

SÀNG LỌC, THU NHẬN VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH LIPASE TỪ *BACILLUS*

Trần Đăng Khoa, Lê Quang Huy, Ngô Đại Nghiệp

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 18 tháng 11 năm 2011)

TÓM TẮT: Nghiên cứu với mục tiêu chọn lọc chủng *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp lipase cao; từ 10 chủng *Bacillus*, chúng tôi chọn được chủng *Bacillus subtilis* OII (BS7) sinh lipase cao nhất ở $pH = 7,0$; nồng độ cơ chất 1,2% sau 3 ngày nuôi cấy. Chế phẩm lipase thu nhận được có $pH_{opt} 10,0$; $t_{opt} 60^{\circ}C$. Ion Mg^{2+} , Ca^{2+} là hai ion giữ hoạt tính; ion bất hoạt là Zn^{2+} , Cu^{2+} ; SDS 0,2% làm giảm 95% hoạt tính lipase. Chúng tôi tinh sạch được lipase của BS7 có trọng lượng phân tử khoảng 23,8 kDa. Những kết quả trên là cơ sở cho việc tạo ra lipase tái tổ hợp từ *Bacillus subtilis* OII.

Từ khóa: *Bacillus*, lipase, tinh sạch.

GIỚI THIỆU

Lipase (EC 3.1.1.3) thuộc nhóm phụ enzyme thủy phân có serine ở trung tâm hoạt động của tổng hợp thủy phân α/β , xúc tác cho nhiều phản ứng khác nhau: thủy phân các liên kết carboxylester trong glyceride, chuyển ester hóa. Trong môi trường khan nước lipase có khả năng ester hóa rượu, đường, thiol và amin tạo những ester có cấu trúc lập thể đặc trưng [4, 10]. Ngoài ra, lipase hiện diện rộng rãi và tham gia vào sự chuyển hóa sinh học của lipid trong tự nhiên.

Trong những năm gần đây, lipase giữ một vị trí quan trọng trên thị trường enzyme thương mại do khả năng xúc tác các phản ứng bề mặt phân cách giữa pha nước và các pha khác ở điều kiện bình thường và không tạo ra sản phẩm phụ. Lipase chiếm 5% thị trường enzyme thương mại, chỉ sau protease và carbohydratase [10]. Chúng được sử dụng trong công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa, thực phẩm, mỹ phẩm, y

học, nhiên liệu sinh học, xử lý môi trường và các chế phẩm sinh học khác [8].

Lipase có thể thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau như động vật, thực vật hay vi sinh vật. Nguồn thu nhận từ vi sinh vật được quan tâm nhiều nhất do điều kiện sản xuất, thu nhận dễ dàng. Các vi sinh vật thường được sử dụng như *Rhizopus*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Aspergillus*, *Bacillus*... [4]

Sử dụng enzyme trong các ngành công nghiệp, y dược, ... đang là xu hướng chung của cả thế giới. Ở nước ta, enzyme chủ yếu được nhập khẩu từ nước ngoài với chi phí cao, trong đó lipase là một loại enzyme có giá thành cao và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau [8]. Vì vậy, việc nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp, thu nhận lipase có hoạt tính cao và tinh sạch từ vi sinh vật là rất cần thiết giúp Việt Nam có khả năng sản xuất lipase với giá thành rẻ, chất lượng cao mang lại hiệu quả cho ngân sách nhà nước. Bên cạnh đó, vi khuẩn *Bacillus* với khả năng thích nghi cao, một số

loài sinh lipase có thể chịu nhiệt, chịu kiềm, hứa hẹn ứng dụng trong một số lĩnh vực đòi hỏi điều kiện khó khăn, khắc nghiệt.

VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi sinh vật: 10 chủng *Bacillus* do phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh hóa – Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Tp. HCM cung cấp, kí hiệu: BST1, BST2, BS3, BS6, BS7, B1, Ba1, BL1, BL2, BL141

Hóa chất: Dầu olive sử dụng để xác định hoạt tính lipase của hãng Fragata (Tây Ban Nha).

