TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ GIÁO DỤC
ISSN: 1859-1612
Journal homepage: https://tckhgd.dhsphue.edu.vn

Ảnh hưởng của thời gian thu nhận và các tác nhân tủa đến hiệu quả tinh sạch sơ bộ enzyme protease trích ly từ chủng *Bacillus* sp.

Ngô Đức Quốc, Hồ Thị Diệu Hiền, Đinh Thị Hòa, Phùng Thị Bích Hòa

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

THÔNG TIN BÀI BÁO

Quá trình xử lý:
Ngày nhận bài: 05/4/2025
Ngày nhận bản chỉnh sửa: 04/6/2025
Ngày nhận đăng: 16/6/2025
Ngày xuất bản: 20/10/2025

Từ khóa:
Bacillus sp
Ammonium sulfate
Dung môi
Protease
Tinh sạch

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm xác định các điều kiện tối ưu để thu nhận và tinh sạch sơ bộ enzyme protease từ chủng *Bacillus* sp.. Protease được thu nhận từ dịch nuôi cấy ở các thời điểm khác nhau (12–96 giờ sau lên men) nhằm đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt tính enzyme. Bên cạnh đó, hiệu quả của các phương pháp kết tủa khác nhau cũng được khảo sát, bao gồm sử dụng ethanol và acetone ở các tỷ lệ (dịch trích: dung môi) 1:2, 1:3 và 1:4 (v/v), cũng như kết tủa bằng ammonium sulfate ở các nồng độ bão hòa từ 30% đến 80%. Kết quả cho thấy, thời điểm 72 giờ sau nuôi cấy là tối ưu cho việc thu nhận protease, cho hoạt độ enzyme đạt mức cao nhất (660,4 U/mL). Trong các phương pháp tinh sạch sơ bộ được khảo sát, kết tủa bằng ammonium sulfate ở nồng độ bão hòa 70% cho hiệu suất thu hồi enzyme cao nhất (62,38%) và duy trì hoạt tính enzyme vượt trội so với các điều kiện còn lại. Những kết quả này cung cấp cơ sở thực nghiệm quan trọng cho việc phát triển quy trình sản xuất protease hiệu quả từ *Bacillus* sp..

1. MỞ ĐẦU

Protease là một trong những enzyme quan trọng nhất trong ngành công nghiệp, với ứng dụng đa dạng trong nhiều lĩnh vực khác nhau, đặc biệt là trong sản xuất chất tẩy rửa, thuộc da, làm bánh mì, sản xuất bia, làm mềm thịt và thủy phân protein, dược phẩm và nghiên cứu sinh học phân tử (Moussi và cộng sự, 2025).

Các nguồn chính để sản xuất protease bao gồm động vật, thực vật, vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn (Jisha và cộng sự, 2013; Chandrasekaran và cộng sự, 2015; Sun và cộng sự, 2019). Tuy nhiên, việc sản xuất protease từ động vật và thực vật có một số hạn chế, bao gồm các vấn đề đạo đức, tác động tiêu cực đến môi trường và hiệu quả sản xuất không cao. Do đó, protease từ vi sinh vật ngày càng trở nên phổ biến hơn trên thị trường (Jisha và cộng sự, 2013). Protease vi sinh vật có sự đa dạng phong phú, bao gồm các loại protease acid, trung tính và kiềm. Chúng có khả năng hoạt động trong nhiều điều kiện công nghiệp khác nhau, kể cả trong môi trường khắc nghiệt như nhiệt độ cao. Bên cạnh đó, protease vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng rộng rãi và mở ra thị trường lớn trong nhiều ngành công nghiệp như thực phẩm, đồ uống, chất tẩy rửa, da, thức ăn chăn nuôi, xử lý chất thải, lên men vi sinh và công nghệ sinh học (Song và cộng sự, 2023).

Bacillus subtilis, một loại vi khuẩn gram dương (Vanitha và cộng sự, 2014), phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Trong điều kiện lên men ổn định, *B. subtilis* tổng hợp một lượng lớn protease do tác động của quá trình cảm ứng chất nền (Singh và cộng sự, 2015).

