TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH ENZYME CELLULASE THU NHẬN TỪ *Bacillus* sp. M5

Trịnh Thị Thu Thủy[1], Nguyễn Thị Thanh Thủy[2*], Nguyễn Thị Lâm Đoàn[2], Hoàng Thị Ngọc[1]

[1]Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[2]Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

[*]Tác giả liên hệ: nttthuycntp@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 20.06.2018 Ngày chấp nhận đăng: 28.11.2018

TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn *Bacillus* M5 có khả năng sinh tổng hợp cellulase đã được nuôi cấy để thu dịch enzyme với mục đích tinh sạch và khảo sát một số đặc tính của cellulase thu nhận từ chủng này. Dịch enzyme thô được thu nhận bằng cách ly tâm và kết tủa bằng dung môi hữu cơ sau đó hòa tan để thu chế phẩm kỹ thuật. Để khảo sát một số đặc tính enzyme về nhiệt độ, pH tối ưu cũng như độ bền nhiệt, bền pH và ảnh hưởng của một số ion kim loại, enzyme kỹ thuật được xử lý trong các điều kiện khác nhau. Kết quả cho thấy cellulase thu nhận từ chủng *Bacillus* M5 hoạt động ở nhiệt độ tối ưu 65°C; pH tối ưu 5,5; bền nhiệt ở khoảng 50°C hoạt độ còn lại 53% sau 120 phút; bền pH trong khoảng từ 6,0 đến 6,5; các ion kim loại Ca^{2+} và Mg^{2+} làm tăng hoạt độ enzyme còn ion Zn^{2+} làm hoạt độ enzyme giảm. Enzyme thu được có khối lượng phân tử là 45 kDa.

Từ khóa: *Bacillus* sp. M5, cellulase, đặc tính enzyme, tinh sạch.

Purification and Characterization of Cellulase from *Bacillus* sp. M5 Strain

ABSTRACT

The objective of the present study was to purify and determine the properties (optimal temperature, heat stability, optimal pH, pH stability, effects of metal ions) of cellulase derived from Bacillus sp. M5 strain. The crude enzyme produced from the culture of cellulase-producing bacillus M5 strain was collected by centrifugation and precipitated for purification and characterization. To investigate the enzyme's characteristics on optimal temperature, pH as well as heat stability, pH stability and the effect of certain metal ions, the enzyme fluid was treated under different conditions. The enzyme was disolved in acetate buffer pH 5.50 mM to determine enzyme activity. Results showed that the cellulase from Bacillus M5 strain was active at an optimal temperature of 65°C; optimal pH of 5.5; heat stability at about 50°C (activity remains 53% after 120 minutes); pH of 6.0 to 6.5. Ca^{2+} and Mg^{2+} metal ions increased enzyme activity and Zn^{2+} ion decreased enzyme activity. The enzyme had the molecular weight of 45 kDa.

Keywords: *Bacillus* sp. M5, cellulase, purification, enzyme characterization.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cellulase là hệ enzyme xúc tác chuyển hóa cellulose thành các sản phẩm hòa tan thông qua sự cắt đứt các liên kết β-1,4-glucoside. Cellulase giúp tăng sản lượng dịch quả khi ép, cải thiện chất lượng và năng suất trong lên men bia và rượu vang (Ramesh *et al.,* 2011), tăng khả năng hấp thu và chuyển hóa thức ăn khi bổ sung cellulase vào thức ăn vật nuôi (Đặng Thị Thu và cs., 2004), cải thiện chất lượng đất nông nghiệp (Ramesh *et al.*, 2011).

Cellulase phân bố rộng rãi trong tự nhiên, có thể thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau như động vật, thực vật và vi sinh vật (Watanabe & Tokuda, 2001). Tuy nhiên, enzyme từ động vật và thực vật thường không được sử dụng nhiều bởi quá trình thu nhận và bảo quản phức tạp.

Nguồn thu cellulase phong phú và hiệu quả nhất là từ vi sinh vật.

Trên thế giới cũng như ở Việt Nam đã tìm được nhiều chủng vi khuẩn có khả năng sinh cellulase như *Bacillus megaterium, Cellulomonas flavigena* (Võ Văn Phước Quệ và Cao Ngọc Điệp, 2011) *Bacillus subtilis, Clostridium butyricum, Bacillus pumilis* (Nguyễn Đức Lượng, 2004; Ariffin *et al*., 2006), *Bacillus licheniformis* (Aygan *et al*., 2011). Tuy nhiên, enzyme từ mỗi chủng vi khuẩn lại có đặc tính khác nhau để phù hợp ứng dụng trong lĩnh vực khác nhau. Do đó, để đưa enzyme vào ứng dụng trong quy mô công nghiệp thì enzyme cần phải có các đặc tính tốt đáp ứng được yêu cầu trong sản xuất. Chủng *Bacillus* M5 được xác định có khả năng sinh cellulase đặc hiệu với cơ chất CMC cao (Sam & Nguyen, 2017). Mục tiêu của nghiên cứu là sau khi tinh sạch enzyme sẽ xác định một số đặc tính của chúng (nhiệt độ tối ưu, độ bền nhiệt, pH tối ưu, độ bền pH, ảnh hưởng của một số ion kim loại) làm cơ sở cho việc ứng dụng vào thực tiễn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cellulase thu nhận từ vi khuẩn *Bacillus* M5. Chủng vi khuẩn đã được phân lập và giữ giống tại Bộ môn Sinh học phân tử và Công nghệ sinh học ứng dụng, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Môi trường thí nghiệm