Phương pháp

Chọn lọc chủng có khả năng sinh lipase cao: Chọn nhanh chủng sinh lipase cao bằng so sánh vòng phân giải [3].

Phương pháp xác định hoạt tính lipase: Hoạt tính enzyme lipase được xác định dựa trên phương pháp của Nobuhiro Watanabe (1977) [6]. Một đơn vị hoạt tính của lipase được định

nghĩa là số μmol acid béo được sinh ra trong 1 phút [6, 7].

Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy, pH môi trường, nồng độ cơ chất đến khả năng sinh tổng hợp lipase.

Phương pháp khảo sát các đặc tính của lipase: pH hoạt động, độ bền, nhiệt độ hoạt động, ảnh hưởng của một số ion, khả năng cắt đặc hiệu.

Phương pháp tinh sạch lipase bằng sắc ký lọc gel Sephadex G – 75, kiểm tra độ tinh sạch bằng điện di SDS - PAGE [1].

3. KẾT QUẢ – THẢO LUẬN

Chọn lọc chủng sinh tổng hợp lipase cao

Từ 10 chủng *Bacillus*, bằng phương pháp nuôi cấy trên đĩa thạch với cơ chất là tributyrin 0,1% và phương pháp đục lỗ thạch có bổ sung chất phát huỳnh quang rhodamine B 0,001% chúng tôi chọn được 7 chủng có vòng phân giải lớn là: B1, Ba1, BL1, BL2, BST1, BST2, BS7.

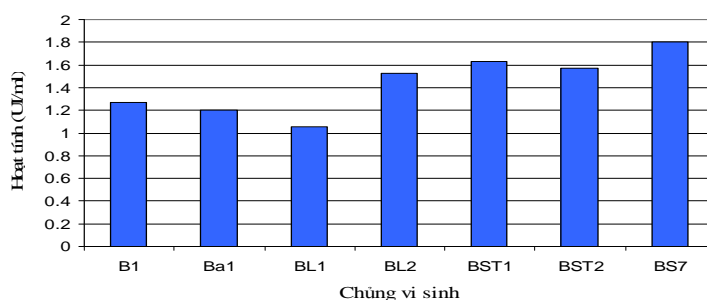
Bảng 3.1. Kết quả chọn lọc sơ bộ bằng tributyrin 0,1% và rhodamine B 0,001%

Chủng	B1	Ba1	BL1	BL2	BL141	BST1	BST2	BS3	BS6	BS7
Tributyrin	+++	++++	++	+++	-	+++	+++	-	+	++++
Rhodamine B	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+

Chú thích: “+” dương tính; “-” âm tính; số lượng dấu “+” tỉ lệ với độ lớn vòng phân giải

7 chủng được nuôi cấy lỏng trong môi trường cảm ứng sinh lipase. Hoạt tính lipase được xác

định để chọn chủng có hoạt tính lipase cao nhất.

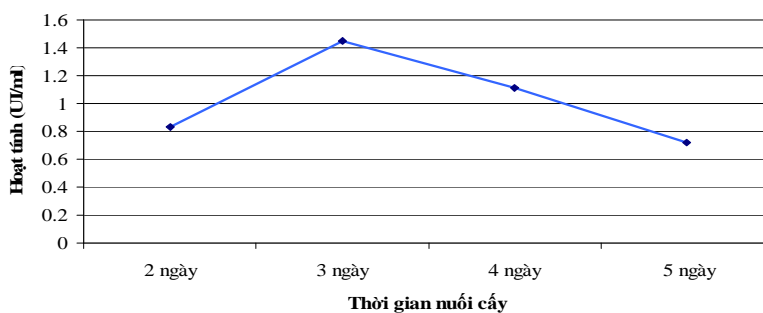


Hình 1. Hoạt tính lipase của 7 chủng *Bacillus*

Kết quả ở Hình 1 cho thấy, chủng BS7 có hoạt tính lipase cao nhất là 1,8 UI/ml. Như vậy, chúng tôi chọn chủng BS7 – *Bacillus subtilis* OII để tiến hành các khảo sát tiếp theo.