Nghiên cứu này nhằm tối ưu hóa thời điểm thu nhận enzyme protease từ chủng *Bacillus* sp. và đánh giá hiệu quả của các tác nhân kết tủa khác nhau trong quá trình tinh sạch enzyme. Mục tiêu là thu được protease với hàm lượng và hoạt độ cao, nâng cao hiệu suất và độ ổn định của enzyme, tạo tiền đề cho các ứng dụng tiềm năng của

Tác giả liên hệ: Phùng Thị Bích Hòa;
Địa chỉ e-mail: ptbhoa@hueuni.edu.vn
DOI: https://doi.org/10.26459/jse.066.2025

enzyme này trong xử lý vỏ trứng gia cầm, đảm bảo hoạt tính phân giải protein màng vỏ trứng – thành phần chính ảnh hưởng đến khả năng phân hủy sinh học của vỏ trứng. Nhờ đó, enzyme protease tinh sạch có thể được ứng dụng hiệu quả hơn trong quá trình thủy phân vỏ trứng, góp phần thúc đẩy quá trình chuyển hóa chất thải hữu cơ thành sản phẩm có giá trị nông nghiệp cao.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. được phân lập từ cỏ khô và bảo quản tại Phòng Thí nghiệm Di truyền và Vi sinh, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế. Chủng được bảo quản trong dung dịch glycerol 30% (v/v) ở nhiệt độ -80°C. Trước khi sử dụng, chủng được nuôi cấy trên môi trường LB (Luria-Bertani) rắn cơ bản (w/v) gồm: 1 g/100mL tryptone, 0,5 g/100mL cao nấm men, 1 g/100mL NaCl.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của các thời điểm thu nhận đến hoạt độ protease

Tiến hành lên men chủng *Bacillus* sp. trong môi trường đã tối ưu thành phần dinh dưỡng và độ thoáng khí (môi trường LB cơ bản có bổ sung 2,0 % (w/v) glucose, 2,5 % (w/v) peptone, pH 7-8, độ thoáng khí 92%, nhiệt độ 37ºC và lắc 200 rpm (Quốc và cộng sự, 2024). Thu nhận và xác định hoạt độ protease ở các thời điểm 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 và 96 giờ sau lên men để xác định thời điểm thu nhận protease tối ưu.

Ảnh hưởng của các loại tác nhân tủa đến hoạt tính protease

Protease được tủa từ 50 mL dịch enzyme thô với các loại dung môi khảo sát: ethanol 96% hoặc aceton hoặc muối ammonium sulfate. Tỉ lệ dịch enzyme thô: dung môi lần lượt khảo sát là 1:2;1:3;1:4 (v/v) với dung môi ethanol và aceton. Phương pháp tủa với muối ammonium sunfate được tủa theo độ bão hòa từ 30 đến 80%. Sau khi thêm dung môi hoặc muối, hỗn hợp được khuấy nhẹ ở 4°C trong 30 phút. Sau đó dung dịch tủa được ly tâm 14000 vòng/phút trong 10 phút ở 4ºC. Loại bỏ dịch nổi, sau đó hòa tan cặn với dung dịch đệm muối phosphate (PBS) 1X với tỉ lệ 1:5 (khối lượng tủa khô : thể tích đệm, w/v). Tiếp theo thêm PBS 1X lạnh vào phần cặn, lắc nhẹ, ly tâm 14000 vòng/phút trong 10 phút ở 4ºC, lặp lại bước này 3 lần để loại bỏ tác nhân tủa. Dịch enzyme thô được bảo quản ở 4°C và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo (Shad và cộng sự, 2024).