Môi trường LB (Luria and Bertani) dùng hoạt hóa chủng vi khuẩn *Bacillus* M5 (w/v): peptone 1%, NaCl 0,5%, cao nấm men 0,3%, pH 7,0 ± 0,2, môi trường đặc bổ sung 1,5% agar.

Môi trường thử hoạt tính cellulase (w/v): LB bổ sung carboxymethyl cellulose (CMC) 1%, 2% agar trong đệm phosphate có pH 7.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu nhận enzyme

Chủng vi khuẩn *Bacillus* M5 được hoạt hóa và nuôi trên môi trường LB đặc ở 37°C qua đêm. Sau đó dùng đầu tăm chấm vào khuẩn lạc và nhúng vào 100 ml môi trường LB lỏng ở 37°C trong 24 giờ, lắc 180 vòng/phút. Sau 24 h thu dịch nuôi sinh khối vi khuẩn đem ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nuôi bên trên được thu nhận và lọc qua màng lọc kích thước 0,45 µm để loại bỏ tế bào. Dịch thu được chứa enzyme cellulase được thu nhận và dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3.2. Tinh sạch enzyme

Enzyme cellulase được tách và thu nhận bằng dung môi hữu cơ (ethanol 96° và acetone) để tạo chế phẩm kỹ thuật.

Dịch enzyme thô được thu bằng cách ly tâm lạnh 100 ml dung dịch nuôi cấy ở 6.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C và thu dịch nổi. Dịch nổi và dung môi hữu cơ riêng rẽ (ethanol, acetone) được giữ lạnh sao cho nhiệt độ đạt từ 0 đến 4°C.

Dung môi hữu cơ được thêm từ từ vào dịch enzyme theo tỉ lệ thể tích enzyme: dung môi 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, khuấy đều, giữ lạnh 60 phút, ly tâm 6.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Kết tủa được sấy khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng (dưới 30°C), để dùng luôn hoặc bảo quản lạnh ở 4°C.

Chế phẩm enzyme thu được ở các thí nghiệm hòa tan trong 50 ml dung dịch đệm acetate pH 5,5 mM, xác định hoạt độ bằng cách ủ với dung dịch CMC 1%. Chế phẩm enzyme có hoạt độ cao nhất trong các thí nghiệm trên được sử dụng để nghiên cứu đặc tính. Tỉ lệ enzyme thô/dung môi có hoạt độ cao nhất được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3.3. Xác định hoạt độ enzyme

Hoạt độ cellulase được xác định bằng cách ủ 0,1 ml dịch enzyme với 0,9 ml dung dịch CMC 1% (dung dịch CMC được pha trong đệm natri acetate 50 mM pH 5. Hỗn hợp enzyme và CMC được ủ ở 40°C trong 30 phút sau đó bổ sung 1,2 ml DNS và đun sôi ở 100°C trong 10 phút để dừng phản ứng. Lượng đường giải phóng ra được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm (Miller, 1959).

Một đơn vị hoạt độ cellulase (U/ml) được tính bằng lượng enzyme cần thiết để giải phóng

1 µmol đường khử trong một phút ở điều kiện thí nghiệm (40°C, pH 5,0) (Singh *et al.,* 2013).

2.3.4. Xác định một số đặc tính enzyme

- Xác định nhiệt độ tối ưu của enzyme cellulase

Ủ 0,9 ml dung dịch CMC 1% pha trong đệm natri acetate 50 mM, pH 5 với 0,1 ml dịch enzyme ở các nhiệt độ khác nhau (40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 và 75°C). Sau đó hoạt độ enzyme được xác định theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.2. Nhiệt độ tối ưu của enzyme tương ứng với nhiệt độ ở đó hoạt độ enzyme thu được cao nhất.

- Xác định pH tối ưu của enzyme cellulase

Ủ 0,9 ml dung dịch CMC 1% pha trong dung dịch đệm ở các pH khác nhau 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 (pH 4,0 - 7,0: 50 mM citrate buffer; 6,0 - 8,0 đệm phosphate) cùng với 0,1 ml dịch enzyme, sau đó tiến hành xác định hoạt độ enzyme theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.2. Giá trị pH tối ưu của enzyme tương ứng với giá trị pH ở đó hoạt độ enzyme thu được cao nhất.

