pandey, "Applications of microbial enzymes in food industry," *Food technology and biotechnology*, vol. 56, no. 1, p. 16, 2018. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>.
- [7] R. Sawant and S. Nagendran, "Protease: an enzyme with multiple industrial applications," *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, no. 6, pp. 568-579, 2014.
- [8] G. Sarkar and K. Suthindhiran, "Extraction and characterization of alkaline protease from *Streptomyces* sp. GS-1 and its application as dehairing agent," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 25, p. 101590, 2020.
- [9] M. Parthasarathy and J. J. Gnanadoss, "Purification and characterization of extracellular alkaline protease from *Streptomyces* sp. LCJ12A isolated from *Pichavaram mangroves*," *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, vol. 8, no. 1, pp. 1-0, 2020. <https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80103>
- [10] V. N. Alencar, M. C. D. Nascimento, J. V. D. S. Ferreira, and A. C. L. Leite, "Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system," *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 93, 2021. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120210335>
- [11] M. J. Leboffe and B. E. Pierce, "Microbiology: Laboratory Theory and Application," Brief. Morton Publishing Company, 2016.
- [12] H. Hoang and N. T. Du, "Giáo trình vi sinh vật đại cương," *Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội*, trang 32–39, 2008.
- [13] L. D. Nguyen, Đ. Q. Nguyen, and V. T. Pham, "Vi sinh vật học," *Nhà xuất bản Giáo Dục*, 2002.
- [14] J. Lanoë and J. Dunnigan, "Improvements of the Anson assay for measuring proteolytic activities in acidic pH range," *Analytical Biochemistry*, vol. 89, no. 2, pp. 461-471, 1978.
- [15] D. G. Hurtado-Cantillo, A. Moreno-Enríquez, and Z. Evangelista-Martínez, "Influence of carbon source on extracellular protease production by soil *Streptomyces* sp. AGS-10," *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 2021, pp. 236-241, 2019. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.2.236-241>
- [16] N. A. Al-Dhabi, G. A. Esmail, A.-K. M. Ghilan, and M. V. Arasu, "Isolation and screening of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation," *Saudi journal of biological sciences*, vol. 27, no. 1, pp. 474-479, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.011>.
- [17] J. Wyszowska, M. Kucharski, and J. Kucharski, "Role of actinomycetes of the genus *Streptomyces* in alleviating the effects of soil contamination with diesel oil," *Polish Journal of Natural Sciences*, 2008. 23(3): p. 709–717. <https://doi.org/10.2478/v10020-008-0056-5>
- [18] I. Schoenian, C. Paetz, J. S. Dickschat, and D. Spiteller, "An unprecedented 1, 2- shift in the biosynthesis of the 3- aminosalicylate moiety of antimycins," *ChemBioChem*, vol. 13, no. 6, pp. 769-773, 2012. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200033>.
- [19] X. Yan, Y. Li, N. Wang, Y. Chen, and L.-I. Huang, "*Streptomyces ginkgonis* sp. nov., an endophyte from *Ginkgo biloba*," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 111, no. 6, pp. 891-896, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10482>.
- [20] A.K Singh and H.S. Chhatpar, "Purification, characterization, and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6," *Journal of Basic Microbiology*, vol 51, no. 4, pp. 424-32, 2011. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000310>
- [21] P. Dwivedi, A. K. Sharma, and S. P. Singh, "Biochemical properties and repression studies of an alkaline serine protease from a haloalkaliphilic actinomycete, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *albirubida* OK-14," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 35, p. 102059, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102059>.
- [22] B. Jaouadi, B. Abdelmalek, D. Fodil, F. Z. Ferradji, and S. Bejar. "Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 21, pp. 8361-9, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.066>
- [23] S. B.Touioui, N. Z. Jaouadi, H. Boudjella, F. Z.Ferradji, and B. Jaouadi. "Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from *Streptomyces* sp. strain AH4". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 37, no. 7, pp. 1079-922015, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1858-6>

- [24] Y. Xin, Z. Sun, Q. Chen, and Y. Huang, "Purification and characterization of a novel extracellular thermostable alkaline protease from *Streptomyces* sp. M30," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, no. 11, pp. 1944-1953, 2015. <https://doi.org/10.4014/jmb.1507.07017>.
- [25] F. Boughachiche, K. Rachedi, H. Zerizer, and A. Boulahrouf, "Production of protease on wheat bran by a newly isolated *Streptomyces* sp. under solid state fermentation," *Journal of Biosciences*, vol. 29, no. 1, pp. 33-48, 2021. <https://doi.org/10.3329/jbs.v29i0.54820>.
- [26] A. A. Al-Askar, Y. M. Rashad, E. E. Hafez, and K. M. Ghoneem, "Characterization of alkaline protease produced by *Streptomyces griseorubens* E44G and its possibility for controlling Rhizoctonia root rot disease of corn," *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 29, no. 3, pp. 457-462, 2015. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1015446>.
- [27] T. N. Tran, C.T. Doan, V. B. Nguyen, A. D. Nguyen, and S. L. Wang, "Conversion of fishery waste to proteases by *Streptomyces speibonae* and their application in antioxidant preparation". *Fishes*, vol. 7, no. 3, p. 140, 2022. <https://doi.org/10.3390/fishes7030140>.

CHARACTERIZATION OF TWO EXTRACELLULAR PROTEASES FROM *Streptomyces*

DUONG THAO VI¹, HUA TRUONG CHINH^{2,3}, NGUYEN NGOC AN¹,
NGUYEN THI DIEU HANH¹, PPHAM TAN VIET^{1*}

¹*Institute of Biotechnology and Food technology, Industrial University of Ho Chi Minh City.*

²*Department of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University HCMC*

³*Vietnam National University, Ho Chi Minh City.*

**Corresponding author: phamtanviet@iuh.edu.vn*

Abstract: Proteases derived from actinomycetes have often been shown to possess many remarkable biological properties. In this study, 24/30 actinomycetes isolated from soils were found to be able to synthesize extracellular proteases. Among those actinomycetes, *Streptomyces* sp. CNXK72 and *Streptomyces* sp. CNXK100 exhibited the strongest protease production with the zone of substrate hydrolysis of 27.0±0.8 mm and 23.3±0.5 mm, respectively. The macroscopic and microscopic characteristics together with the phylogenetic analysis of 16S rRNA sequences showed that these two strains are closely related to *Streptomyces odorifer* (99.65%) and *Streptomyces ginkgonis* (99.86%), respectively. CNXK72-derived protease is active between 30-80°C, pH range of 4.0-10.0, with maximum activity at 55°C and pH 7.0 in Tris-base buffer. Besides, CNXK100-derived protease has an activity spectrum from 30-100°C, pH 4.0-10.0, and show optimum activity at 75°C, pH 6.0-9.0 in Phosphate and Tris-base buffer, and exhibit 5.6 times more activity than proteases derived from CNXK72. The good substrate hydrolysis at high temperatures and wide pH ranges indicates potential applications in detergent and tanning industries of these two proteases.

Keyword: Actinomycetes, Extracellular enzyme, thermal stable protease, *Streptomyces*

Ngày nhận bài: 19/09/2022

Ngày chấp nhận đăng: 07/11/2022