Thu nhận protease

Xác định hoạt độ protease

Cho 1 mL dung dịch enzyme thô vào 5 mL dung dịch casein 0,65% được pha trong đệm Tris-HCl (100 mM; pH 8,5). Hỗn hợp được ủ trong 30 phút ở 37°C. Sau đó, thêm 5 mL Trichloroacetic acid (TCA 10%) vào hỗn hợp này, làm xuất hiện tủa. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và sau đó lọc dung dịch qua màng lọc 0,45 µm. Tiếp theo, lấy 2 mL dịch lọc, thêm 5 mL 0,5 M sodium carbonate, lắc đều, ủ 20 phút. Sau đó, thêm 1 mL thuốc thử phenol folin vào hỗn hợp và đo độ hấp thụ tại bước sóng 660 nm bằng máy quang phổ. Hoạt độ protease được xác định dựa trên đồ thị chuẩn tyrosine (Takami và cộng sự, 1989).

Một đơn vị hoạt độ enzyme (1 U) được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 µmol tyrosine tương đương từ casein trong 1 phút ở điều kiện chuẩn.

Xử lý số liệu

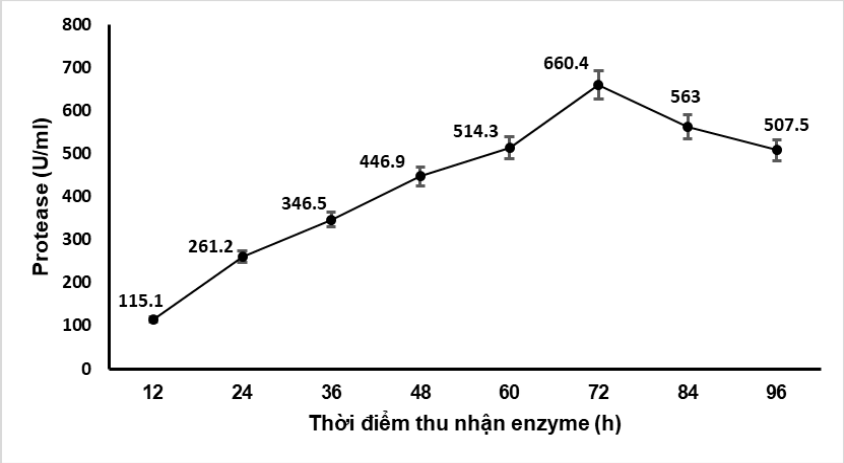
Office Excel 2010 được sử dụng để phân tích số liệu thu thập, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Phần mềm SPSS (ver 23.0) được sử dụng để phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA) với Duncan's test ($p<0,05$). Kết quả phân tích được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của các thời điểm thu nhận sinh khối đến hoạt độ protease của *Bacillus* sp.

Dựa trên kết quả thu được (Hình 1), có thể thấy hoạt độ enzyme protease thay đổi theo thời gian nuôi cấy, cho thấy sự ảnh hưởng của quá trình sinh trưởng và trao đổi chất của *Bacillus* sp. đến khả năng sinh tổng hợp enzyme. Ở giai đoạn đầu (12-72 giờ), hoạt độ enzyme có xu hướng tăng dần, đạt cực đại tại 72 giờ với giá trị 660,4 U/mL. Cụ thể, tại 12 giờ, hoạt độ enzyme đạt 115,1 U/mL, sau đó tăng lên 261,2 U/mL tại 24 giờ, và tiếp tục tăng dần qua các mốc 36 giờ (346,5 U/mL), 48 giờ (446,9 U/mL) và 60 giờ (514,3 U/mL). Sự gia tăng hoạt độ enzyme trong giai đoạn này phản ánh quá trình sinh trưởng mạnh mẽ của vi khuẩn và khả năng tổng hợp protease trong nguồn dinh dưỡng đã được tối ưu. Chủng *Bacillus* sp. có thể là chủng bán thuần hóa, với cơ chế điều hòa biểu hiện protease khác biệt, dẫn đến việc sản xuất enzyme diễn ra muộn hơn. Nghiên cứu đã