- Xác định độ bền nhiệt của enzyme cellulase

Enzyme được xử lý ở các nhiệt độ 50, 60 và 70°C, trong các thời gian 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 và 120 phút. Sau khi xử lý nhiệt, hoạt độ cellulase xác định theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.2. Độ bền nhiệt của enzyme được đánh giá bằng giá trị phần trăm hoạt độ còn lại trong các dịch đã xử lý nhiệt độ.

- Xác định độ bền pH của enzyme cellulase

Dịch enzyme được giữ trong dung dịch đệm theo tỷ lệ 1:1 có pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 trong thời gian 30, 60, 90, 120, 150 phút ở 40°C. Sau khi xử lý ở các pH khác nhau, hoạt độ cellulase xác định theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.2. Độ bền pH của enzyme được đánh giá bằng giá trị phần trăm hoạt độ cellulase còn lại trong các dịch đã xử lý pH.

- Xác định ảnh hưởng của một số ion kim loại đến hoạt độ enzyme cellulase

Dịch enzyme sau khi tủa được xử lý với ion kim loại ở nồng độ 5-10 mM (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}). Sau 1 h xác định hoạt độ enzyme theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.2. Độ ảnh hưởng của ion kim loại được đánh giá bằng giá trị phần trăm hoạt độ còn lại của enzyme (Lee *et al.*, 2010).

2.3.5. Xác định khối lượng phân tử enzyme bằng phương pháp điện di (SDS-PAGE)

Khối lượng phân tử của cellulase được xác định theo phương pháp điện di SDS - PAGE. Enzyme đã tinh sạch được thêm vào dung dịch đệm (0,05% bromophenol xanh, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol và 2% SDS trong dung dịch Tris-HCl 1 M, pH 6,8) và sau đó đun ở nhiệt độ 100°C trong 2 phút. Các mẫu sau đó được dùng để chạy điện di S

DS-PAGE (gel tách: 12,5%; gel cô 4%) trong hệ thống Mini - Protein II (Bio - Rad, Mỹ) ở điều kiện nhiệt độ phòng, 1,5 giờ, hiệu điện thế 100 Volt.

2.3.6. Xử lý số liệu thực nghiệm

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý thống kê trên phần mềm Excel 2016. Công cụ ANOVA được dùng để kiểm định sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm với mức ý nghĩa P = 0,05.

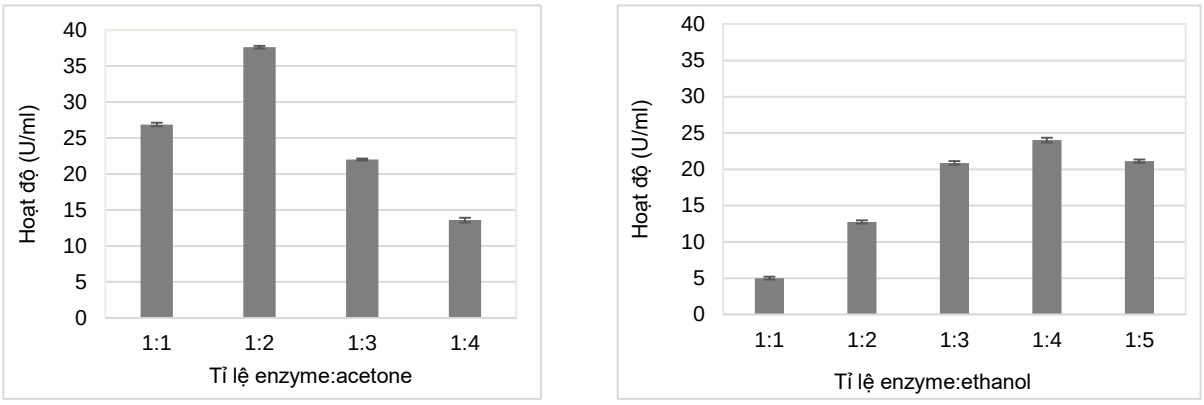
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chế phẩm kỹ thuật của cellulase

