

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN SINH TỔNG HỢP PROTEASE NGOẠI BÀO CHỊU NHIỆT TỪ *Streptomyces* sp. CNXK100

NGUYỄN NGỌC AN¹, HỨA TRƯỜNG CHINH^{2,3}, PHẠM TẤN 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.v68i02.5078>

Tóm tắt. Protease chịu nhiệt được ứng dụng rộng rãi trong các quy trình công nghiệp do thể hiện hoạt tính xúc tác tối ưu ở nhiệt độ cao. Ngày càng có nhiều nghiên cứu về protease có nguồn gốc từ xạ khuẩn bởi các đặc tính nổi bật của chúng như chịu nhiệt, hoạt động được trong các điều kiện có pH cực đoan và sự hiện diện của các chất ức chế. Trong nghiên cứu này, dịch protease ngoại bào từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. CNXK100 đã được chứng minh có hoạt tính xúc tác cao nhất ở 75°C. Khi nuôi cấy *Streptomyces* sp. CNXK100 trong môi trường Gause I cải tiến có bổ sung 1,0% skim milk, 1,0% lactose, 0,1% NaNO₃ trong điều kiện lắc 150 vòng/phút ở 30-35°C, pH ban đầu 7,0-8,0, dịch protease ngoại bào thể hiện hoạt tính cao nhất (2943,21±12,1 U/ml). Các điều kiện nuôi cấy đã được xác định sẽ là tiền đề để ứng dụng protease chịu nhiệt được sinh tổng hợp từ *Streptomyces* sp. CNXK100 trong các lĩnh vực có liên quan.

Từ khóa: Xạ khuẩn, điều kiện nuôi cấy, enzyme ngoại bào, *Streptomyces*, protease chịu nhiệt

1. GIỚI THIỆU

Chi *Streptomyces* thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, phân bố rộng rãi trong môi trường tự nhiên và thường có tỷ lệ GC trong DNA cao hơn 55%. Trong chu trình sống, chúng thường sinh trưởng dưới dạng sợi không có vách ngăn, có thể hình thành bào tử riêng lẻ hoặc chuỗi [1, 2]. Trong những năm gần đây, *Streptomyces* ngày càng nhận được sự quan tâm vì chúng đóng vai trò quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất của tự nhiên, có khả năng sinh tổng hợp đa dạng các loại enzyme ngoại bào và các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học cao [1, 3, 4]. Bộ gene của *Streptomyces* mã hóa cho khoảng 800 protein ngoại bào, trong đó *S. coelicolor* A3(2) có tiềm năng sinh tổng hợp khoảng 147 hydrolase với phần lớn là các cellulase, chitinase, xylanase, alpha-amylase, lipase, catalase và phospholipase [5, 6].

Protease từ vi sinh vật không chỉ có triển vọng trong ngành công nghiệp chất tẩy rửa và thuộc da, mà còn được ứng dụng trong ngành tổng hợp peptide, thuốc thử chẩn đoán [1, 7]. Trong đó, protease chịu nhiệt thể hiện hoạt tính xúc tác cao, độ đặc hiệu cơ chất cao, và mang lại nhiều lợi ích khác nhau so với quá trình biến đổi và phân hủy bởi chất hóa học thông thường. Việc áp dụng protease chịu nhiệt sẽ làm giảm nguy cơ tạp nhiễm vi sinh vật trong một số quy trình sản xuất thực phẩm, giảm độ nhớt của chất lỏng, thúc đẩy khả năng hòa tan cơ chất, cải thiện quá trình truyền nhiệt, và truyền khối [7]. Đáp ứng được các đặc tính đó, protease có nguồn gốc từ các loài *Streptomyces* vẫn thể hiện hoạt tính ổn định ở nhiệt độ cao, khoảng pH rộng, dưới sự hiện diện của dung môi hữu cơ, chất tẩy rửa và các hợp chất oxy hóa. Từ nguồn dữ liệu ngày càng nhiều về trình tự bộ gene và protein, *Streptomyces* đã và đang được sử dụng để sản xuất protease [8-11]. Cụ thể, protease chịu nhiệt từ *Streptomyces* có khả năng hoạt động trong điều kiện nhiệt độ cao (45-50°C) và pH kiềm (pH 8,0-10,0) có tiềm năng lớn trong ứng dụng xử lý chất thải nông nghiệp như lông, móng tay, tóc, hoặc trong làm bánh, dẹt, sản xuất chất tẩy rửa, bia, pho mát, ngành công nghiệp thuộc da [12-15].

Về điều kiện nuôi cấy *Streptomyces*, thành phần dinh dưỡng, nhiệt độ, pH môi trường ban đầu và thời gian nuôi cấy được chứng minh có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sinh tổng hợp protease. Trong nghiên cứu của Duraikannu và cộng sự (2018), tinh bột, cao đậm thủy phân và nhiệt độ lên men đóng vai trò quan trọng trong quá trình sản sinh protease từ chủng *S. radiopugnans* VITSD8 [16]. Theo Dhabi và cộng sự (2020), *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 thể hiện khả năng sinh tổng hợp protease cao nhất trong môi trường có pH ban đầu 9,0, sau 5 ngày ở 40°C. Đồng thời, maltose và peptone với nồng độ 1,0% cũng có ảnh hưởng đáng kể đến sự sản sinh protease của chủng này [17]. Vì vậy, nghiên cứu này đã được thực hiện nhằm tìm ra điều

kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp protease chịu nhiệt có hoạt tính cao từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. CNXK100, hướng đến mục tiêu thu nhận enzyme với số lượng lớn, góp phần đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng về protease chịu nhiệt.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chủng vi sinh vật

Chủng *Streptomyces* sp. CNXK100 được phân lập từ đất của tỉnh Bến Tre và định danh bởi Nguyễn Thị Diệu Hạnh và cộng sự (2021) [18]. Chủng xạ khuẩn này được lưu trữ ở -80°C trong Bộ sưu tập giống của Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Xác định hoạt tính protease

Hoạt tính của protease được xác định theo phương pháp Anson cải tiến với casein làm cơ chất và L-tyrosine làm chất chuẩn [19]. Một đơn vị hoạt tính protease (U) là lượng enzyme cần thiết để giải phóng $1,0\ \mu\text{mol}$ tyrosine từ phản ứng thủy phân casein trong 1 phút ở 75°C , pH 8,0 [19].