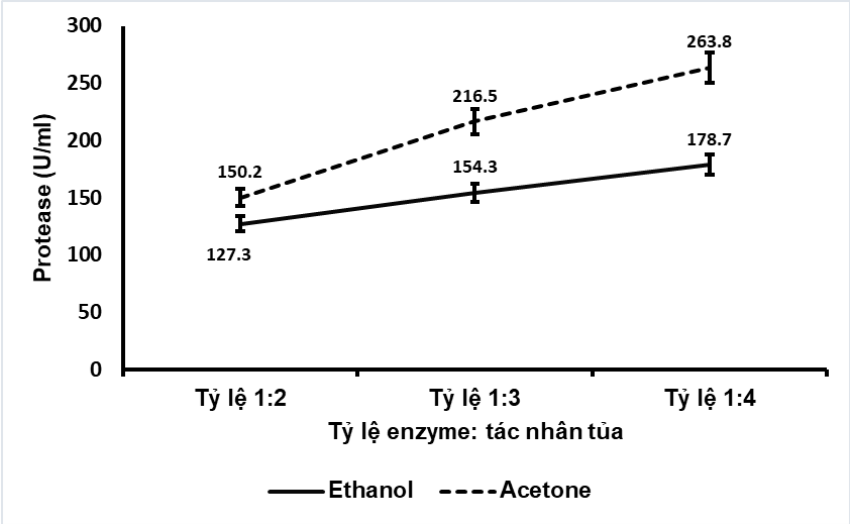
chỉ ra rằng một số chủng *Bacillus* sp. đạt hoạt độ protease tối đa sau 72 giờ nuôi cấy, như trường hợp của *B. subtilis* BS-QR-052, đạt 598 U/mL sau 96 giờ (Sun và cộng sự, 2023).



Hình 1. Hoạt độ protease (U/mL) của *Bacillus* sp. theo thời gian thu nhận (h).

Ảnh hưởng của tác nhân tủa đến hoạt tính protease của *Bacillus* sp.

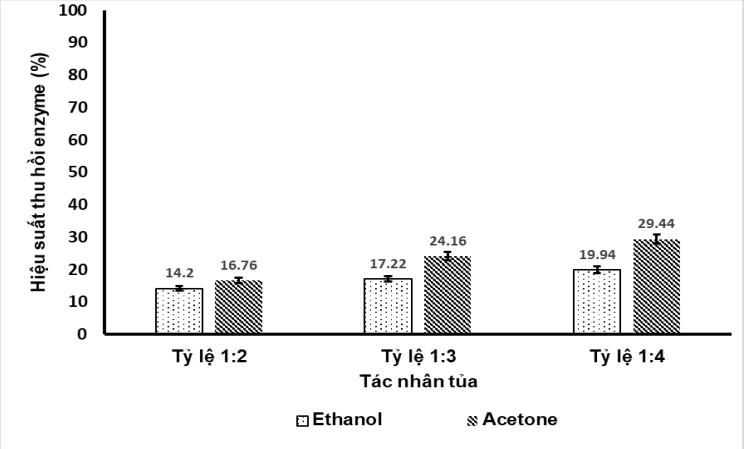
Protease của *Bacillus sp.* được thu nhận thông qua ba phương pháp kết tủa khác nhau: sử dụng ethanol, acetone và ammonium sulfate. Khi sử dụng dung môi ethanol và acetone làm tác nhân tủa, hoạt độ enzyme thu được tăng dần khi tăng tỷ lệ enzyme : dung môi (v/v) từ 1:2 đến 1:4 (Hình 2). Cụ thể, tại tỷ lệ enzyme : ethanol (1:4), hoạt độ protease là 178,7 U/mL, trong khi đó, ở tỉ lệ enzyme : acetone (1:4) hoạt độ protease cao hơn, đạt 263,8 U/mL. Acetone có khả năng tủa protease hiệu quả hơn ethanol. Tương tự, hiệu suất thu hồi protease của acetone cũng cao hơn ethanol ở tất cả các tỷ lệ nghiên cứu, với giá trị cao nhất đạt 29,44% tại tỷ lệ 1:4, so với 19,94% khi sử dụng ethanol (Hình 3). Sự khác biệt về hiệu quả kết tủa giữa acetone và ethanol được ghi nhận trong nghiên cứu của Geethanjali và Subash (2013), trong đó acetone cho hiệu suất thu hồi protease cao nhất. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu về tủa protease bằng acetone với tỉ lệ enzyme : acetone (2:3, v/v) từ *Bacillus* đạt được hoạt tính chung và hoạt tính riêng lần lượt là 935,0 U/mL và 745,0 U/mg (Alzobaidy và cộng sự, 2024).