Khảo sát thời gian nuôi cấy chủng BS7

Nuôi cấy chủng BS7 trong môi trường sinh tổng hợp lipase. Xác định hoạt tính sau 2, 3, 4, 5 ngày nuôi cấy.

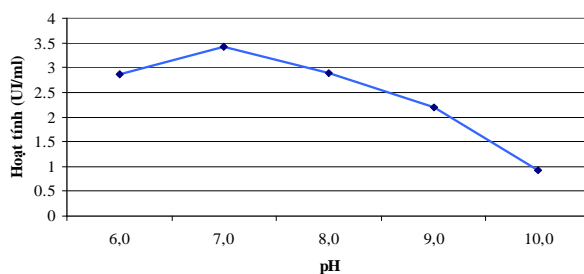


Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp lipase

Qua Hình 2 nhận thấy, hoạt tính lipase tăng từ ngày thứ 2 cho đến ngày thứ 3 và đạt giá trị cao nhất ở 3 ngày nuôi cấy. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Senthilkumar R và cộng sự (2008) [11].

Khảo sát pH môi trường nuôi cấy chủng BS7

pH môi trường là một thông số quan trọng có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt động biến dưỡng của vi sinh vật.

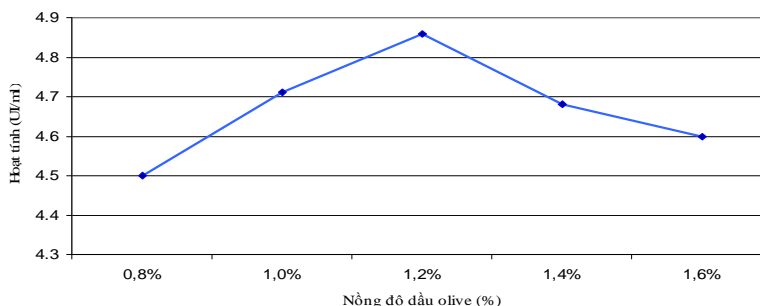


Hình 3. Ảnh hưởng pH lên khả năng sinh tổng hợp lipase

Từ kết quả trong Hình 3 cho thấy BS7 có khả năng sinh tổng hợp lipase ở pH 6,0 đến 8,0; ở pH 7,0, lipase được tạo ra có hoạt tính cao nhất.

Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Sangeetha R và cộng sự (2008) [9].

Khảo sát nồng độ cơ chất ảnh hưởng sinh tổng hợp lipase

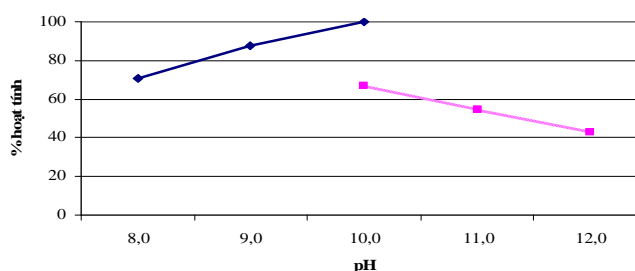


Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ dầu olive lên khả năng sinh tổng hợp lipase

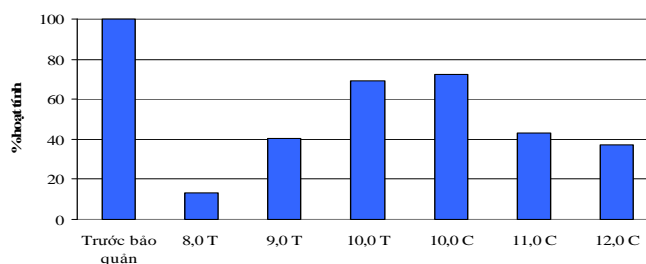
Hình 4 cho thấy khả năng sinh tổng hợp lipase tốt nhất ở nồng độ dầu olive từ 1,0 – 1,2 %. Kết quả của chúng tôi thu được tương tự với

nghiên cứu của Wang và cộng sự (1995), tác giả sử dụng với nồng độ dầu olive là 1,0 % để nuôi cấy chủng *Bacillus* A30-1 [8].