3.1.1. Kết tủa cellulase bằng dung môi hữu cơ

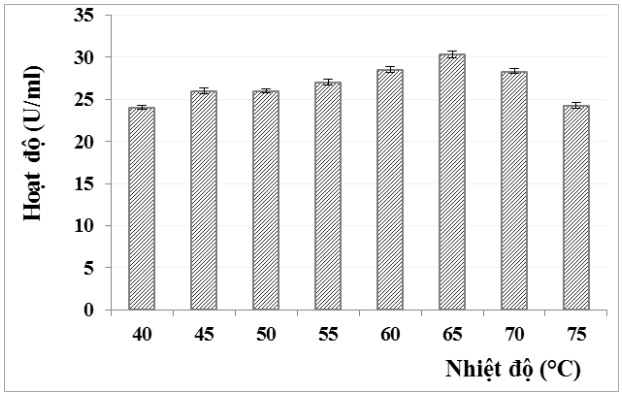
Kết quả thu được (Hình 1 và 2) cho thấy khi tăng tỉ lệ ethanol hoạt độ enzyme thu được tăng theo. Các số liệu được phân tích thống kê ANOVA cho thấy sự khác biệt giữa các mức thí nghiệm có ý nghĩa (F > F crit). Ở tỷ lệ tủa enzyme và ethanol tương ứng 1:4 cho hoạt độ cellulase cao nhất (24,05 U/ml). Điều này có thể giải thích là khi tỉ lệ ethanol tăng thì hằng số điện môi trong dung dịch giảm dẫn tới độ hòa tan của các enzyme/protein trong dung dịch giảm, do đó làm tăng hiệu quả kết tủa enzyme. Tuy nhiên, khi lượng dung môi tiếp tục tăng 1:5 thì hoạt độ enzyme giảm, vì ở nồng độ ethanol cao, các lớp hydrate xung quanh enzyme giảm mạnh nên ethanol có thể gây biến tính enzyme làm giảm hoạt độ. Ở thí nghiệm này tỉ lệ kết tủa enzyme và ethanol là 1:4 là phù hợp để thu nhận cellulase.

Tương tự như ethanol, khi sử dụng acetone làm tác nhân kết tủa, ở tỉ lệ enzyme và acetone là 1:2 cho hoạt độ cellulose cao nhất đạt 37,63 U/ml. Hoạt độ cellulase thu được khi kết tủa bằng acetone cao hơn so với ethanol. Vì vậy, enzyme cellulase thu nhận từ kết tủa bằng acetone được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

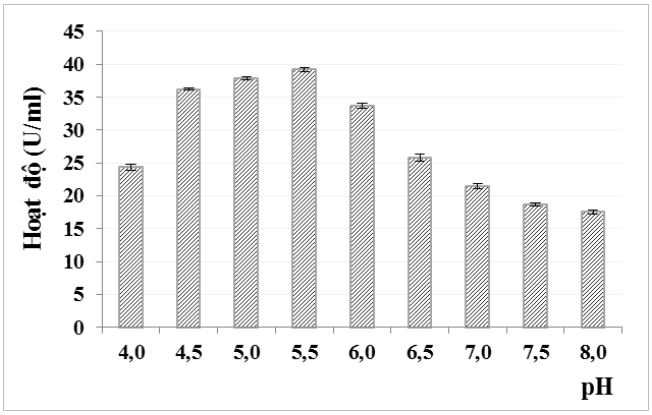


(a) (b)

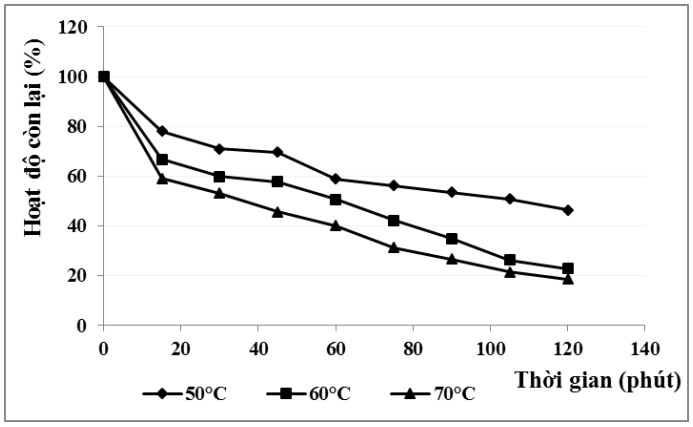
Hình 1. Hoạt độ cellulase sau khi tủa bằng ethanol 96° (a) và acetone (b) ở các tỷ lệ khác nhau



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ cellulase của *Bacillus* M5



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ cellulase của *Bacillus* M5 khi tủa bằng acetone



Hình 4. Độ bền nhiệt của enzyme cellulase

3.2. Đặc tính của enzyme cellulase

3.2.1. Nhiệt độ tối ưu

Kết quả ở hình 2 cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt độ của cellulase thu được từ chủng Bacillus M5 được ghi lại trên một phạm vi nhiệt độ khá rộng (40-75°C) và đạt giá trị hoạt độ cực đại tại 65°C (50,66 U/ml). Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng lên 70 và 75°C thì hoạt độ của enzyme giảm dần, còn 83,85% ở 75°C so với hoạt độ cực đại. Có thể kết luận rằng enzyme hoạt động tốt trong khoảng 55-75°C, nhiệt độ phản ứng tối ưu của enzyme là 65°C.