2.3. Khảo sát nhiệt độ phản ứng của protease chịu nhiệt từ dịch nuôi cấy *Streptomyces* sp. CNXK100

Chủng *Streptomyces* sp. CNXK100 được nuôi cấy trong môi trường Gause I cải tiến (10,0 g/L casein, 1,0 g/L KNO_3 , 0,5 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L NaCl, 0,01 g/L FeSO_4 , pH $7,0 \pm 0,2$), lắc 150 vòng/phút ở 35°C , trong 5 ngày. Dịch protease thô được thu nhận bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút, sau đó được cho phản ứng với casein trong điều kiện nhiệt độ thay đổi từ $60-90^{\circ}\text{C}$. Sau khi kết thúc phản ứng, hoạt tính protease được xác định theo phương pháp Anson cải tiến.

2.4. Ảnh hưởng của chất cảm ứng và nồng độ chất cảm ứng lên sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt

Chủng *Streptomyces* sp. CNXK100 được nuôi cấy ở 35°C trong môi trường Gause I cải tiến pH $7,0 \pm 0,2$ có bổ sung riêng lẻ các nguồn cơ chất cảm ứng khác nhau như casein, gelatin, skim milk và albumin với nồng độ 1,0% (w/v), lắc 150 vòng/phút trong 5 ngày, với tỷ lệ giống 1,0% (v/v). Trong đó đối chứng âm là môi trường không có bổ sung chất cảm ứng [13, 20]. Sau mỗi 12 giờ, dịch nuôi cấy được thu nhận và xác định hoạt tính. Sau khi xác định được nguồn cơ chất cảm ứng thích hợp, thí nghiệm được tiếp tục với việc khảo sát nồng độ cơ chất theo các nồng độ 0-3,0% (w/v) [21, 22]. Sau mỗi 12 giờ, dịch nuôi cấy được thu nhận và xác định hoạt tính.

2.5. Ảnh hưởng của nguồn carbon và nồng độ carbon lên sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt

Chủng *Streptomyces* sp. CNXK100 được nuôi cấy ở 35°C trong môi trường Gause I cải tiến pH $7,0 \pm 0,2$ có bổ sung cơ chất cảm ứng với nồng độ thích hợp và riêng lẻ các nguồn carbon khác nhau gồm glucose, sucrose, maltose, lactose, maltodextrin, tinh bột với nồng độ 1,0% (w/v). Sau mỗi 12 giờ, dịch protease thô được thu nhận và xác định hoạt tính. Sau khi xác định được nguồn carbon thích hợp, thí nghiệm được tiếp tục với việc khảo sát nồng độ carbon theo các nồng độ 0-4,0% (w/v). Sau mỗi 12 giờ, dịch protease thô được thu nhận và xác định hoạt tính [15, 23, 24].

2.6. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen và nồng độ nitrogen lên sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt

Chủng *Streptomyces* sp. CNXK100 được nuôi cấy ở 35°C trong môi trường Gause I cải tiến pH $7,0 \pm 0,2$ có bổ sung cơ chất cảm ứng, nguồn carbon thích hợp và riêng lẻ các nguồn nitrogen khác nhau như KNO_3 (đối chứng), NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NH_4NO_3 , peptone, và tryptone với nồng độ 0,1% (w/v). Sau mỗi 12 giờ, dịch protease thô được thu nhận và xác định hoạt tính. Sau khi xác định được nguồn carbon thích hợp, thí nghiệm được tiếp tục với việc khảo sát nồng độ carbon theo các nồng độ 0,1-3,0% (w/v). Sau mỗi 12 giờ, dịch protease thô được thu nhận và xác định hoạt tính [15, 23, 25].

2.7. Ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy

Chủng *Streptomyces* sp. CNXK100 được nuôi cấy trong môi trường Gause I cải tiến có thành phần dinh dưỡng thích hợp đã được xác định, với các giá trị pH môi trường ban đầu khác nhau 4,0-10,0 ở 35°C . Điều kiện pH cho hoạt tính protease cao nhất sẽ được lựa chọn để nghiên cứu ảnh hưởng của các khoảng nhiệt độ khác nhau từ $25-50^{\circ}\text{C}$. Dịch protease thô được thu nhận và xác định hoạt tính sau mỗi 12 giờ, trong suốt 108 giờ [20, 23, 26].

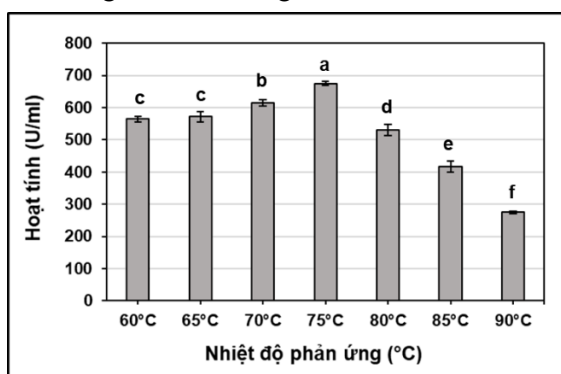
2.8. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được tính toán và vẽ đồ thị bằng Microsoft Excel. Phần mềm thống kê Statgraphics 19 được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các yếu tố khảo sát thông qua phương pháp ANOVA một yếu tố với mức ý nghĩa 95% ($P_{\text{value}} < 0,05$).