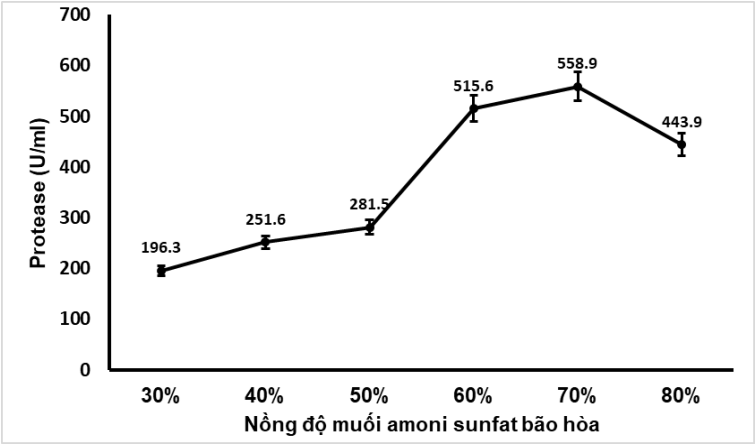
Hình 2. Hoạt độ protease (U/mL) của *Bacillus* sp. theo các tỉ lệ dung môi tủa.

Trong khi đó, khi sử dụng ammonium sulfate, hoạt độ enzyme và hiệu suất thu hồi đều cao hơn đáng kể so với kết tủa bằng dung môi hữu cơ (Hình 4). Cụ thể, hoạt độ enzyme tăng dần từ 196,3 U/mL (ở nồng độ muối 30%) lên mức cao nhất 558,9 U/mL tại nồng độ bão hòa 70%, sau đó giảm xuống 443,9 U/mL tại 80% bão hòa. Với hiệu suất thu hồi enzyme, giá trị cao nhất đạt 62,38% ở nồng độ 70% (Hình 5). Khi nồng độ muối tiếp tục tăng lên 80%, hiệu suất thu hồi giảm xuống 49,54%, có thể do hiện tượng kết tủa không đặc hiệu hoặc sự biến tính enzyme do nồng độ muối quá cao. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với một số nghiên cứu đã được công bố, theo Hussein và cộng sự (2024), hơn 82% protease từ *Pseudomonas aeruginosa* được thu

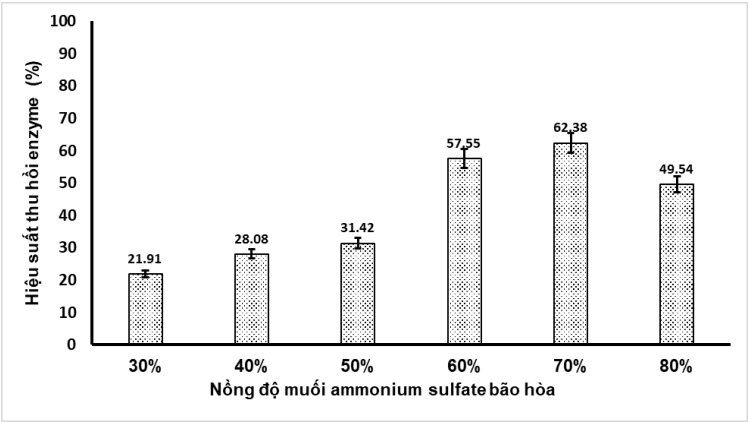
hồi sau khi kết tủa bằng 70% ammonium sulfate. Mohammed và cộng sự (2015) phát hiện ra rằng độ bão hòa ammonium sulfate 20–80% được sử dụng để kết tủa protease. Hoạt động tối đa của protease được quan sát thấy ở mức bão hòa 70%. Ammonium sulfate được sử dụng phổ biến để kết tủa enzyme nhờ vào độ hòa tan cao và chi phí thấp so với nhiều dung môi khác. Đáng chú ý, việc tủa enzyme bằng ammonium sulfate không làm thay đổi pH cũng như không ảnh hưởng đến độ ổn định của enzyme (Whitaker và cộng sự, 1972). Theo nghiên cứu của Secades và Guijarro (1999), hoạt tính protease đạt mức cao nhất ở nồng độ bão hòa ammonium sulfate 70%. Trong một nghiên cứu khác, Kam và Karn (Kam và cộng sự, 2014) báo cáo rằng phần enzyme kết tủa thu được ở nồng độ bão hòa 70% ammonium sulfate thể hiện hoạt tính protease cao nhất, với hoạt tính riêng tăng gấp 20 lần so với phần dịch nổi chưa được tủa.