Nhiệt độ phản ứng tối ưu của enzyme cellulase thu được từ chủng *Bacillus* M5 cao hơn khi so sánh với kết quả của các nghiên cứu trước đây. Cụ thể, enzyme cellulase thu được từ chủng *Bacillus pumilus* B6.4 có nhiệt độ phản ứng tối ưu là 55°C (Mam *et al.,* 2017), chủng *Bacillus pumilus* EB3 sinh enzym cellulase có nhiệt độ phản ứng tối ưu là 60°C (Ariffin *et al.,* 2006), *Bacillus mycoides* S122C cellulase 50°C (Balansubramanian *et al.,* 2012) hay 60°C cho *Bacillus subtilis* YJ1 cellulase (Li *et al.*, 2010). Ngoài ra, *Bacillus vallismortis* RG-07 cellulase lại có nhiệt độ tối ưu 65°C (Rajeeva *et al.,* 2015), tương tự với nhiệt độ phản ứng tối ưu của enzyme cellulase thu được từ chủng *Bacillus* M5 trong nghiên cứu.

3.2.2. pH tối ưu

Kết quả cho thấy hoạt độ enzyme cellulase tăng trong khoảng pH từ 4,0-5,5. Hoạt độ cellulase đạt cực đại ở pH 5,5 (39,24 U/ml). Ở pH 6,5 hoạt độ giảm còn 65,75% và còn 44,65% ở pH 8 (Hình 3).

Có thể thấy rằng, giá trị pH tối ưu của enzyme cellulase thu được từ chủng *Bacillus* M5 có giá trị tương tự với enzyme cellulase thu được từ một số chủng *Bacillus* khác được công bố trong nghiên cứu của Mawadza *et al.* (2000) là từ 5,0 đến 6,5. Giá trị này thấp hơn giá trị pH 6,5 của *Bacillus pumilus* B6.4 cellulase (Mam & Nguyen, 2017), pH từ 6,0 đến 6,5 của *Bacillus subtilis* YJ1 (Li *et al.,* 2010), pH 7 của các enzyme *Bacillus vallismortis* RG-07 cellulase (Rajeeva *et al.,* 2015), *Pseudomonas flurescence* cellulase (Bakare *et al.,* 2005) hay *Bacillus amyoliquefaciens* DL3 cellulase (Lee *et al.,* 2008).

3.2.3. Độ bền nhiệt

Kết quả ở hình 4 cho thấy hoạt độ enzyme cellulase của chủng *Bacillus* M5 bền tại một khoảng nhiệt độ khá cao 50-70°C trong khoảng thời gian xử lý 2 giờ. Tại các nhiệt độ khảo sát, cellulase bền nhất ở 50°C; hoạt độ cellulase còn 58,92% sau 60 phút và 46,34% sau 120 phút. Khi nhiệt độ càng cao độ bền nhiệt của cellulase càng giảm. Sau 60 phút hoạt độ enzyme ở 60°C chỉ còn 50,55% và ở 70°C chỉ còn 39,97%. Sau 120 phút hoạt độ enzyme ở 60°C còn 22,82% và ở 70°C còn 18,63%. Các số liệu được phân tích ANOVA cho thấy sự khác biệt giữa các mức thí nghiệm là có ý nghĩa (F >F crit). Kết quả nghiên cứu cho thấy enzyme cellulase thu nhận từ chủng *Bacillus* M5 bền ở nhiệt độ 50°C.

Những enzyme cellulase bền nhiệt có ý nghĩa rất lớn trong ứng dụng vào thực tế sản xuất và bảo quản sau này vì nhiệt độ không những ảnh hưởng đến chất lượng và thời gian bảo quản mà còn ảnh hưởng đến việc tạo ra sản phẩm.

Các enzyme bền nhiệt còn có ưu thế trong việc xử lý thức ăn. Thức ăn ủ ở nhiệt độ cao trong vài giờ mà vẫn không giảm hoạt độ nhiều mà còn tăng tốc độ phản ứng. Hơn nữa, việc trộn enzyme vào thức ăn ở nhiệt độ cao trước khi cho vật nuôi ăn còn có tác dụng giảm sự tạp nhiễm của vi sinh vật gây hại thường phát triển ở 30°C đến 40°C. Mặt khác, các cellulase bền nhiệt còn có lợi thế trong việc xử lý các phế thải nông nghiệp trong quá trình làm phân bón hữu cơ, thường các đống ủ có nhiệt độ tương đối cao 45°C đến 70°C (Trần Ngọc Hữu và cs., 2014).

Ở các nghiên cứu khác, Natesan & Nelson (2014) đã cho thấy độ bền nhiệt của enzyme cellulase là trong khoảng từ 60-70°C ở *Bacillus pumilus* S124A. Ở chủng *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3, enzyme cellulase sinh ra bền trong khoảng nhiệt từ 50-70°C (Lee *et al.,* 2008). *Bacillus pumilus* B6.4 cellulase có khoảng bền nhiệt 55-65°C (Mam & Nguyen, 2017). Thêm vào đó, sự bền nhiệt của enzyme cellulase có thể lên đến khoảng 60-100°C, tuy nhiên chỉ giữ lại dưới 30% hoạt độ ở 100°C theo các báo cáo của Aygan *et al.* (2011) và Liang *et al.* (2009). Do đó, cũng có thể thấy rằng cellulase của chủng *Bacillus* M5 có khả năng chịu nhiệt khá tốt và cũng có thể được áp dụng cho một số mục đích công nghệ sinh học và thực phẩm.