3. KẾT QUẢ

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng lên hoạt tính protease của dịch nuôi cấy *Streptomyces* sp. CNXK100

Dịch protease thô thu nhận từ quá trình nuôi cấy *Streptomyces* sp. CNXK100 sau 5 ngày trong môi trường Gause I cải tiến thể hiện hoạt tính protease trong tất cả các mốc nhiệt độ khảo sát 60-90°C (Hình 1). Hoạt tính protease được ghi nhận tăng dần trong khoảng từ 60°C ($436,79 \pm 6,88$ U/ml) đến 75°C ($518,76 \pm 5,49$ U/ml), và cao nhất ở 75°C. Hoạt tính protease giảm dần ở 80-90°C, có thể do sự biến đổi cấu trúc của protease, đặc biệt là cấu trúc của trung tâm hoạt động ở nhiệt độ cao.

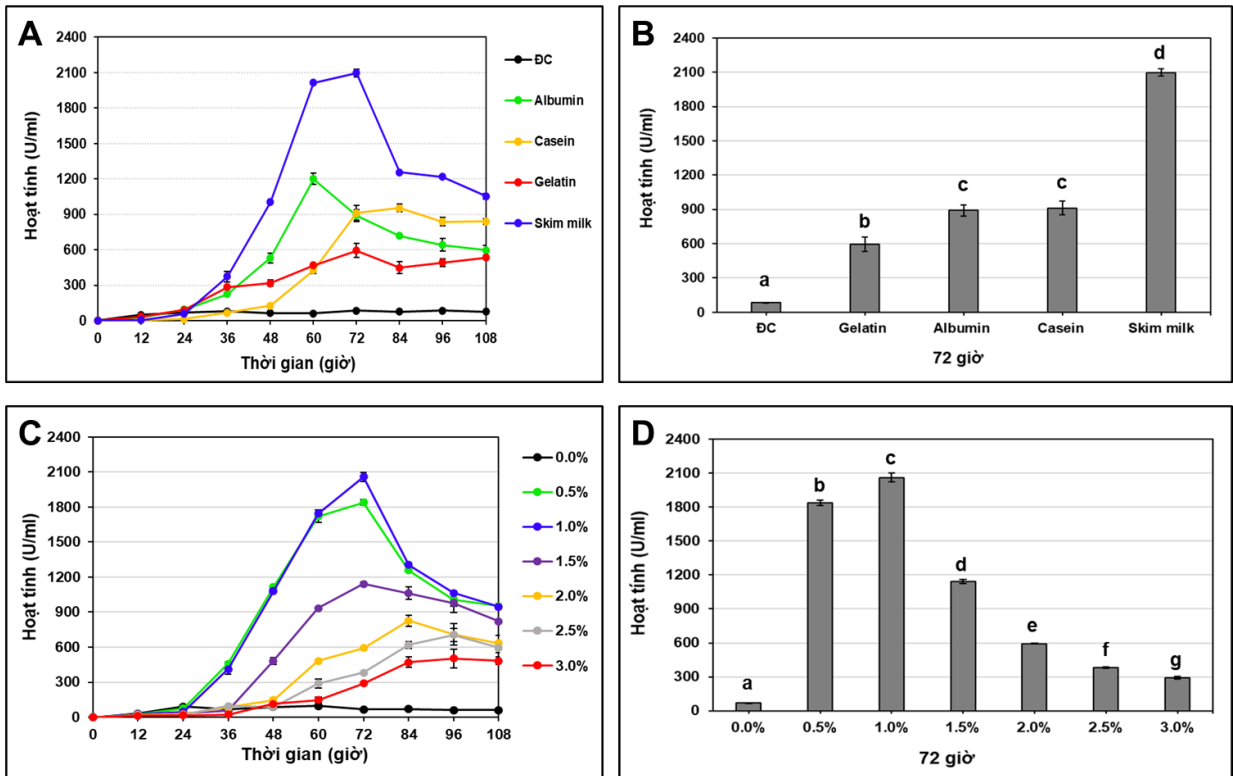


Hình 1: Hoạt tính protease của dịch nuôi cấy *Streptomyces* sp. CNXK100 ở các nhiệt độ khác nhau. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Protease được sinh tổng hợp từ *Streptomyces* sp. CNXK100 có nhiệt độ hoạt động cao hơn protease chịu nhiệt từ chủng *Streptomyces* sp. 594 trong nghiên cứu của Azeredo và cộng sự (2003) và protease từ *S. flavogriseus* HS1 trong nghiên cứu của Ghorbel và cộng sự (2014), khi các protease này chỉ có thể hoạt động ở nhiệt độ lên đến 70°C, cao nhất ở 50-55°C [27, 28], từ đó cho thấy ưu điểm và tiềm năng ứng dụng cao của protease được nghiên cứu. Ngoài ra, hoạt tính protease thể hiện tối ưu ở nhiệt độ cao có thể được giải thích nhờ vào thành phần amino acid như gia tăng proline và/hoặc giảm glycine, hoặc sự hiện diện số lượng lớn các liên kết cộng hoá trị và không cộng hoá trị; sự liên kết chặt chẽ giữa các tiểu phần hay sự làm giảm tính linh động của phân tử [29, 30].

3.2. Ảnh hưởng của chất cảm ứng và nồng độ chất cảm ứng lên sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt

Trong môi trường nuôi cấy không có sự hiện diện của chất cảm ứng (đối chứng), *Streptomyces* sp. CNXK100 hầu như không sinh tổng hợp protease. Trong môi trường bổ sung skim milk, dịch protease thô thể hiện hoạt tính cao nhất $2097,78 \pm 31,45$ U/ml. Ngược lại, albumin, casein và gelatin không phải là các nguồn chất cảm ứng thích hợp cho sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt từ *Streptomyces* sp. CNXK100 khi hoạt tính protease chỉ dao động trong khoảng $594,57 \pm 60,50$ U/ml đến $912,59 \pm 60,87$ U/ml (Hình 2A, B). Bên cạnh đó, sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt còn bị ảnh hưởng bởi nồng độ skim milk. Khi môi trường được bổ sung 1,0% skim milk, hoạt tính protease của dịch nuôi cấy thể hiện cao nhất ($2060,25 \pm 38,58$ U/ml) sau 72 giờ. Khi tiếp tục tăng nồng độ skim milk từ 1,5-3,0%, dịch protease thô thể hiện hoạt tính giảm dần với các giá trị được ghi nhận chỉ trong khoảng $289,38 \pm 12,01$ U/ml đến $1140,74 \pm 16,94$ U/ml (Hình 2C, D). Các kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Sarkar và cộng sự (2020) khi protease ưa kiềm chịu nhiệt từ *Streptomyces* sp. GS-1 cũng thể hiện hoạt tính cao trong môi trường có bổ sung 1,0% skim milk ($298 \pm 0,67$ U/ml) [13].