Hình 3. Hiệu suất thu hồi protease (%) của *Bacillus* sp. ở các tỉ lệ dung môi tủa.



Hình 4. Hoạt độ protease (U/mL) của *Bacillus* sp. ở các nồng độ ammonium sulphate bão hòa.



Hình 5. Hiệu suất thu hồi protease (%) của *Bacillus* sp. ở các nồng độ ammonium sulphate bão hòa.

4. KẾT LUẬN

Thời điểm tối ưu để thu nhận protease từ *Bacillus* sp. là sau 72 giờ nuôi cấy, khi hoạt độ enzyme đạt 660,4 U/mL. Phương pháp kết tủa bằng ammonium sulfate ở nồng độ 70% bão hòa cho hiệu suất thu hồi enzyme cao nhất (558,9 U/mL) và duy trì hoạt tính vượt trội so với các phương pháp kết tủa bằng ethanol và acetone. Trong đó, tủa protease bằng acetone với tỉ lệ enzyme:acetone (1:4) mang lại hoạt độ protease cao hơn tủa bằng ethanol (263,8 U/mL), cho thấy acetone có hiệu quả tốt hơn ethanol trong việc bảo toàn hoạt tính enzyme. Protease thu được từ *Bacillus sp.* với hoạt tính cao và phương pháp kết tủa hiệu quả có tiềm năng ứng dụng trong phá vỡ protein cấu trúc vỏ trứng, làm tăng khả năng tách và xử lý vỏ trứng nhanh chóng, thân thiện môi trường và tiết kiệm chi phí.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ từ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Trường với mã số T.24.TN.106.10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alzobaidy, H. N., Hasan, G. M., Al-Magsoosi, S. K., & Awda, J. M. (2024). Isolation, Purification, and Characterization of Protease from a Local Bacillus Strain Adapted to Extreme Temperatures in Southern Iraq: Bacillus protease & climate change adaptation. *Journal of Scientific & Industrial Research (JSIR)*, **83(7)**, 741–747.

Chandrasekaran, S., Kumaresan, S. S., & Manavalan, M. (2015). Production and optimization of protease by filamentous fungus isolated from paddy soil in Thirvarur District Tamilnadu. *J App Biol Biotechnol*, **3(6)**, 66–69.

Geethanjali, S., & Subash, A. (2013). Comparative study on precipitation techniques for protease isolation and purification from Labeo rohita viscera. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **22(2)**, 121–128.

Hussein, H. A., Saleh, B. H., & Zbar, N. S. (2024). Production and purification of protease produced by UV-mutated *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Emergency Medicine, Trauma & Acute Care*, **2024(5)**, 5.

Jisha, V. N., Smitha, R. B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K. N., Sajith, S., ... & Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, **1(3)**, 39–51.