Khảo sát ảnh hưởng của pH lên hoạt tính và độ bền chế phẩm lipase



Hình 5. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính chế phẩm lipase (♦: đệm Tris –Cl; ■: đệm carbonate)



Hình 6. Ảnh hưởng của pH đến độ bền của chế phẩm lipase (T: đệm Tris –Cl; C: đệm carbonate)

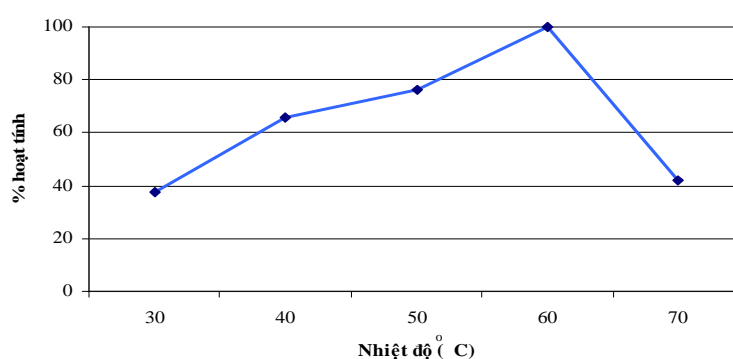
Kết quả ở Hình 5 cho thấy chế phẩm lipase thu nhận từ BS7 hoạt động thích hợp ở pH 10,0 ở đệm Tris – Cl và đệm carbonate. Như vậy lipase thu nhận từ BS7 là lipase kiềm, phù hợp với đặc tính lipase của *Bacillus subtilis* được công bố bởi Gertie van Pouderoyen và cộng sự (2001) [2].

Tương tự từ Hình 6 cho thấy chế phẩm lipase của BS7 giữ được hoạt tính cao nhất sau 24 giờ bảo quản trong dung dịch đệm pH 10,0 ở 4°C.

Đệm Tris – Cl ở pH 10,0 và đệm carbonate ở pH 10,0 giữ được hoạt tính gần như nhau.

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của chế phẩm lipase

Nhiệt độ cũng là một thông số quan trọng ảnh hưởng đến vận tốc phản ứng của enzyme. Khi nhiệt độ tăng lên sẽ dẫn đến vận tốc phản ứng enzyme tăng, nhưng đến một mức nào đó nhiệt độ tăng sẽ ức chế hoạt động của enzyme và có thể bất hoạt enzyme.

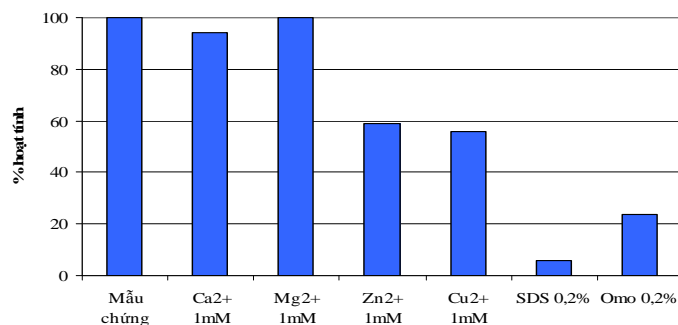


Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính chế phẩm lipase

Qua Hình 7 cho thấy chế phẩm lipase của BS7 có thể hoạt động ở nhiệt độ 50 – 60 °C, t_{opt} là 60 °C. Kết quả tương tự với kết quả của Wang và cộng sự (1995) khi nghiên cứu lipase của chủng *Bacillus* sp. A 30 – 1 có t_{opt} là 60 °C [8].

Khảo sát ảnh hưởng của một số ion kim loại và chất tẩy rửa đến hoạt tính của chế phẩm lipase

Lipase được ứng dụng nhiều trong ngành công nghiệp sản xuất bột giặt, chất tẩy nên khả năng giữ được hoạt tính khi có mặt các ion và chất tẩy rửa trong hỗn hợp rất quan trọng. Tùy vào nồng độ và loại ion, chất tẩy khác nhau mà sẽ làm tăng, giữ tốt hoạt tính hay giảm.