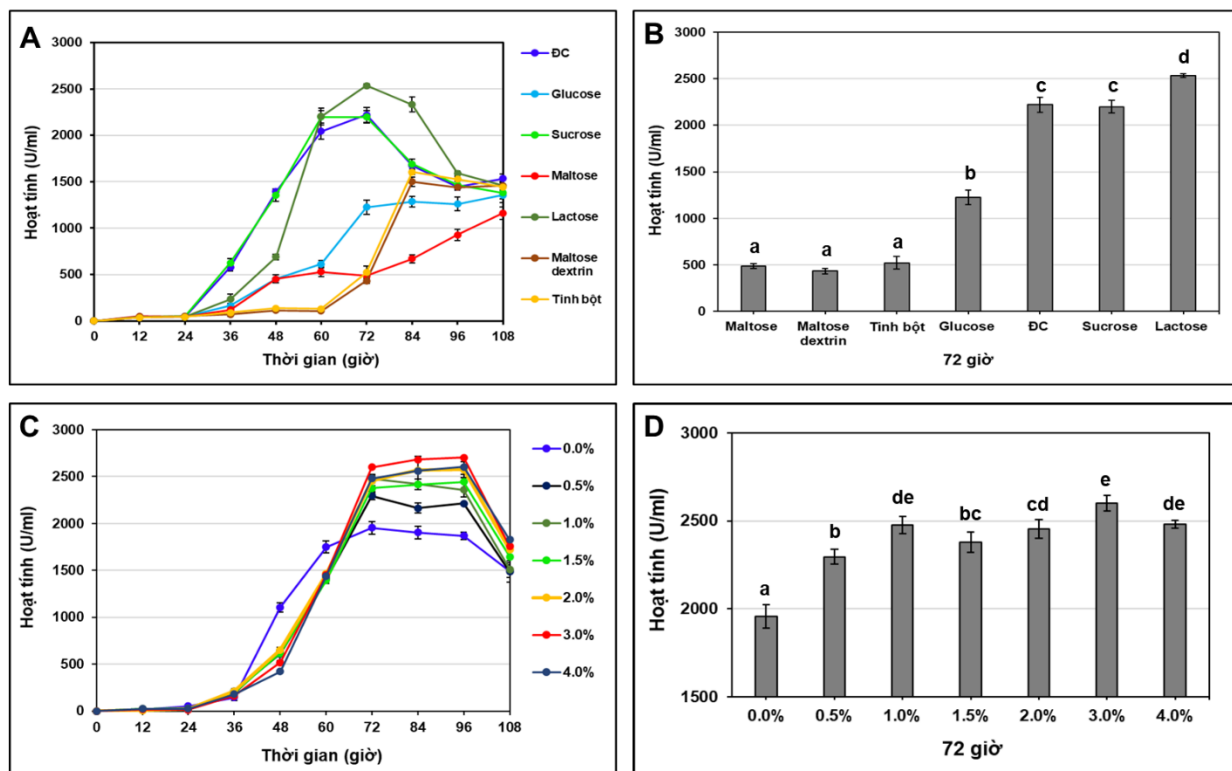


Hình 2: Ảnh hưởng của chất cảm ứng (A, B) và nồng độ skim milk (C, D) lên sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt của *Streptomyces* sp. CNXK100. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Tuy nhiên, so với skim milk, hoạt tính protease từ *Streptomyces* sp. GS-1 cao hơn trong môi trường có bổ sung 1,0% casein (324 U/ml) [13]. Tương tự, hoạt tính protease từ *Streptomyces* sp. trong nghiên cứu của Dhanaseeli và cộng sự (2014) cũng đạt cao nhất trong môi trường có bổ sung 0,2% casein (710 U/ml) [22].

3.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon và nồng độ carbon lên sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt

Ở thời điểm 72 giờ nuôi cấy trong môi trường Gause I cải tiến có bổ sung 1,0% skim milk và nguồn carbon là lactose, *Streptomyces* sp. CNXK100 sinh tổng hợp protease chịu nhiệt với hoạt tính cao nhất ($2534,32 \pm 18,16$ U/ml). Đồng thời, dịch protease thô thu nhận từ các môi trường bổ sung sucrose hay không bổ sung nguồn carbon đều thể hiện hoạt tính tương đối cao như nhau ($2198,52 \pm 66,56$ U/ml đến $2221,23 \pm 81,05$ U/ml). Sau 72 giờ, hoạt tính protease của dịch nuôi cấy của ba môi trường này đều giảm đáng kể (Hình 3A, B). Bên cạnh đó, khi nuôi cấy *Streptomyces* sp. CNXK100 trong các môi trường có bổ sung maltodextrin hay tinh bột, dịch nuôi cấy cho hoạt tính protease tương đương nhau ở thời điểm 84 giờ ($1603,29 \pm 28,41$ U/ml đến $1668,97 \pm 43,29$ U/ml). Các nguồn carbon: arabinose, glucose, maltose và glycerol hầu như không thích hợp cho sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt (Hình 3A, B). Khi càng kéo dài thời gian nuôi cấy, sự tích lũy các hợp chất có hại trong môi trường nuôi cấy có thể ảnh hưởng tiêu cực đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp protease. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Al-Dhabi và cộng sự (2020), khi dịch nuôi cấy của *Streptomyces* sp. Al-Dhabi 82 trong môi trường có bổ sung lactose thể hiện hoạt tính protease ($163 \pm 21,4$ U/ml) cao hơn so với môi trường có bổ sung các nguồn khác như fructose, tinh bột tan và trehalose [15]. Tuy nhiên, theo Suthindhiran và cộng sự (2013), protease chịu nhiệt từ *Streptomyces* sp. thể hiện hoạt tính cao nhất trong môi trường có bổ sung D-galactose (40 U/ml) so với các nguồn khác như L-arabinose, glucose, sucrose và glycerol [31].