Kam, N., & Karn, S. K. (2014). Evaluation and characterization of protease production by *Bacillus* spp. induced by UV-mutagenesis. *Enzyme Engineering*, **3(1)**, 119:1–5.

Mohammed, Y. H. I. (2015). Isolation of protease producing microorganisms from food waste. *J. Bio. Innov*, **4(6)**, 322–346.

Moussi, K., Azzouz, Z., Benhoula, M., và cộng sự (2025). Enhanced protease production by *Aspergillus candidus* strain MKA05 using response surface methodology. *Biomass Conversion and Biorefinery*, **15**, 4819–4834.

Ngô Đức Quốc, Hồ Thị Diệu Hiền, Đinh Thị Hòa, Phùng Thị Bích Hòa (2024). Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến quá trình sinh trưởng và sinh protease ngoại bào của chủng *Bacillus subtilis* NT20. *Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học 2024*, tr. 392–396.

Secades, P., & Guijarro, J. A. (1999). Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology*, **65(9)**, 3969–3975.

Shad, A. A., Ahmad, T., Iqbal, M. F., Asad, M. J., Nazir, S., Mahmood, R. T., & Wajeeha, A. W. (2024). Production, Partial Purification and Characterization of Protease through Response Surface Methodology by *Bacillus subtilis* K-5. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **67**, e24210355.

Singh, P., Rani, A., & Chaudhary, N. (2015). Isolation and characterization of protease producing *Bacillus* sp from soil. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **6**, 633–639.

Song, P., Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R., & Wei, F. (2023). Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*, **14**, 1236368.

Sun D., Wang M., Wen X., Mao S., Cheng A., Jia R., et al. (2019). Biochemical characterization of recombinant Avihepatovirus 3C protease and its localization. Virol. J. 16:54.

Sun, B., Zou, K., Zhao, Y., Tang, Y., Zhang, F., Chen, W., ... & Zheng, Y. (2023). The fermentation optimization for alkaline protease production by Bacillus subtilis BS-QR-052. *Frontiers in Microbiology*, **14**, 1301065.

Takami, H., Akiba, T., & Horikoshi, K. (1989). Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **30(2)**, 120–124.

Vanitha, N., Rajan, S., & Murugesan, A. (2014). Optimization and production of alkaline protease enzyme from *Bacillus subtilis* 168 isolated from food industry waste. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **3**, 36–44.

Whitaker, J. R., & Bernard, R. A. (1972). *Experiments for: An introduction for enzymology*. The Whiber Press.

Ye, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S., ... & Jiao, W. (2019). A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environment International*, **129**, 488–496.

Impact of harvest time and precipitation methods on the partial purification efficiency of protease from *Bacillus* sp.

Ngo Duc Quoc, Ho Thi Dieu Hien, Dinh Thi Hoa, Phung Thi Bich Hoa

University of Education, Hue University

ARTICLE INFO

Article history:
Received 05 April 2025
Received in revised form 04 June 2025
Accepted 16 June 2025
Published 20 October 2025

Keywords:
Bacillus sp
Ammonium sulfate
Purification
Protease
Solvent

Corresponding author:
Phung Thi Bich Hoa
E-mail address:
ptbhoa@hueuni.edu.vn

ABSTRACT

This study aimed to determine the optimal conditions for the extraction and partial purification of protease from *Bacillus* sp.. Protease activity was monitored from 12 to 96 hours to evaluate the effect of cultivation duration. In addition, different precipitation methods were assessed, including ethanol and acetone at extract-to-solvent ratios of 1:2, 1:3, and 1:4 (v/v), as well as ammonium sulfate precipitation at saturation concentrations from 30% to 80%. The results indicated that 72 hours post-inoculation was the optimal time point for protease recovery, with the enzyme activity reaching the highest level (62.38%). Among the purification methods tested, ammonium sulfate precipitation at 70% saturation yielded the highest enzyme recovery (558.9 U/mL) and maintained superior enzymatic activity compared to other salt concentrations and organic solvents. These findings provide valuable experimental data for developing an efficient protocol for protease production from *Bacillus* sp..