3.2.4. Độ bền pH

Kết quả ở hình 5 cho thấy cellulase tương đối bền ở khoảng pH 6,0-6,5. Ở khoảng pH này hoạt độ cellulase vẫn còn hơn 80% sau 90 phút và trên 50% sau 150 phút. Ở các giá trị pH 5,0-6,0 và 7,0-7,5 độ bền của cellulase thấp hơn; hoạt độ của enzyme này chỉ còn trong khoảng từ 40% đến 49% sau 150 phút. Các số liệu được phân tích ANOVA cho thấy sự khác biệt giữa các mức thí nghiệm là có ý nghĩa (F > F crit).

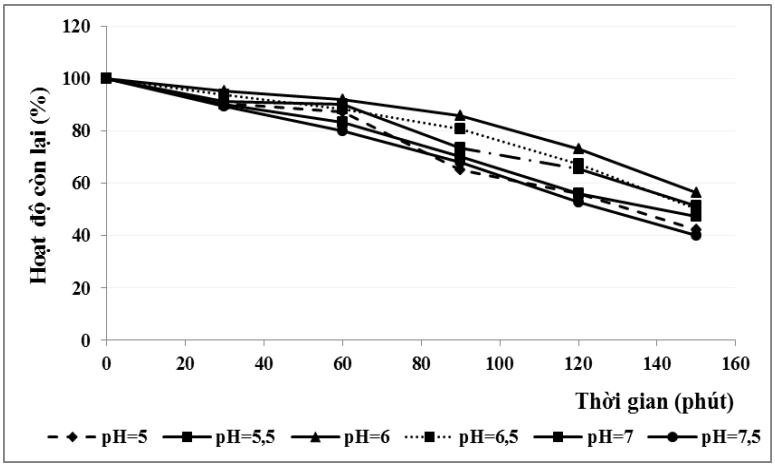
Qua kết quả trên có thể thấy cellulase của chủng *Bacillus* M5 tương đối bền ở môi trường axit yếu. Một số nghiên cứu trước đó cho thấy enzyme cellulase được sinh ra từ chủng *Bacillus* sp. ổn định ở khoảng pH tương đối rộng (Mawadza *et al.,* 2000; Lee *et al.,* 2008). Hoạt độ enzyme cellulase từ chủng *Bacillus pumilus* B6.4 đạt hơn 56% ở pH từ 5,5 đến 6,0 (Mam & Nguyen, 2017) hay cellulase từ *Bacillus vallismortis* RG-07 bền trong khoảng pH 4,0-9,0 (Rajeeva *et al.,* 2015). Enzyme cellulase nói chung bền trong một khoảng pH rộng từ 5 đến 10 (Kim *et al.,* 2005; Tahir *et al.,* 2009).

3.2.5. Ảnh hưởng của một số ion kim loại đến hoạt độ enzyme cellulase

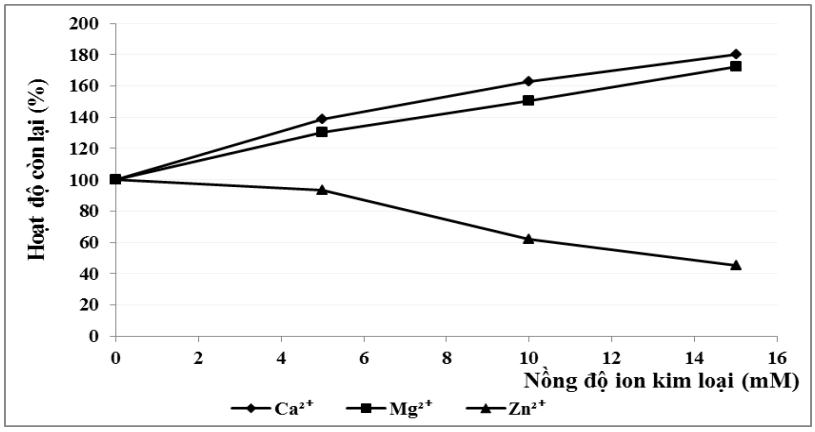
Kết quả ở hình 6 cho thấy enzyme khi xử lý với ion Ca^{2+}, Mg^{2+} hoạt độ enzyme sẽ tăng, ngược lại enzyme khi ủ với ion Zn^{2+} sẽ khiến hoạt độ enzyme giảm.