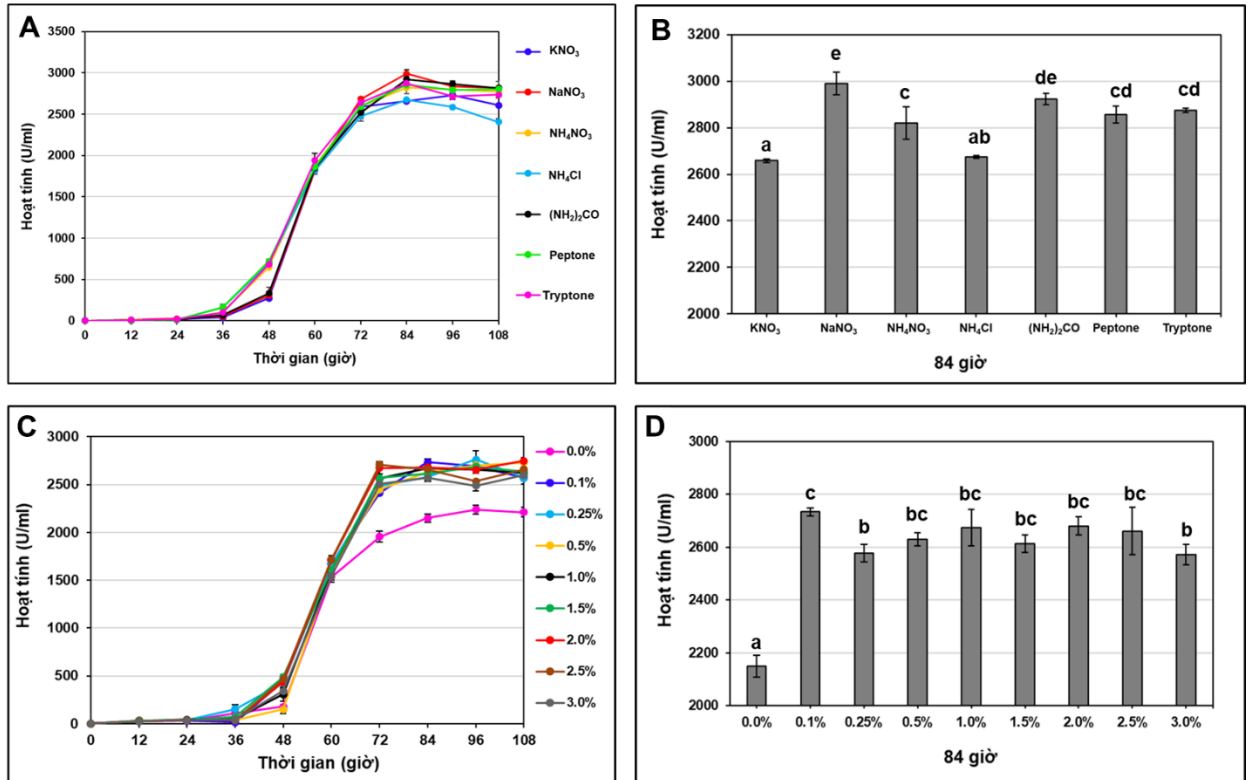


Hình 3: Ảnh hưởng của các nguồn carbon (A, B) và nồng độ lactose (C, D) lên sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt của *Streptomyces* sp. CNXK100. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Khi nuôi cấy *Streptomyces* sp. CNXK100 trong môi trường không bổ sung lactose, dịch nuôi cấy vẫn thể hiện hoạt tính protease, tuy nhiên giá trị hoạt tính tăng đáng kể khi môi trường được bổ sung 0,5-1,0% lactose (Hình 3C, D). Trong môi trường có bổ sung 1,0-5,0% lactose, dịch nuôi cấy *Streptomyces* sp. CNXK100 thể hiện hoạt tính protease cao nhất ($2324,0 \pm 51,74$ U/ml đến $2601,5 \pm 43,61$ U/ml) tại thời điểm 72 giờ và duy trì hoạt tính cao nhất đến 96 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, khi tiếp tục gia tăng thời gian nuôi cấy, hoạt tính protease giảm mạnh ở tất cả các nghiệm thức. Vì sự khác biệt không đáng kể về hoạt tính protease ở các môi trường có nồng độ lactose khác nhau, 1,0% lactose được xem là nồng độ hợp lý và kinh tế nhất. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Akhtar và cộng sự (2013) với protease ngoại bào chịu nhiệt thể hiện hoạt tính cao nhất khi chủng xạ khuẩn *S. aburaviensis* được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 1,5% lactose (571,27 U/ml) [20].

3.4. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen và nồng độ nitrogen lên sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt

Trong môi trường Gause I cải tiến có bổ sung 1,0% skim milk, 1,0% lactose và một trong các nguồn nitrogen là NaNO_3 , urea hay malt extract, ở thời điểm 84 giờ nuôi cấy, hoạt tính của dịch protease thô được ghi nhận là cao nhất ($2919,51 \pm 9,16$ U/ml đến $2990,62 \pm 48,95$ U/ml). Tuy nhiên, có thể thấy rằng dịch protease thô từ các nguồn nitrogen khác như KNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, peptone và tryptone đều thể hiện hoạt tính gần tương đương nhau và duy trì đến 108 giờ nuôi cấy ($2404,94 \pm 8,50$ U/ml đến $2802,96 \pm 2,42$ U/ml) (Hình 4A, B).