Hình 8. Ảnh hưởng của ion và chất tẩy rửa lên hoạt tính chế phẩm lipase

Sau khi ủ 1 giờ ở 4°C với các tác nhân trên, chế phẩm lipase từ chủng BS7 bị kìm hãm đối với ion Zn²⁺ và Cu²⁺. Các ion Ca²⁺ và Mg²⁺ hầu như không ảnh hưởng đến hoạt tính, ion Mg²⁺ giữ được hoạt tính tốt nhất. Dung dịch SDS 0,2% làm giảm gần 95% hoạt tính, bột giặt Omo 0,2% làm hoạt tính giảm 76,57%.

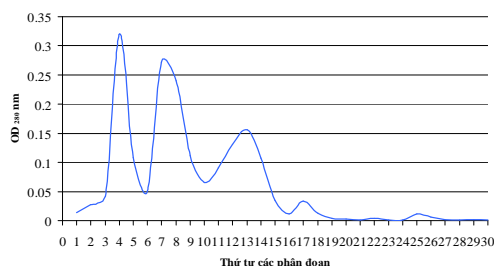
Khả năng cắt đặc hiệu của chế phẩm lipase thu nhận từ BS7

Sau khi thực hiện phản ứng chuyển ester hóa, chúng tôi tiến hành sắc ký khí GC – MS, kết quả hàm lượng alkyl ester của acid béo là 4,948

%; 2-monoglyceride là 24,561%, không phát hiện 1-monoglyceride và diglyceride; các chất khác là 66,408 % (triglyceride, dẫn xuất cholesterol, các ester khác). Từ kết quả thu được, có thể kết luận chế phẩm lipase thu nhận từ BS7 có vị trí cắt đặc hiệu là 1 và 3 trên phân tử triglyceride, điều này phù hợp với nghiên cứu của Gertie van Pouderooyen và cộng sự (2001) [2].

Tinh sạch lipase bằng phương pháp lọc gel Sephadex G-75

Kết quả đo OD₂₈₀ được ghi nhận ở Hình 9.



Hình 9. Sắc ký đồ biểu diễn các phân đoạn lọc gel Sephadex G - 75

Sau lọc gel Sephadex chúng tôi thu được 3 peak: peak 1 không có hoạt tính; peak 2 có hoạt tính riêng 1,07 UI/mg Pr; peak 3 có hoạt tính riêng cao nhất đạt 35,57 UI/mg Pr. Hiệu suất

thu nhận protein sau khi lọc gel là 88,53%; tổng hoạt tính lipase thu lại sau khi lọc gel đạt 48,54%. Hoạt tính riêng lipase của peak 3 cao

hơn hoạt tính riêng lipase trước khi lọc gel gần 6 lần.

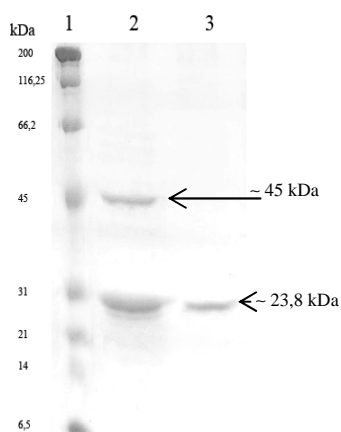
Kiểm tra độ tinh sạch của enzyme sau khi lọc gel bằng điện di SDS – PAGE

Chúng tôi tiến hành tủa protein ở peak 3, ly tâm thu lấy tủa, rửa tủa, hòa lại trong nước cất hai lần rồi tiến hành chạy điện di SDS – PAGE. Kết quả điện di được trình bày ở Hình 10, nhận thấy rằng:

Ở giếng 2 có 2 vạch đậm và 1 số vạch mờ. Vậy mẫu chế phẩm lipase trước khi lọc gel Sephadex G-75 có nhiều loại protein. Giếng 3

có 1 vạch, protein có trọng lượng phân tử khoảng 23,8 kDa.