Ion kim loại là một trong các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme. Ion kim loại có ảnh hưởng trực tiếp và gián tiếp đến hoạt tính của enzyme. Tác động của ion kim loại có thể thông qua làm cầu nối giữa enzyme và cơ chất, làm thay đổi thể oxi hóa - khử, làm bền phân tử protein enzyme (Phạm Thị Trân Châu và cs., 2006)

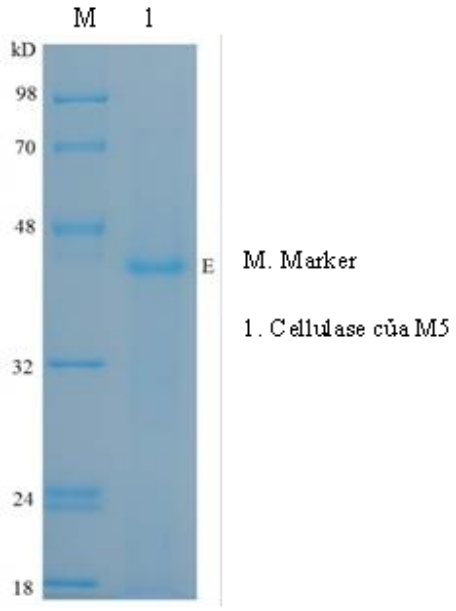
Trong một số nghiên cứu về ảnh hưởng của các ion kim loại đến enzyme cellulase, Yoon *et al.* (1994) và Bakare *et al.* (2005) đã kết luận rằng các ion Ca^{2+}, Mg^{2+} kích thích mạnh hoạt tính của cellulase. Tương tự trong nghiên cứu của Wang *et al.* (2009), *Paenibacillus* sp. chủng B39 cho hoạt động enzym tối đa khi môi trường nuôi cấy bổ sung 1 mM Ca^{2+}. Ngoài ra, ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt tính enzyme cellulase từ các chủng khác nhau cũng đã được nghiên cứu trong các nghiên cứu của Sangrila (2013) về ảnh hưởng của Mn^{2+} và Zn^{2+} tới hoạt độ của cellulase từ chủng *Bacillus* phân lập từ phân bò, nghiên cứu của Rajeeva & Soni (2015) về ảnh hưởng của một số ion kim loại và các chất tẩy rửa tới hoạt độ cellulase từ *Bacillus vallismortis* RG-07, nghiên cứu của Trịnh Đình Khá, 2015 về cellulase từ nấm sợi. Từ các nghiên cứu này có thể thấy rằng Ca^{2+}, Mg^{2+} có thể đóng vai trò như cofactor của enzyme, tham gia vào hoạt động xúc tác tại trung tâm hoạt động của enzyme. Vì vậy, khi có mặt các ion này, hoạt tính của enzyme sẽ tăng mạnh, trong khi đó Zn^{2+} có thể đóng vai trò như chất kìm hãm và làm giảm hoạt tính của enzyme.



Hình 5. Độ bền pH của enzyme cellulase



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ ion kim loại đến hoạt độ enzyme cellulase



Hình 7. Kết quả điện di SDS - PAGE

3.3. Khối lượng phân tử của enzyme cellulase

Enzyme sau khi tinh sạch đến chế phẩm kỹ thuật, kết quả điện di cho một dải băng kích thước khoảng 45 kDa (Hình 7). Kết quả này cho thấysản phẩm của quá trình kết tủa khá sạch (chỉ có 1 vạch băng rõ nét). Điều này chứng tỏ chủng vi khuẩn *Bacillus* M5 có khả năng sinh tổng hợp cellulase cao và quá trình kết tủa thu nhận enzyme này khá đặc hiệu. Khối lượng phân tử ở cellulase từ một số loài khác như *Bacillus sphaericus* JS1 29 kDa (Singh *et al*., 2004), *Bacillus vallismortis* RG-07 là 80 kDa (Rajeeva & Soni, 2015), *Bacillus licheniformis* AFM-07 37 kDa (Fatemeh *et al.,* 2016), *Bacillus sublitis* YJ1 là 32,5 KDa (Lee *et al.,* 2010)

4. KẾT LUẬN

Enzyme cellulase thu nhận từ chủng *Bacillus* M5 tinh sạch thích hợp ở tỷ lệ enzyme thô : ethanol là 1:4, enzyme thô : acetone là 1:2. Nhiệt độ tối ưu của enzyme là 65 °C, pH tối ưu 5,5; bền nhiệt ở 50°C. Ở pH 6,0-6,5 sau 150 phút hoạt độ enzyme cellulase còn hơn 50%; ion Ca^{2+} và Mg^{2+} giúp tăng hoạt độ enzyme, ion Zn^{2+} làm giảm hoạt độ enzyme. Khối lượng phân tử enzyme cellulase là 45 kDa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thị Xuân Sâm (2004). Công nghệ enzyme. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Phan Tuấn Nghĩa, Phạm Thị Trân Châu (2008). Công nghệ sinh học - tập 3: Enzyme và ứng dụng. Nhà xuất bản Giáo dục.