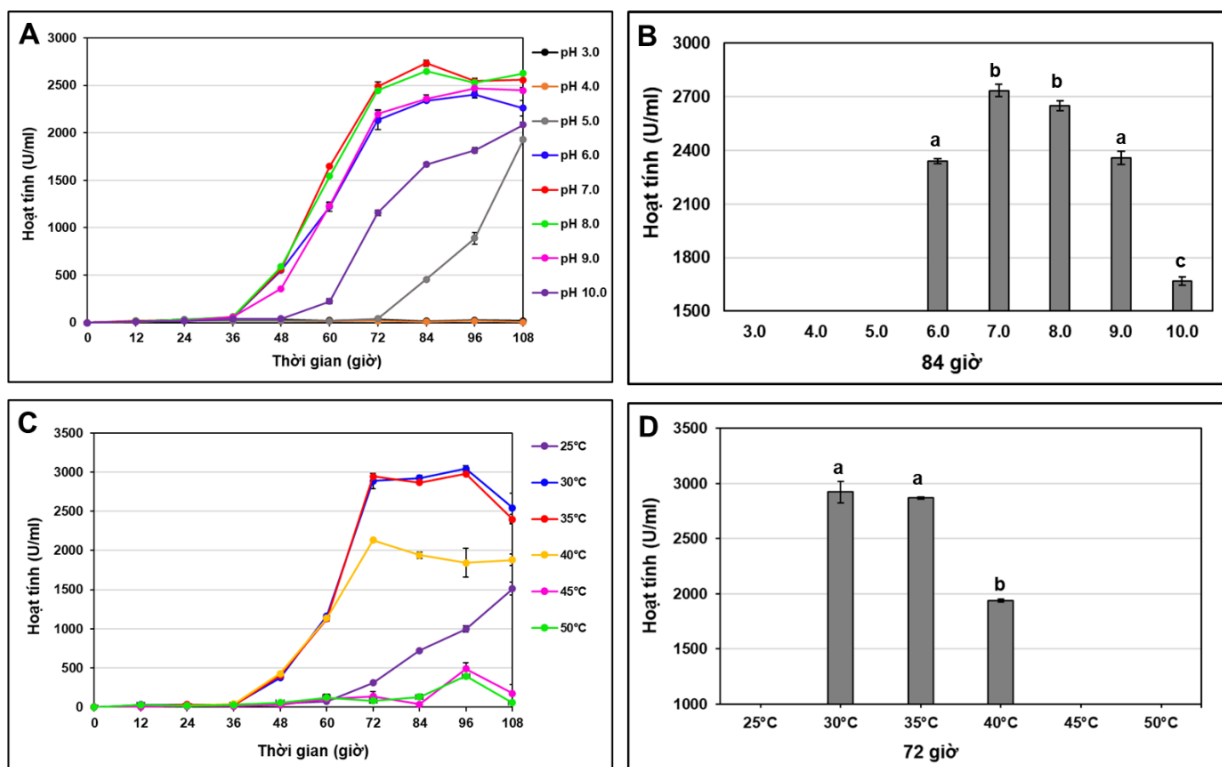


Hình 4: Ảnh hưởng của các nguồn nitrogen (A, B) và nồng độ NaNO₃ (C, D) lên sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt của *Streptomyces* sp. CNXK100. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$).

Thêm vào đó, hoạt tính của dịch nuôi cấy đạt cao nhất ở thời điểm 84 giờ khi môi trường được bổ sung 0,1% NaNO₃ ($2732,84 \pm 15,74$ U/ml) và được duy trì đến 108 giờ (Hình 4C, D). Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ NaNO₃ lên đến 3,0%, hoạt tính protease của dịch nuôi cấy thay đổi không đáng kể ($2570,86 \pm 38,58$ U/ml đến $2679,51 \pm 34,58$ U/ml). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của M. Parthasarathy và J. Joel Gnanadoss (2018), dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. LCJ12A cho hoạt tính protease cao nhất khi được bổ sung 0,2% NaNO₃ [32]. Tuy nhiên nguồn nitrgen vô cơ NaNO₃ lại cho hoạt tính protease của dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. LCJ1A thấp hơn so với các nguồn urea và peptone theo nghiên cứu của hợp với nghiên cứu của Dhavala Swarna và J. Joel Gnanadoss (2020) [33].

3.5. Ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu, nhiệt độ và thời gian lên men đến hoạt tính protease của dịch nuôi cấy *Streptomyces* sp. CNXK100

Có thể thấy rằng, pH môi trường ban đầu từ 6,0-9,0 là thích hợp cho sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt ở *Streptomyces* sp. CNXK100. Ở giá trị pH 7,0-8,0, dịch nuôi cấy thể hiện hoạt tính protease cao nhất trong khoảng $2650,85 \pm 28,04$ U/ml đến $2733,83 \pm 34,24$ U/ml sau 84 giờ. Sau 108 giờ nuôi cấy, hoạt tính protease chịu nhiệt thu nhận được ở pH 5,0 và pH 10,0 thể hiện hoạt tính tương đối cao nhưng vẫn chỉ đạt khoảng 77% so với pH 7,0 và pH 8,0. Trong khoảng pH 3,0-4,0, chủng *Streptomyces* sp. CNXK100 không có khả năng phát triển sinh khối cũng như sinh tổng hợp protease (Hình 5A, B). Vì vậy, pH 7,0 được lựa chọn để nghiên cứu sự ảnh hưởng của các mức nhiệt độ khác nhau lên hoạt tính của enzyme.



Hình 5: Ảnh hưởng của pH ban đầu (A, B) và nhiệt độ nuôi cấy (C, D) lên sự sinh tổng hợp protease chịu nhiệt của *Streptomyces* sp. CNXK100. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Sau 72 giờ nuôi cấy ở 30-35°C, hoạt tính của dịch protease thô thể hiện cao nhất trong khoảng 2887,90±97,80 U/ml đến 2943,21±12,18 U/ml, đồng thời được giữ ổn định đến 96 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, ở 40°C, hoạt tính protease chỉ đạt khoảng 74% so với 30-35°C. Trong điều kiện 45-50°C, *Streptomyces* sp. CNXK100 bị ức chế sinh trưởng cũng như khả năng sinh tổng hợp protease (Hình 5C, D).