Vậy chúng tôi đã tinh sạch được enzyme lipase thu nhận từ chủng *Bacillus subtilis* OII có trọng lượng phân tử khoảng 23,8 kDa. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Jisheng Ma và cộng sự (2006) đã tinh sạch được lipase từ chủng *Bacillus subtilis* IFFI10210 với trọng lượng phân tử là 24 kDa [5].



Hình 10. Kết quả chạy điện di SDS – PAGE
Giếng 1: thang chuẩn protein
Giếng 2: chế phẩm lipase trước khi tinh sạch
Giếng 3: protein ở peak 3

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã chọn lọc được chủng BS7 (*Bacillus subtilis* OII) có khả năng sinh tổng hợp lipase cao trong các chủng khảo sát (4,86 UI/ml). Điều kiện cho BS7 tổng hợp nhiều lipase là pH 7,0; 1,2% dầu olive nhũ hóa; sau 3

ngày nuôi cấy. Chế phẩm lipase thu nhận từ BS7 có khả năng chịu kiềm (pH_{opt} 10,0), chịu nhiệt (t_{opt} 60°C), có vị trí cắt 1 và 3 trên phân tử triglyceride. Trọng lượng phân tử lipase thu nhận được khoảng 23,8 kDa.

SELECTION, PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF *BACILLUS* LIPASE

Tran Dang Khoa, Le Quang Huy, Ngo Dai Nghiep

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: The objective of this study is to screen *Bacillus* strains for high lipase production; from 10 strains of *Bacillus subtilis* OII (BS7) has ability the best lipase production. The maximum lipase was carried out using liquid culture medium at pH 7,0, substrate concentrations 1,2% (w/w) after 3 days. The optimum pH and temperature on lipase activity were found to be pH 10,0 and 60 °C respectively. Ion Mn^{2+} , Ca^{2+} are the ions remain activity; active lipase was inhibited by Cu^{2+} , Zn^{2+} ; solution of SDS 0,2 % decreases 95% activity. Molecular weight of lipase production by BS7 is approximate 23,8kDa. The results are preconditions for the research on recombinant lipase by *Bacillus subtilis* OII.

Key words: *Bacillus*, lipase, purification.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phạm Thị Ánh Hồng, *Kỹ thuật sinh hóa*, NXB ĐHQG TP.HCM (2003).
- [2]. Gertie V P, Thorsten E, Karl-Erich J and Bauke W D, The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme, *J. Mol. Biol*, 309: 215 – 226 (2001).
- [3]. Gisela K and Karl-Erich J, Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases, *Applied and Environmental Microbiology*: 211 – 213 (1987).
- [4]. Hansan F, Ali S A, Hameed A, Industrial application of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (2): 235 – 251 (2006).
- [5]. Jisheng M, Zuoming Z, Baijing W, Xiangju K, Yuguo W, Shugui C, Yan F, Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*, *Protein Expression and Purification*, 45: 22 – 29 (2006).
- [6]. Nobuhiro W, Yasuhide O, Yasuji M and Koichi Y, Isolation and Identification of Alkaline Lipase Producing Microorganisms, Cultural Conditions and Some Properties of Crude Enzymes, *Agricultural and Biological Chemistry*, 41 (8): 1353 – 1538 (1977).
- [7]. Praphan P and Kirk L P, *Lipase Assays – Food Analytical Chemical*, C3.1.1 – C3.1.13 (2001).
- [8]. Rohit S, Yusuf C, Uttam C B, Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, 19: 627–662 (2001).
- [9]. Sangeetha R, Geetha A and Arulpandi I, Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2

- isolated from an industrial effluent, *The Internet Journal of Microbiology*, Volume 5, Number 2 (2008).
- [10]. Saxena R K, Ghosh P K, Rani G, Sheba D W, Sapna B and Ruchi G, Microbial lipase: Potential biocatalysts for the future industry, *Current Science*, 77(1): 101 – 115 (1999).
- [11]. Senthilkumar R and Selvakumar G, Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase Producing *Bacillus* sp. SS-1 from Slaughterhouse Soil, *Advanced Biotech*, 24 – 25 (2008).