Thái Thị Hà Phương (2017). Phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp cellulase. Khóa luận tốt nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Trần Ngọc Hữu, Đỗ Tấn Trung, Nguyễn Quốc Khương (2014). Thành phần dinh dưỡng NPK trong ủ phân hữu cơ vi sinh và hiệu quả trong cải thiện sinh trưởng và năng suất lúa. Tạp chí Khoa học, Trường đại học Cần Thơ, 3: 151-157.

Trịnh Đình Khá (2015). Tinh sạch và nghiên cứu đặc tính của cellulase tự nhiên và tạo cellulase tái tổ hợp từ nấm sợi tại Việt Nam, Trường đại học Thái Nguyên.

Võ Văn Phước Quệ và Cao Ngọc Điệp (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose. Tạp chí Khoa học, Trường đại học Cần Thơ, 18(a): 177-184.

Ariffin H., Abdullah N., Umi Kalsom M.S., Shirai Y. and Hassan M.A. (2006). Production and characterisation of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. Int J Eng and Technol., 3(1): 47-53.

Aygan A., Karcioglu L. and Arikan B. (2011). Alkaline thermostable and holophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. Afri J Biotechnol., 10: 789-96.

Bakare M.K., Adewale I.O., Ajai A. and Shonukan O.O. (2005). Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. Afri J Biotechnol., 4: 898-904.

Balasubramanian N., Toubarro D., Teixeira M. and Simõs N. (2012). Purification and biochemical characterization of a novel thermo-stable carboxymethyl cellulase from Azorean isolate *Bacillus mycoides* S122C. Appl Biochem Biotechnol., 168(8): 2191-204.

Kim J.Y., Hur S.H. and Hong J.H. (2005) Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. Biotechnol Lett., 27: 313-6.

Lee Y. J., Kim B. K., Lee B. H., Jo K. I., Lee N. K., Chung C. H., Lee Y.C., and Lee J. W. (2008). Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresour Technol., 99: 378-386.

Lee Y.J., Kim B.K., Lee B.H., Jo K.I., Lee N.K. and Chung C.H. (2008). Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresour Technol., 99: 378-86.

Lee J.Y., Hsin H.L. and Zheng R.X. (2010). Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. J Marine Sci and Technol., 18(3): 466-471.

Liang Y., Feng Z., Yesuf J. and Blackburn J.W. (2009). Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacterium, *Anoxybacillus* sp. Appl Biochem Biotechnol. 10: 1007

Mam S. and Nguyen T.T.T. (2017). Screening and characterization of cellulases produced by *Bacillus* spp. Vietnam J. Agri. Sci., 15(9): 1205-1212.

Mawadza C., Hatti K. R., Zvauya R., and Mattiasson B. (2000). Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. J Biotechnol., 83(3): 177-187.

Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31: 426-429.

Natesan B., and Nelson S. (2014). *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermos stable enzyme with a wide substrate spectrum utility. Int. J Biological macromolecules, 67: 132-139.

Rajeeva Gaur and Soni Tiwari (2015). Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. BMC Biotechnol., 15(19): 1-12.

Ramesh C.K., Gupta R. and Singh A. (2011). Microbial cellulase and their application. Enzyme Res., pp. 1-10.

Sangrila S. and Tushar K.M. (2013). Cellulase production by Bacteria: A review. British Microbiol Res J., 3(3): 235-258.

Singh J., Batra N., Sobti R.C. (2004). Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. J Ind Microbiol Biotechnol., 31: 51-56.

Singh S., Moholkar V.S. and Goyal A. (2014). Optimization of carboxymethyl cellulase production from *Bacillus amyloliquefaciens* SS35. 3 Biotech., 4(4): 411-424.

Sreeja S.J., Jeba M.P.W., Sharmila J.F.R., Steffi T., Immanuel G., and Palavesam A. (2013). Optimization of cellulase production by *Bacillus altitudinis* APS MSU and *Bacillus licheniformis* APS2 MSU, gut isolates of fish *Etroplussuratensis*. Int J Adva Res and technol., 2: 401-406.

Tahir S.R., Bakhsh A., Rao A.Q., Naz M. and Saleem M. (2009). Isolation, purification and characterization of extracellular β-glucosidase from *Bacillus* sp. Adva Environ Biol Report, 3: 269.

Wang X., Yu X. and Xu Y. (2009). Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. Enzy Microb Technol., 45: 94-102.

Watanabe H1, Tokuda G. (2001). Animal cellulases. Cell Mol Life Sci., 9:1167-78.

Yoon S., Kim M.K., Hong J.S. and Kim M.S. (1994). Production of polygalacturonase from *Ganoderma lucidum*. Korean J Mycol., 22: 286-97.