Như vậy, khi nuôi cấy *Streptomyces* sp. CNXK100 trong môi trường có giá trị pH 7,0-8,0 trong khoảng nhiệt độ từ 30-35°C thì dịch enzyme thô thể hiện hoạt tính protease chịu nhiệt cao nhất khoảng 2943,21±12,18 U/ml chỉ sau 72 giờ nuôi cấy. Kết quả này có phần cao hơn so với nghiên cứu trong cùng điều kiện nuôi cấy của Dhanaseeli và cộng sự (2014) khi *Streptomyces* sp. thể hiện hoạt tính protease cao nhất chỉ 780 U/ml, ở 30°C, pH 7,0 với thời gian nuôi cấy lên đến 144 giờ [22].

4. KẾT LUẬN

Protease chịu nhiệt có nguồn gốc từ xạ khuẩn được chứng minh có khả năng hoạt động tốt trong khoảng nhiệt độ cao cũng như trong các điều kiện môi trường bất lợi, và do đó mang lại rất nhiều tiềm năng ứng dụng. Tuy nhiên, số lượng các nghiên cứu về protease chịu nhiệt từ xạ khuẩn vẫn còn rất hạn chế so với các nhóm vi khuẩn khác và vi nấm. Vì vậy, trong nghiên cứu này, dịch protease thô thu nhận từ *Streptomyces* sp. CNXK100 đã được nghiên cứu và chứng minh có khả năng xúc tác ở nhiệt độ cao từ 60-90°C, và cao nhất ở 75°C. Dịch protease thô thể hiện hoạt tính cao nhất sau 72 giờ nuôi cấy trong Gause I cải tiến có bổ sung 1,0% skim milk, 1,0% lactose, 0,1% NaNO₃, pH 7,0-8,0, lắc 150 vòng/phút ở 30-35°C. Kết quả nghiên cứu là tiền đề để thu nhận protease chịu nhiệt với số lượng lớn, hướng đến nghiên cứu tinh sạch và xác định các đặc tính hóa sinh của enzyme này, từ đó ứng dụng hiệu quả enzyme này vào các ngành công nghiệp thực tiễn.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu này là một phần trong đề tài nghiên cứu khoa học cấp Trường: “Khảo sát các điều kiện sinh tổng hợp protease ngoại bào chịu nhiệt từ *Streptomyces* sp. CNXK100”, mã số 22/2SHTP0. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Công nghiệp TP. Hồ Chí Minh đã cung cấp kinh phí và hỗ trợ điều kiện để các thí nghiệm trong đề tài nghiên cứu khoa học này được hoàn thành tốt đẹp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. A. d. L. Júnior, E. C. d. Sousa, T. H. B. d. Oliveira, R. C. F. d. Santana, S. K. R. d. Silva, and L. C. B. B. Coelho, "Genus *Streptomyces*: Recent advances for biotechnological purposes," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 70, no. 4, pp. 1-14, 2023.
- [2] Q. Li, X. Chen, Y. Jiang, and C. Jiang, "Morphological Identification of Actinobacteria," in *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, D. Dhanasekaran and Y. Jiang Eds.: IntechOpen, 2016.
- [3] E. A. Barka *et al.*, "Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 80, no. 1, pp. 1-43, 2015.
- [4] S. Mechri *et al.*, "A Taguchi design approach for the enhancement of a detergent- biocompatible alkaline thermostable protease production by *Streptomyces mutabilis* strain TN- X30," *Journal of Surfactants and Detergents*, vol. 25, no. 4, pp. 487-504, 2022.
- [5] P. Kämpfer and J. Liebig, "The Actinobacteria," in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, vol. 5, W. B. Whitman Ed.: Wiley, 2015.
- [6] M. Kumar, P. Kumar, P. Das, R. Solanki, and M. K. Kapur, "Potential applications of extracellular enzymes from *Streptomyces* spp. in various industries," *Archives of Microbiology*, vol. 202, pp. 1597-1615, 2020.
- [7] R. Sinha and S. K. Khare, "Thermostable Proteases," in *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*, T. Satyanarayana, J. Littlechild, and Y. Kawarabayasi Eds. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, pp. 859-880.
- [8] D. Prakash *et al.*, "Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource," *BioMed Research International*, vol. 2013, p. 264020, 2013.
- [9] Q. Qin, C. Tang, J. Wu, S. Chen, and Z. Yan, "A dual-functional aminopeptidase from *Streptomyces canus* T20 and its application in the preparation of small rice peptides," *International Journal Biological Macromolecules*, vol. 167, pp. 214-222, 2021.
- [10] D. S. Rathore and S. P. Singh, "Kinetics of growth and co-production of amylase and protease in novel marine Actinomycete, *Streptomyces lopnurensis* KaM5," *Folia microbiologica*, vol. 66, no. 3, pp. 303-316, 2021.
- [11] T. Fujii *et al.*, "A new serine protease family with elastase activity is produced by *Streptomyces* bacteria," *Microbiology*, vol. 166, no. 3, pp. 253-261, 2020.
- [12] Z. W. Li *et al.*, "The feather degradation mechanisms of a new *Streptomyces* sp. isolate SCUT-3," *Communications biology*, vol. 3, no. 1, p. 191, 2020.
- [13] G. Sarkar and S. K. "Extraction and characterization of alkaline protease from *Streptomyces* sp. GS-1 and its application as dehairing agent," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 25, pp. 1-9, 2020.
- [14] P. Song *et al.*, "Microbial proteases and their applications," *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, 2023.
- [15] N. A. Al-Dhabi, G. A. Esmail, A.-K. M. Ghilan, M. V. Arasu, V. Duraipandiyar, and K. Ponmurugan, "Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications," *Journal of King Saud University - Science*, vol. 32, no. 1, pp. 1258-1264, 2020.
- [16] D. Duraikannu and S. D. Chandrasekaran, "Optimization and modeling studies on the production of a new fibrinolytic protease using *Streptomyces radiopugnans*_VITSD8," *Frontiers in Biology*, vol. 13, no. 1, pp. 70-77, 2018.
- [17] 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.
- [18] T. D. H. Nguyễn, T. C. Hứa, B. N. Đặng, T. T. T. Nguyễn, N. A. Nguyễn, and T. V. Phạm, "Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng sinh các hợp chất có hoạt tính cao," *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường Đại học Công nghiệp TP. Hồ Chí Minh*, vol. 53B, pp. 58-67, 2021.
- [19] M. L. Anson, "The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin," *The Journal of General Physiology*, vol. 22, no. 1, pp. 79-89, 1938.
- [20] N. Akhtar, A. S. M. Mahmud, M. S. Khan, T. Taznin, M. E. Haque, and S. Sultana, "Effects of Cultural Conditions on the Production of Extracellular Protease by *Streptomyces albolongus* and *Streptomyces aburaviensis*," *Enzyme Engineering*, vol. 2, no. 2, pp. 1-5, 2013.
- [21] H.-C. G. Daniela, M.-E. Angélica, and E.-M. Zahaed, "Influence of Carbon Source on Extracellular Protease Production by Soil *Streptomyces* sp. Ags-10," *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 9, no. 2, pp. 236-241, 2019.
- [22] P. B. Dhanaseeli and V. Balasubramanian, "Screening, Production and Optimization of Protease Enzyme from *Streptomyces* Species," *Biosciences Biotechnology Research Asia*, vol. 11, pp. 369-376, 2014.
- [23] T. T. N. Phạm, H. H. Vũ, T. G. Huỳnh, and N. Ú. Vũ, "Tối ưu các điều kiện sinh enzyme protease ngoại bào của vi khuẩn *Streptomyces* DH3.4," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 57, no. 4, pp. 186-193, 2021.

- [24] B. Asha and M. Palaniswamy, "Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT1 isolated from soil," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 8, no. 2, pp. 119-127, 2018.
- [25] N. A. M. Abdelwahed, E. N. Dania, N. A. Naggar, and A. A. Mohamed, "Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces ambofaciens* in free and immobilized form," *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, vol. 10, no. 1, pp. 1-13, 2014.
- [26] D. S. Ningthoujam, P. Kshetri, S. Sanasam, and S. Nimaichand, "Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous *Actinomycetes*," *World Applied Sciences Journal*, vol. 7, no. 7, pp. 907-916, 2009.
- [27] L. A. I. D. Azeredo, D. M. G. Freire, R. Soares, S. Leite, and R. R. R. Coelho, "Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 34, no. 3-4, pp. 354-358, 2004.
- [28] S. Ghorbel, M. Kammoun, H. Soltana, Moncef Nasri, and N. Hmidet, "*Streptomyces flavogriseus* HS1: isolation and characterization of extracellular proteases and their compatibility with laundry detergents," *BioMed Research International*, vol. 2014, p. 345980, 2014.
- [29] Z. Xu, Y.-K. Cen, S.-P. Zou, Y.-P. Xue, and Y.-G. Zheng, "Recent advances in the improvement of enzyme thermostability by structure modification," *Critical reviews in biotechnology*, vol. 40, no. 1, pp. 83-98, 2020.
- [30] H. Miao, X. Xiang, N. Han, Q. Wu, and Z. Huang, "Improving the Thermostability of Serine Protease PB92 from *Bacillus alcalophilus* via Site-Directed Mutagenesis Based on Semi-Rational Design," *Foods*, vol. 12, no. 16, p. 3081, 2023.
- [31] K. Suthindhiran, M. A. Jayasri, D. Dipali, and A. Prasar, "Screening and characterization of protease producing *Actinomycetes* from marine saltern," *Journal of Basic Microbiology*, vol. 54, no. 10, pp. 1098-1109, 2014.
- [32] P. M and J. J. Gnanadoss, "Medium formulation and its optimization to enhance protease production by *Streptomyces* sp. isolated from mangroves," *Biosciences Biotechnology Research Asia*, vol. 15, no. 3, pp. 719-728, 2018.
- [33] D. Swarna and J. J. Gnanadoss, "Optimization of protease production by *Streptomyces* sp. LCJ1A using response surface methodology," *International Journal of Life Science and Pharma Research*, vol. 11, pp. 218-232, 2021.

EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON PRODUCTION OF THERMOSTABLE EXTRACELLULAR PROTEASE FROM *Streptomyces* sp. CNXK100

NGOC AN NGUYEN¹, TRUONG CHINH HUA², TAN VIET PHAM^{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*

⁶*Vietnam National University*

**phamtanviet@iuh.edu.vn*

Abstract. Thermostable proteases are widely used in various industrial applications because of their high catalytic activity at high temperatures. In recent years, more and more studies on actinomycetes-derived thermostable proteases have been done to explore their remarkable biological characteristics such as thermostability, ability to catalyze in extreme pH, and in presence of inhibitors. In this study, extracellular protease from *Streptomyces* sp. CNXK100 was proved to display highest activity at 75°C. Cell-free culture of *Streptomyces* sp. CNXK100 shown the highest of proteolytic activity (2943.21±12.1 U/ml) when this strain was cultured in modified Gause I medium supplemented with 1.0% skim milk, 1.0% lactose, and 0.1% NaNO₃ under shaking conditions at 150 rpm at 30-35°C, initial medium pH 7.0-8.0. With defined culture conditions, thermostable protease from *Streptomyces* sp. CNXK100 will be subsequently used for many potential applications in industries.

Keywords: Actinomycetes, culture condition, extracellular enzyme, *Streptomyces*, thermostable protease

Ngày gửi bài: 21/06/2023

Ngày chấp nhận đăng: 30/10/2023